



HAL
open science

Etude des effets de l'adénosine sur la métalloprotéinase-9 : Implication dans le remodelage ventriculaire

Émilie Velot

► **To cite this version:**

Émilie Velot. Etude des effets de l'adénosine sur la métalloprotéinase-9 : Implication dans le remodelage ventriculaire. Médecine humaine et pathologie. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2008. Français. NNT : 2008NAN10087 . tel-01748425

HAL Id: tel-01748425

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748425>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

ÉCOLE DOCTORALE « BIOLOGIE, SANTÉ ET ENVIRONNEMENT »

THÈSE

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ DE NANCY

- Mention ARN : Biogenèse et Structure / Fonction -

par

Emilie VELOT

Sujet :

« Etude des effets de l'adénosine sur la métalloprotéinase-9.
Implication dans le remodelage ventriculaire »

Co-Directeurs de thèse : Y. Devaux, PhD (Nancy)

D. Longrois, MD-PhD (Nancy)

Membres du jury

Rapporteurs : Monsieur le Docteur Jorge Boczkowski
 Monsieur le Professeur Alexandre Mebazaa

Examineurs : Monsieur le Professeur Paul-Michel Mertes (Président)
 Monsieur le Docteur Yvan Devaux
 Monsieur le Professeur Dan Longrois
 Monsieur le Docteur Bernard Weber

Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire, CRP-Santé
120 Route d'Arlon L-1150 Luxembourg

La courbe de tes yeux

*La courbe de tes yeux fait le tour de mon cœur,
 Un rond de danse et de douceur,
 Auréole du temps, berceau nocturne et sûr,
 Et si je ne sais plus tout ce que j'ai vécu
 C'est que tes yeux ne m'ont pas toujours vu.
 Feuilles de jour et mousse de rosée,
 Roseaux du vent, sourires parfumés,
 Ailes couvrant le monde de lumière,
 Bateaux chargés du ciel et de la mer,
 Chasseurs des bruits et sources des couleurs,
 Parfums éclos d'une couvée d'aurores
 Qui gît toujours sur la paille des astres,
 Comme le jour dépend de l'innocence
 Le monde entier dépend de tes yeux purs
 Et tout mon sang coule dans leurs regards*

Paul Eluard, « Capitale de la douleur », 1926

« Confronté à une épreuve, l'homme ne dispose que de trois choix : 1) combattre ; 2) ne rien faire ; 3) fuir. »

« L'Homme est enfin, on peut le supposer, le seul animal qui sache qu'il doit mourir. Ses luttes journalières compétitives, sa recherche du bien-être à travers l'ascension hiérarchique, son travail machinal accablant, lui laissent peu de temps pour penser à la mort, à sa mort. C'est dommage, car l'angoisse qui en résulte est sans doute la motivation la plus puissante à la créativité. Celle-ci n'est-elle pas en effet une recherche de la compréhension, du pourquoi et du comment du monde, et chaque découverte ne nous permet-elle pas d'arracher un lambeau au linceul de la mort ? N'est-ce pas ainsi que l'on peut comprendre qu'en son absence celui qui "gagne" sa vie la perd ? »

Henri Laborit, « Eloge de la fuite », 1976

à tous ces tuberculeux qui ont eu assez de souffle pour exorciser la douleur par les mots ou la
 biochimie...
 à toutes les Femmes de ma vie,
 à mon Père qui m'a toujours encouragée,

à mon Époux

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le Professeur Daniel Wagner pour son accueil chaleureux au sein de son laboratoire. Pour sa grande confiance et son soutien permanent, je tiens à lui exprimer ma sincère reconnaissance et toute ma considération.

Je tiens à exprimer mes plus sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de diriger et/ou de juger ce travail. Que chacun d'entre eux trouve en ces quelques lignes, l'expression de toute ma gratitude et de mon plus profond respect:

- J'adresse mes vifs remerciements et mon profond respect au Docteur Yvan Devaux pour la confiance qu'il m'a témoignée, pour son encadrement, ses nombreux conseils, son dynamisme et sa gentillesse. Merci pour toutes les connaissances scientifiques qu'il m'a apportées et pour avoir dirigé ce travail avec tant de patience. Merci également pour le soutien dont il m'a témoigné tout au long de ce travail. Il a su me redonner confiance après ma difficile expérience de Master.

- Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Dan Longrois. Je lui suis très reconnaissante de m'avoir fait confiance en acceptant de devenir mon directeur de thèse. Merci pour tous les conseils scientifiques qu'il m'a apportés et pour son encadrement, ainsi que ses idées. Qu'il trouve ici l'expression de mon plus grand respect.

- Je remercie Monsieur le Docteur Jorge Boczkowski et Monsieur le Professeur Alexandre Mebazaa d'avoir consacré du temps à l'examen de ce manuscrit et d'avoir très gentiment accepté de faire partie des membres du jury en tant que rapporteurs externes. C'est un honneur pour moi qu'ils aient accepté de juger ce travail.

- Je remercie Monsieur le Professeur Paul-Michel Mertes et Monsieur le Docteur Bernard Weber du grand honneur qu'ils me témoignent en acceptant d'être examinateurs de cette thèse, et de me consacrer une part précieuse de leur temps.

Je remercie Célinette pour son aide scientifique, expérimentale, intellectuelle et amicale. Sa constante présence et sa bienveillance depuis le commencement. Qu'elle soit assurée de mon amitié sincère et de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent également à l'ensemble des membres du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire pour leur aide et leur soutien quotidien. Par leur compétence et leur bonne humeur, ils m'ont beaucoup apportée. Merci d'avoir su me supporter tout au long de ces trois années. Qu'ils soient assurés de ma profonde reconnaissance.

Enfin, je remercie Monsieur le Docteur Didier Rouy pour ses conseils et ses connaissances en cardiologie, nous nous sommes croisés pendant plus d'un an, avant qu'il ne rejoigne le siège de la Fédération. Je lui témoigne ma sincère reconnaissance et mon profond respect.

D' Doktorarbescht : une multitude de personnes à remercier...

C'est tout au long de ces trois années que j'ai réalisé à quel point j'avais été conseillée, entourée, encouragée, soutenue dans les moments les plus difficiles de ce travail. Les progrès et avancées que j'ai pu accomplir, je les dois, pour une grande part, à des interventions extérieures dont il m'est agréable devoir de saluer les auteurs. Que soient remerciés mes collègues et amis pour s'être montrés compréhensifs vis-à-vis des baisses de régime et des troubles de l'humeur que me causèrent parfois de persistantes incertitudes.

MERCI à cette merveilleuse équipe dirigée par Guy qui constitue le pétillant Laboratoire d'Hématologie Cancérologie Expérimentale !!! En plus de leur soutien, ils se sont toujours assuré que la caféine perfuse bien dans mes veines. Merci au trio que je considère comme l'« Apoptosis team » et leurs conseils éclairés (Nassera, Victoria et Etienne-George). Merci à Valérie pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci aux membres de la CFC, NHC-René et Wim pour leur savoir-faire et leur aide.

Merci aux membres de l'IT-team qui ont toujours répondu présents pour installer un logiciel ou une imprimante.

Merci à ma famille, Jon (qui m'a permis de prendre un nouveau départ), Sounitsch (qui m'a appris à ...euh...je ne peux pas l'écrire) et mon Yeux-Bleus.

Merci à mes amis : Sophie, Melsanie, Coumba, Speed, Sylvie, Hélène, Philipsch, Eric et tous les autres... Comment arrivez-vous à me supporter ?

Merci à ma « DEA team », qui a su rester présente et solidaire en dépit du système.

Merci à Roger-Louis N. & Piotr Ioninosky, mes compagnons de toujours qui regretteront à jamais que je ne sois pas un homme... Désolée les gars !!!

Je suis également redevable à mes lectrices et troueuses de choc & de charme, Carine, MelK et Soph'. Il est où ?

Pour leurs encouragements et les moments de distraction, je tiens aussi à exprimer toute mon amitié à Potichou et De Ben, spéciale dédicace « Genrô Maô Ken » (c'est mon préféré...). Tu l'as vu ?

Merci à Anaiï, grâce à elle je me suis sentie comme Miss Daisy (Bette Midler, Reviens !), merci Vendresse.

Merci à des enseignants remarquables qui m'ont éveillée à l'envie d'apprendre : Catherine Corbier, Frédérique Tête-Favier et Jean Risse.

Merci à tout ceux qui m'ont accompagnée sans réserve : GW Dorn The Second, Douglas Netter, JMS Straczinski, Gene Roddenberry, Rick Berman, Michael Piller, Henrit Laborit, Rosalind Elsie Franklin, Peter Gabriel (« So »...), Danny Elfman, Terry Gilliam, JG Ballard, Michel Tournier, HG Wells, Philip K Dick...la liste est trop longue ; et à tous ces inventifs 漫画家, en particulier Terasawa Buichi 寺沢 武一, Kuramada Masami 車田 正美, Okada Megumu 岡田 芽武 et Kishimoto Masashi 岸本.

Enfin, je voudrais également souhaiter bonne continuation à celles et à ceux qui poursuivent leurs efforts pour un jour présenter leur mémoire de thèse.

PS : Si tu te reconnais, je te remercierai quand j'aurai MON Paris-brest...à bon lecteur, salut !

Mataerc ertam enis melorp

LISTE
DES TRAVAUX

Publications relatives au travail présenté

Activation of the Adenosine-A3 Receptor Stimulates Matrix Metalloproteinase-9 Secretion by Macrophages.

Velot E., Haas B., Léonard F., Ernens I., Rolland-Turner M., Schwartz C., Longrois D., Devaux Y., Wagner D.R. *Cardiovasc Research* 2008; Aug 10 [Epub ahead of print]

Adenosine Inhibits Matrix Metalloproteinase-9 Secretion by Neutrophils: Implication of A2a Receptor and cAMP/PKA/Ca²⁺ Pathway.

Ernens I., Rouy D., Velot E., Devaux Y., Wagner D.R. *Circulation Research* 2006; 99 : 590-597

Publication non présentée dans ce mémoire

Vascular Endothelial Growth Factor and the Soluble Form of its Receptor VEGF Receptor-1 Contribute to the Pro-Angiogenic Properties of Adenosine.

Ernens I., Léonard F., Vausort M., Velot E., Rolland-Turner M., Chan T., Feldman A.M., Devaux Y., Wagner D.R. *Manuscrit en préparation*

Communications orales

Adenosine promotes angiogenic switch in human macrophages.

Ernens I., Velot E., Vausort M., Devaux Y., Wagner D.R.
American Heart Association, Orlando, Novembre 2007.

Adenosine switches macrophage from a pro-inflammatory to an angiogenic phenotype.

Ernens I., Velot E., Vausort M., Devaux Y., Wagner D.R.
European Council for Cardiovascular research, Nice, Octobre 2007.

Posters

Adenosine increases VEGF and decreases soluble VEGF receptor-1 production by macrophages.

Vausort M., Ernens I., Velot E., Léonard F., Rolland-Turner M., Devaux Y., Wagner D.R.
European Society of Cardiology Congress, München, Septembre 2008.

Activation of the adenosine-A3 receptor facilitates monocytes/macrophages migration through enhanced Matrix Metalloproteinase-9 Secretion.

Velot E., Haas B., Ernens I., Longrois D., Devaux Y., Wagner D.R.
European Society of Cardiology – Heart Failure Congress, Milan, Juin 2008.

Adenosine enhances matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages.

Velot E., Ernens I., Haas B., Jeanty C., Longrois D., Devaux Y., Wagner D.R.
Journées Claude Huriet de la Recherche Médicale, Nancy, Novembre 2007.

The A3 adenosine receptor mediates enhancement of matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages.

Velot E., Ernens I., Haas B., Jeanty C., Longrois D., Devaux Y., Wagner D.R.
European Council for Cardiovascular Research, Nice, Octobre 2007.

Adenosine stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by THP-1-derived macrophages.

Velot E., Ernens I., Haas B., Jeanty C., Longrois D., Devaux Y., Wagner D.R.
European Society of Cardiology – Heart Failure Congress, Hambourg, Juin 2007.

Adenosine switches macrophages from a pro-inflammatory to an angiogenic phenotype.

Ernens I., Velot E., Vausort M., Devaux Y., Wagner D.R.
European Society of Cardiology – Heart Failure Congress, Hambourg, Juin 2007.

LISTE DES

ABREVIATIONS

A1AR	récepteur à l'adénosine A1
A2aAR	récepteur à l'adénosine A2a
A2bAR	récepteur à l'adénosine A2b
A3AR	récepteur à l'adénosine A3
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
ADA	adénosine déaminase
Ado	adénosine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AMISTAD	Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine
AMP	adénosine monophosphate
AngII	angiotensine II
AP-1	activator protein-1
APC	allophycocyanine
APC-Cy7	allophycocyanine-cyanine 7
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BNP	brain natriuretic peptide
BSA	albumine sérique bovine
cAMP	adénosine monophosphate cyclique
CCR2	récepteur aux chimiokines 2
CD	Cluster of Differentiation
CGS 21680	2-p-(2-Carboxyéthyl)phénéthylamino-5-N-éthylcarboxamidoadénosine
CO ₂	dioxyde de carbone
CPA	N6-cyclopentyladénosine
CPK-MB	isoenzyme MB de la créatine phosphokinase
CREB	cAMP response element binding protein
CRP	protéine C-réactive
DAG	diacylglycerol
DIP	dipyridamole
DLA	diphosphoryl lipide A
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DNase	désoxyribonucléase

DO	densité optique
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine
EDTA	acide éthylène-diamine-tétraacétique
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EHNA	érythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl) adénine hydrochloride
ENT	équilibrative nucleoside transporters
FE	fraction d'éjection
FITC	fluorescéine isothiocyanate
fMLP	N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
FT	facteur de transcription
GAG	glycosaminoglycane
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GPCR	récepteurs couplés aux protéines G
GRK	protéine kinase des récepteurs couplés aux protéines G
H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HA	acide hyaluronique
HS	héparanes sulfates
HTA	hypertension artérielle
IB-MECA	1-Déoxy-1-[6-[[[(3-Iodophényl)méthyl]amino]-9H-purin-9-yl]-N-méthyl-β-D-ribofuranuronamide
IC	insuffisance cardiaque
IM	infarctus du myocarde
IEC	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IL	interleukine
Ino	inosine
IP3	inositol 1,4,5-trisphosphate
ITU	iodotubéricidine
IVA	inter ventriculaire antérieure
JAK-STAT	Janus kinase-signal transducers and activators of transcription
LBP	LPS Binding Protein
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MD2	myeloid differentiation-2

MEC	matrice extracellulaire
MLA	monophosphoryl lipide A
MMP	métalloprotéinase matricielle
MRS 1754	8-[4-[[[(4-Cyanophényl)carbamoylméthyl]oxy]phényl]-1,3-di(n-propyl)xanthine
MT-MMP	métalloprotéinase matricielle de type membranaire
NECA	5-(N-éthylcarboxamido)adénosine
NF-kB	nuclear factor-kB
NO	monoxyde d'azote
NT-proBNP	N terminal-pro brain natriuretic peptide
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPN	ostéopontine
PBMC	cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	tampon salin phosphate
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PEA-3	polyoma enhancer A binding protein-3
PG	protéoglycane
PI	iodure de propidium
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PK	protein kinase
PL	phospholipase
PMA	phorbol myristate acétate
PREMIER	Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling
PSB 10	8-éthyl-1,4,7,8-tétrahydro-4-méthyl-2-(2,3,5-trichlorophényl)-5H-imidazo[2,1-i]purin-5-one monohydrochloride
qPCR	PCR quantitative
RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs
RGD	arginine-glycine-acide aspartique
RhoA	Ras homolog gene family member A
RNase	ribonucléase
SAH	S-Adenosyl Homocysteine
SCH 58261	7-(2-phényléthyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine

SD	standard deviation
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEM	standard error of the mean
siARN	petit acide ribonucléique interférent
SRAA	système rénine angiotensine aldostérone
STAT	signal transducers and activators of transcription
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TGF	facteur de croissance transformant
TIEs	TGF inhibitory elements
TIMPs	inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases
TLR4	Toll-like Receptor 4
T _m	température de fusion
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
TSP-2	thrombospondine-2
VEGF	vascular endothelial growth factor

TABLE
DES MATIERES

REMERCIEMENTS**LISTE DES TRAVAUX****LISTE DES ABREVIATIONS****TABLE DES ILLUSTRATIONS****TABLE DES MATIERES****INTRODUCTION****ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE****CHAPITRE I :****PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES : RAPPELS GENERAUX**

1	Epidémiologie des maladies cardiovasculaires	35
2	Pathologies cardiovasculaires.....	37
2.1	Origine des maladies cardiovasculaires : l'athérosclérose	37
2.2	Conséquences cliniques de l'athérosclérose.....	39
2.2.1	L'ischémie myocardique ou insuffisance coronarienne	39
2.2.2	L'infarctus du myocarde.....	40
2.2.3	L'insuffisance cardiaque post-infarctus.....	45
3	Les biomarqueurs : outils diagnostiques des pathologies cardiovasculaires	48
3.1	Les biomarqueurs : définition.....	48
3.2	Les biomarqueurs des maladies cardiovasculaires	49
3.2.1	Inflammation.....	50
3.2.2	Agression cardiomyocytaire	51
3.2.3	Médiateurs hormonaux	52
4	Synthèse	53

CHAPITRE II :
LES METALLOPROTEINASES MATRICIELLES MYOCARDIQUES

1	Les métalloprotéinases matricielles : généralités	55
1.1	Le rôle des métalloprotéinases matricielles.....	56
1.2	Structures et activation des métalloprotéinases matricielles	57
1.2.1	Structures générale	57
1.2.2	Mécanisme d'activation des métalloprotéinases matricielles.....	59
1.3	Les métalloprotéinases matricielles dans le tissu myocardique	60
2	Modulation de l'activité des métalloprotéinases et remodelage matriciel.....	61
2.1	Régulation transcriptionnelle.....	61
2.1.1	Les différents types de promoteurs des MMPs.....	61
2.1.2	Principaux éléments régulateurs de la transcription.....	64
2.2	Régulation post-traductionnelle	66
2.3	Les inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles.....	68
2.3.1	Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases.....	68
2.3.2	D'autres inhibiteurs naturels des MMPs	69
3	La balance MMPs/TIMPs dans le remodelage matriciel	70
4	La MMP-9 : un rôle prépondérant dans le cœur.....	71
5	Synthèse	73

CHAPITRE III :
LE PROCESSUS DE REMODELAGE MYOCARDIQUE APRES INFARCTUS DU MYOCARDE

1	Le remodelage myocardique post infarctus	74
2	Composition du tissu myocardique : cellules et matrice extracellulaire	76
3	Vagues cellulaires après infarctus du myocarde : les différentes phases conduisant au remodelage myocardique et à l'insuffisance cardiaque.....	79
3.1	La phase inflammatoire ou cicatrisation précoce	81
3.2	Du remodelage précoce au remodelage tardif	84
4	Evènements majeurs dans l'évolution du remodelage myocardique.....	86
4.1	Apoptose et tissu de granulation.....	86
4.2	Importance des glycosaminoglycanes dans le tissu de granulation.....	88
4.3	Voie du TLR4 et remodelage myocardique	88

5	Synthèse	91
---	----------------	----

CHAPITRE IV :

L'ADENOSINE, MODULATEUR DE LA REACTION MYOCARDIQUE

1	Métabolisme de l'adénosine et ses principaux effets biologiques.....	92
1.1	Métabolisme de l'adénosine	92
1.2	Evaluation de la concentration d'adénosine	95
1.3	Les principaux effets biologiques de l'adénosine.....	96
1.4	Adénosine : sources, effets vasculaires et cardioprotection	97
2	Les récepteurs à l'adénosine	100
2.1	Généralités.....	101
2.2	Le récepteur à l'adénosine A1	105
2.3	Le récepteur à l'adénosine A2a	106
2.4	Le récepteur à l'adénosine A2b	107
2.5	Le récepteur à l'adénosine A3	108
3	Synthèse	110

MATERIELS ET METHODES

1	Culture cellulaire	113
1.1	Lignée promonocytaire THP-1	114
1.1.1	Mise en culture.....	114
1.1.2	Manipulations effectuées sur les cellules THP-1	114
1.2	Isolement et traitements des neutrophiles primaires humains	116
1.2.1	Purification des neutrophiles primaires humains	116
1.2.2	Traitements des neutrophiles primaires humains.....	117
1.3	Isolation de monocytes et culture de macrophages humains.....	118
1.3.1	Prélèvements sanguins.....	118
1.3.2	Purification des monocytes.....	118
1.3.3	Culture et traitements des macrophages primaires humains.....	120
2	Étude de l'expression des transcrits d'intérêt.....	121
2.1	Extraction des ARN totaux.....	121
2.1.1	A partir de sang total	121

2.1.2	A partir des cellules cultivées <i>in vitro</i>	122
2.2	Rétrotranscription des ARN totaux.....	124
2.3	PCR quantitative en temps réel.....	124
2.3.1	Choix des amorces	124
2.3.2	Principe de la réaction de PCR quantitative	125
3	Biochimie des protéines	128
3.1	Zymographie.....	128
3.2	Dosage immuno-enzymatique de TIMP-1 et MMP-9	129
4	Cytométrie en flux	130
4.1	Marquage immunofluorescent	130
4.1.1	Mesure de l'expression des récepteurs TLR4 et CD14.....	130
4.1.2	Mesure de l'expression des récepteurs CCR2	131
4.2	Détection de l'apoptose.....	131
4.2.1	Externalisation des phosphatidylsérines.....	132
4.2.2	Cycle cellulaire et isolation de la phase sub-G1	133
5	Analyse statistique	135

RESULTATS

CHAPITRE I :

ETUDE DES EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LA PRODUCTION DE MMP-9 PAR LES NEUTROPHILES

1	Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les neutrophiles	137
1.1	Effet de la concentration d'adénosine sur les neutrophiles	137
1.2	Effet de l'adénosine endogène sur la production de MMP-9	140
1.3	Conclusion.....	142
2	Implication des récepteurs à l'adénosine dans la modulation de la sécrétion de la MMP-9	142
2.1	Approche pharmacologique.....	142
2.2	Approche moléculaire	145
2.3	Conclusion.....	147

CHAPITRE II :
ETUDE DES EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LA PRODUCTION DE MMP-9 PAR
LES MACROPHAGES

1	Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages de la lignée cellulaire THP-1	148
1.1	Effet de la concentration d'adénosine sur les macrophages THP-1	148
1.2	Effet de l'adénosine endogène sur la production de MMP-9	151
1.3	Production de MMP-9 au cours de la différenciation	152
1.4	Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 lors d'une différenciation des monocytes et macrophages de 48 heures	155
1.5	Effet l'adénosine sur certains inhibiteurs de la MMP-9.....	156
1.6	Conclusion.....	159
2	Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages primaires humains.....	159
2.1	Production basale de MMP-9 par les cellules du sang total.....	159
2.2	Effet de l'adénosine sur monocytes primaires humains différenciés en macrophages.....	161
2.3	Conclusion.....	163

CHAPITRE III :
ETUDE DES EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LA PRODUCTION DE MMP-9 PAR
LES MACROPHAGES STIMULES

1	Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages stimulés par le LPS... ..	164
1.1	Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages THP-1 stimulés par le LPS	164
1.2	Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages primaires humains stimulés par le LPS	168
1.3	Modulation du système de reconnaissance du LPS par l'adénosine.....	169
1.4	Conclusion.....	172
2	Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages stimulés par d'autres types de stimuli	173
2.1	Autres méthodes de stimulation des macrophages THP-1	173

2.2	Stimulation des macrophages THP-1 par divers ligands du TLR4	175
2.3	Conclusion.....	176

CHAPITRE IV :

IMPLICATION DES RECEPTEURS A L'ADENOSINE DANS LA PRODUCTION DE LA MMP-9 PAR LES MACROPHAGES

1	Expression basale des récepteurs à adénosine.....	177
2	Approche pharmacologique	179
3	Approche moléculaire	181
4	Conclusion.....	183

CHAPITRE V :

MONOCYTES ET TISSU DE GRANULATION

1	Effet de l'adénosine sur la migration monocyttaire.....	184
1.1	Effet de l'adénosine sur le récepteur aux chimiokines CCR2	184
1.2	Effet de l'adénosine sur la migration des monocytes	187
1.3	Conclusion.....	189
2	Effet de l'adénosine sur l'apoptose des monocytes primaires humains : études préliminaires.....	189
2.1	Marquage annexine V – iodure de propidium.....	189
2.2	Détection de la phase sub-G1 du cycle cellulaire	192
2.3	Conclusion.....	194

DISCUSSION

CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXES

TABLE DES
ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Initiation et progression de l'athérosclérose	38
Figure 2 : Comparaison entre un cœur normal et un cœur insuffisant	46
Figure 3 : Structures générales des MMPs	58
Figure 4 : Principaux éléments de réponse aux facteurs de transcription se fixant sur le promoteur des différents types de MMPs	63
Figure 5 : Modèle d'interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire dans le cœur	78
Figure 6 : Etapes du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus conduisant au développement d'une insuffisance cardiaque	81
Figure 7 : Représentation des principales voies de l'apoptose	87
Figure 8 : Schéma du système de reconnaissance du LPS et des lipides A.....	90
Figure 9 : Formule topologique de la molécule d'adénosine.....	92
Figure 10 : Synthèse et métabolisme de l'adénosine dans le cœur	93
Figure 11 : Exemple de voies d'inhibition du transport et de la métabolisation de l'adénosine.	94
Figure 12 : Voies principales d'activation des récepteurs à l'adénosine.....	103
Figure 13 : Désensibilisation et internalisation des récepteurs couplés aux protéines G.....	104
Figure 14 : L'adénosine diminue la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles stimulés par la fMLP.....	139
Figure 15 : L'adénosine diminue la production de MMP-9 par les neutrophiles traités par différents stimuli.	140
Figure 16 : Les modulateurs du métabolisme et du transport de l'adénosine, ainsi que l'agoniste NECA, diminuent la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles stimulés par la fMLP.	141
Figure 17 : Protocole des traitements avec agonistes (A) et antagonistes (B) sur les neutrophiles stimulés par la fMLP.	142
Figure 18 : L'agoniste du récepteur à l'adénosine A2a diminue la production de MMP-9 par les neutrophiles stimulés par la fMLP.	143
Figure 19 : L'antagoniste du récepteur à l'adénosine A2a augmente la production de MMP-9 par les neutrophiles stimulés par la fMLP.	144
Figure 20 : Le siARN A2a diminue l'augmentation de la production de MMP-9 induite par l'adénosine chez les neutrophiles.	146
Figure 21 : L'adénosine augmente de façon concentration-dépendante la production de MMP-9 par les macrophages THP-1.	150

Figure 22 : La production de MMP-9 par les macrophages THP-1 est augmentée par l'adénosine exogène aussi bien qu'endogène.	152
Figure 23 : L'adénosine augmente la sécrétion de MMP-9 par les THP-1 en cours de différenciation en macrophages.	153
Figure 24 : L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm MMP-9 par les THP-1 en cours de différenciation en macrophages.....	154
Figure 25 : L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm et de la protéine MMP-9 par les macrophages THP-1.	156
Figure 26 : L'adénosine augmente la production de TIMP-1 par les macrophages THP-1...	157
Figure 27 : L'adénosine ne modifie pas la quantité de transcrits RECK par les macrophages THP-1.	158
Figure 28 : L'ARNm MMP-9 est plus fortement exprimé chez les patients atteints d'infarctus du myocarde que chez les volontaires sains.	160
Figure 29 : L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm et de la protéine MMP-9 par les macrophages primaires humains issus de volontaires sains.	161
Figure 30 : L'adénosine augmente la sécrétion de la MMP-9 par les macrophages primaires humains issus de patients atteints d'infarctus du myocarde.	162
Figure 31 : Le LPS et l'adénosine augmentent l'expression de l'ARNm MMP-9 par les macrophages THP-1.	165
Figure 32 : Le LPS et l'adénosine augmentent la sécrétion de MMP-9 par les macrophages THP-1.	167
Figure 33 : L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm MMP-9 par les macrophages primaires humains stimulés ou non par le LPS.....	168
Figure 34 : L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm MD-2 dans les macrophages THP-1.	170
Figure 35 : L'adénosine augmente l'expression de la protéine CD14 membranaire par les macrophages THP-1 stimulés par le LPS.	171
Figure 36 : L'adénosine augmente la production de MMP-9 par les macrophages THP-1 en hypoxie.	174
Figure 37 : L'adénosine associée à l'acide hyaluronique augmente la production de MMP-9 par les macrophages THP-1.....	175
Figure 38 : L'adénosine augmente l'expression des ARNm codant pour les récepteurs à l'adénosine A2b et A3 par les macrophages THP-1.	178

Figure 39 : L'agoniste du récepteur à l'adénosine A3 augmente la production de MMP-9 par les macrophages THP-1.....	180
Figure 40 : Le siARN A3 inhibe l'effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages THP-1.....	182
Figure 41 : L'adénosine augmente la quantité de transcrits codant pour CCR2 par les monocytes et diminue par les macrophages.....	185
Figure 42 : L'adénosine diminue l'expression membranaire de CCR2 par les macrophages primaires humains.	186
Figure 43 : L'adénosine augmente la capacité migratoire des monocytes THP-1.....	188
Figure 44 : L'adénosine diminue le phénomène d'apoptose sur les monocytes primaires. ...	191
Figure 45 : L'adénosine empêche l'apparition du pic sub-G1 chez les monocytes primaires.	193
Tableau 1 : Métalloprotéinases identifiées dans le tissu myocardique.....	60
Tableau 2 : Classification, localisation et propriétés des récepteurs à l'adénosine	100
Tableau 3 : Liste des amorces utilisées en PCR quantitative.....	127

INTRODUCTION

Les maladies cardiovasculaires représentent la cause majeure de mortalité dans les pays industrialisés. Parmi celles-ci, l'insuffisance cardiaque consécutive à l'infarctus tient une place privilégiée. L'infarctus du myocarde a pour conséquence immédiate une adaptation du cœur qui doit pallier un déficit contractile. Dans un premier temps le cœur se dilate, ce qui lui permet de s'adapter aux nouvelles conditions hémodynamiques. Pour que cette dilatation soit stable et fonctionnelle, la structure du muscle même se modifie, en particulier sa composante matricielle qui se dégrade et se réorganise, ce mécanisme est appelé remodelage. Le remodelage est un équilibre approprié entre synthèse et dégradation de la matrice. Il est nécessaire pour une morphogénèse normale et le maintien du tissu cicatriciel. Le remodelage est donc tout d'abord un phénomène adaptatif souhaitable. A l'inverse, si ce phénomène s'amplifie ou se dérègle, il devient pathologique et peut engendrer un défaut de contraction et/ou un mauvais remplissage des cavités cardiaques et ainsi conduire à l'insuffisance cardiaque, aboutissement de nombreuses pathologies du cœur ^{1,2}.

Le remodelage est régi en partie par l'activité des métallo-protéinases matricielles (MMPs) sécrétées dans l'espace extracellulaire par les cardiomyocytes ou des cellules non-myocytaires qui constituent le tissu de granulation, telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires ^{3,4}. Chaque membre de cette famille d'enzymes, et en particulier la MMP-9, sont capables de dégrader certains composants de la matrice extracellulaire et sont donc des facteurs importants de la réponse du cœur à un infarctus. Leur régulation se fait au niveau de la transcription des gènes, de l'activation de la forme zymogène, et de l'inhibition par interaction avec les inhibiteurs tissulaires des MMPs (les TIMPs). Très tôt après un infarctus du myocarde (de un à deux jours), la zone lésée du myocarde est envahie par une population de polynucléaires neutrophiles qui sécrète en masse de la MMP-9, ce qui contribue à une dégradation excessive de la MEC cardiaque et un remodelage myocardique inadapté. Puis, deux à quatre jours après infarctus, une seconde population de cellules inflammatoires, les monocytes-macrophages infiltrent la zone infarctée et produisent également de la MMP-9. Il a été démontré que la surproduction de MMP-9 est un facteur de risque cardiovasculaire et un biomarqueur du remodelage du ventricule gauche ⁵⁻⁷. Des études effectuées au sein de notre laboratoire ont précédemment montré que la MMP-9 est un biomarqueur de la survenue de l'insuffisance cardiaque post-infarctus ⁸. La MMP-9 fait donc partie des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de l'insuffisance cardiaque consécutif à un remodelage myocardique délétère.

Des études ont montré que la production d'adénosine est accrue lors d'une hypoxie, d'une ischémie, d'un stress ou encore d'une inflammation⁹⁻¹¹. Suite à cette augmentation, il a été observé une atténuation de ces conditions pathologiques, suggérant ainsi un effet protecteur de l'adénosine sur le système cardiovasculaire^{12, 13}. L'adénosine peut se fixer sur quatre types de récepteurs transmembranaires : A1, A2a, A2b et A3. Les effets cardioprotecteurs de l'adénosine font de ses récepteurs de nouvelles cibles thérapeutiques des maladies cardiovasculaires¹⁴. Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés à des protéines G (G-Protein Coupled Receptors, GPCR). Comportant 7 domaines transmembranaires, ils sont bien caractérisés. Chaque récepteur a sa spécificité cellulaire et active des voies de signalisation différentes¹⁵. Dans tous les cas, les voies finales d'activation sont classiques (MAPK, NF- κ B, CREB), mais les conséquences intracellulaires peuvent varier avec les types de cellules, leur degré d'activation, ou encore l'environnement.

Après un infarctus du myocarde, les cellules nécrosées à cause de l'ischémie sont éliminées par phagocytose de la part des monocytes/macrophages infiltrés¹⁶. Ces cellules entrent en apoptose après la phase aiguë de l'infarctus et il en est de même pour une partie des cardiomyocytes lors d'insuffisance cardiaque chronique. L'apoptose est un suicide cellulaire ou une mort programmée par la cellule elle-même. Elle permet l'homéostasie d'un tissu par l'élimination de cellules défectueuses, ou encore la résolution du phénomène d'inflammation par l'élimination de cellules immunitaires qui ont accompli leur rôle, assurant ainsi un retour à la normale¹⁷. Des études ont montré que l'inhibition de l'apoptose permettrait une amélioration du remodelage ventriculaire gauche après infarctus¹⁸⁻²⁰.

Notre projet s'inclue dans la thématique générale du laboratoire, qui est de développer un programme de recherche sur l'insuffisance cardiaque et ses mécanismes cellulaires et moléculaires, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les traitements de l'infarctus du myocarde et de l'insuffisance cardiaque. Il vise à caractériser les mécanismes responsables des effets cardioprotecteurs de l'adénosine, qui sont connus dans des phénomènes tels que l'ischémie, l'infarctus du myocarde, et l'insuffisance cardiaque, mais peu définis. En effet, malgré l'utilisation de modèles animaux transgéniques et la réalisation de plusieurs études cliniques, les effets cardioprotecteurs de l'adénosine sur le remodelage après infarctus restent mal caractérisés¹⁵. Ceci est lié en partie au fait que l'étude des effets de l'adénosine est complexe à cause : (1) des différents types de récepteurs à l'adénosine

potentiellement impliqués, (2) d'importantes différences entre la pharmacologie des récepteurs à l'adénosine humains et ceux des rongeurs, (3) de la spécificité relative de nombreux agonistes et antagonistes à l'adénosine, (4) de l'importance de la notion de fenêtre thérapeutique.

Nous avons émis l'hypothèse que l'un des effets cardioprotecteur de l'adénosine pourrait passer par une modulation de l'activité de la MMP-9. Nous nous sommes intéressés à caractériser les effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les neutrophiles et les macrophages, et sur l'apoptose des monocytes.

ORGANISATION DU MANUSCRIT

Ce manuscrit est composé de cinq parties. La première présente une revue de la littérature concernant (1) un rappel sur les pathologies cardiovasculaires, (2) les métalloprotéinases matricielles myocardiques, (3) le remodelage myocardique après infarctus et (4) l'adénosine, comme modulateur de la réaction myocardique. La deuxième partie décrit les protocoles expérimentaux ainsi que les techniques de biochimie, de biologie moléculaire et cellulaire utilisées. L'exposé des résultats sous forme de cinq chapitres constitue la troisième partie de ce mémoire. L'ensemble des résultats est discuté dans une quatrième partie. Les conclusions et les perspectives de ce travail sont énoncées dans la dernière partie.

Ce travail a été effectué au sein du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire dirigé par le Docteur Daniel Wagner, au Centre de Recherche Public-Santé (CRP-Santé) à Luxembourg, sous la direction du Docteur Yvan Devaux (CRP-Santé) et du Professeur Dan Longrois (Université Henri Poincaré, Nancy-Université).

Ce travail a été soutenu financièrement par une Bourse Formation-Recherche (BFR) attribuée pour une durée de 3 ans par le Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MCESR) du Luxembourg.

ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

PATHOLOGIES CARDIOVASCULAIRES :

RAPPELS GENERAUX

1 Epidémiologie des maladies cardiovasculaires

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) évalue à environ un tiers (soit 17 millions de personnes) les décès dans le monde causés par les maladies cardiovasculaires et en 2020, elles deviendront à la fois les premières causes d'invalidité et de mortalité dans le monde ^{21, 22}. Ces estimations croissantes sont dues aux proportions épidémiques que prennent ces maladies, qui contrairement aux idées-reçues ne concernent pas seulement les populations âgées des pays développés, mais qui au contraire touchent aussi près de 80 % des hommes, femmes et enfants des pays en voie de développement ²³.

Les risques de développer une maladie cardiovasculaire sont plus importants chez la femme que chez l'homme, en particulier à cause du manque de prévention ^{24, 25}, et augmentent avec l'âge ²⁶⁻²⁸. De plus, le taux grandissant de ces maladies est dû à des facteurs de risques que l'étude des populations a permis de mettre en exergue.

Certains sont liés à l'hérédité ²⁹ ou à des maladies congénitales ^{30, 31}, d'autres sont considérés comme modifiables car influencés par l'hygiène de vie (tabagisme, sédentarisation, régime alimentaire inadapté...) ou une condition pathologique (hypertension, obésité, hypercholestérolémie...). En effet, ces derniers peuvent se résorber suite à une amélioration des conditions de vie (pratique sportive, suppression de la consommation d'alcool...) et/ou des traitements médicamenteux adéquats de ces pathologies ³²⁻³⁴.

Parmi l'ensemble des décès dus aux maladies cardiovasculaires, la moitié est provoquée par des maladies des artères coronaires. En effet, depuis le début des années 90, les maladies coronariennes constituent la première cause de mortalité dans le monde et dans les pays développés ²². Près de 90 % des patients développant des affections des artères

coronaires ont été exposés à au moins un facteur de risque dit majeur, comprenant l'hypertension, le tabagisme, le diabète, ou l'hypercholestérolémie³⁵. Ces pathologies ont tendance à diminuer dans les régions de l'Amérique du Nord et en Europe de l'Ouest grâce à une amélioration de la prévention, du diagnostic et de leurs traitements. Cependant, les futures prévisions quant à l'augmentation des maladies coronaires sont tout de même estimées à plus de 80 % dans les pays en voie de développement, principalement à cause du vieillissement des populations^{22,36}.

Une plaque d'athérosclérose est l'étiologie dominante de la majorité des pathologies cardiovasculaires et sa rupture, générant l'occlusion thrombotique d'une artère coronaire, peut conduire dans sa forme la plus courante à un infarctus du myocarde³⁷. Les facteurs de risque de l'athérosclérose sont par ailleurs les mêmes que ceux de l'infarctus du myocarde. L'infarctus aigu du myocarde est une affection fréquente qui touche plus particulièrement l'homme à partir de 55 ans, et la femme entre 65 et 70 ans. Cette différence entre les deux sexes est due à un niveau de facteurs de risque plus élevé chez l'homme jeune que chez la femme³⁸. Cependant, l'association de neuf facteurs de risque modifiables (tabagisme, dyslipidémie, diabète, obésité, hypertension, activité physique, régime alimentaire, consommation d'alcool et facteurs psychosociaux) est liée à plus de 90 % à la survenue d'un infarctus aigu du myocarde quelque soit l'âge ou le sexe. Le tabagisme et la dyslipidémie sont à eux seuls responsables de plus des deux tiers de ces risques d'infarctus du myocarde. L'amélioration de l'hygiène de vie permet de réduire ces risques cardiovasculaires et de diminuer les risques d'IM de 80 %³². La réduction de la durée de vie consécutive à un infarctus du myocarde est estimée à 15 ans³⁹ et plus de 25 % des patients atteints d'insuffisance coronaire meurent 28 jours après leur admission à l'hôpital⁴⁰. De plus, les deux tiers des victimes d'infarctus décèdent avant leur arrivée aux urgences : la reconnaissance des signes avant-coureurs d'une attaque cardiaque est donc essentielle pour la prévention et l'amélioration de la survie dans le cas d'une insuffisance coronaire^{22,41}.

Plus de 60 % des patients ayant souffert d'un infarctus du myocarde développent un remodelage myocardique, en particulier du ventricule gauche, qui peut conduire à une insuffisance cardiaque^{40,42}. L'insuffisance cardiaque congestive est maintenant considérée comme une maladie aux proportions épidémiques^{43,44}. En 2003 au Luxembourg, 1573 patients pour 100 000 habitants sont décédés suite au développement d'une pathologie cardiovasculaire, dont 979 souffraient d'une insuffisance cardiaque congestive. En 2040, le

taux des personnes âgées de plus de 65 ans est estimé à 20 %, et l'insuffisance cardiaque congestive est devenue l'une des principales causes d'hospitalisation des patients dont l'âge est supérieur à 65 ans^{45, 46}. Avec une progression de la mortalité de 60 à 70 % à 5 ans, le pronostic de l'insuffisance cardiaque congestive est plus grave que celui de bien des cancers⁴⁷. La morbidité de l'insuffisance cardiaque congestive est donc très élevée et les enjeux en termes d'économie et de santé publique qui en découlent sont immenses^{39, 48}.

2 Pathologies cardiovasculaires

2.1 *Origine des maladies cardiovasculaires : l'athérosclérose*

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique et locale, accompagnée d'un stress oxydant et d'un dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire⁴⁹. Cette lésion anatomique est engendrée majoritairement par la rétention de lipoprotéines et de tissus fibreux formant une plaque dans la tunique interne (intima) des artères qui est recouverte par l'endothélium (**Figure 1**). C'est un processus évolutif très long qui n'est pas encore complètement élucidé, dont les complications sont nombreuses et responsables des deux premières causes de mortalité dans le monde : les accidents vasculaires cérébraux et les cardiomyopathies ischémiques dues à l'athérosclérose des artères coronaires⁴⁹.

La plaque d'athérosclérose se développe généralement sur des sites de bifurcation des artères où le flux sanguin n'est plus laminaire. La formation initiale de la lésion est progressive. (1) Elle débute par l'entrée de lipoprotéines de faible densité dans l'intima, pouvant être modifiées par oxydation ou activité enzymatique. Les lipoprotéines s'accumulent et sont phagocytées par des macrophages qui deviennent spumeux (saturés en lipides dans leur cytoplasme). L'accumulation de macrophages spumeux entraîne la formation de stries lipidiques (**Figure 1, a**). (2) Des cellules musculaires lisses provenant de la tunique intermédiaire (media) de l'artère colonisent ensuite l'intima. Elles y prolifèrent et sécrètent en masse des composants de la matrice extracellulaire comme le collagène, ce qui contribue à favoriser la rétention et l'accumulation des lipoprotéines et à augmenter la croissance de la plaque. En plus des monocytes, d'autres types de leucocytes comme les lymphocytes T colonisent la lésion et leur activation provoque un phénomène d'inflammation chronique

localisée (**Figure 1, b**). (3) Les cellules musculaires lisses forment une chape fibreuse entre l'endothélium et la plaque. En mourant, les cellules spumeuses libèrent leur contenu, ce qui entraîne la formation de corps nécrotiques et le recrutement de cellules inflammatoires. La réaction inflammatoire qui en découle peut fragiliser la plaque. En effet, l'inflammation entraîne la rupture de la chape fibreuse par dégradation de la matrice extracellulaire et mort des cellules musculaires lisses. Cette plaque non occlusive peut alors se rompre ou l'endothélium s'éroder, ce qui provoque l'entrée en contact des composés lipidiques thrombogènes avec le sang circulant, et conduit à la formation d'un thrombus dans la lumière artérielle. Si le thrombus a un diamètre important, il peut obturer l'artère et induire une ischémie pouvant causer l'apparition de pathologies comme l'infarctus du myocarde (**Figure 1, c**). (4) En revanche, si l'endothélium ne s'érode pas, que la plaque ne subit aucune rupture et qu'elle continue de croître, la lésion peut devenir occlusive et conduire aussi à une ischémie (**Figure 1, d**).

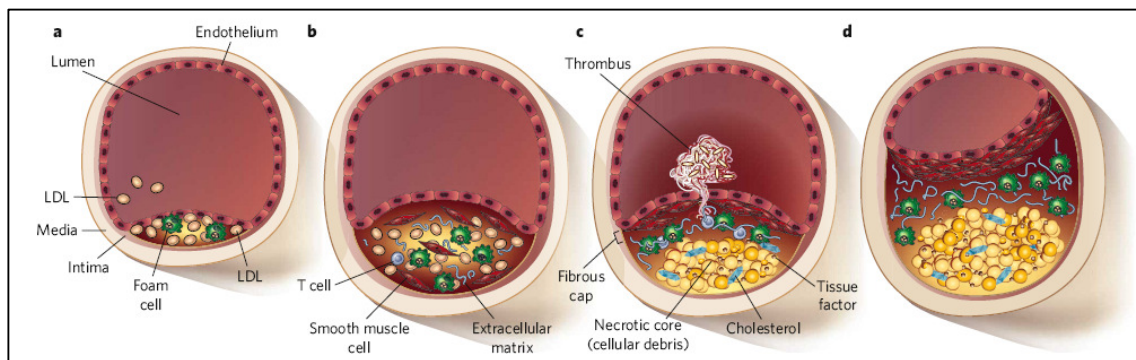


Figure 1 : Initiation et progression de l'athérosclérose

(d'après Rader et Daugherty, 2008⁴⁹).

a, formation initiale d'une lésion d'athérosclérose avec développement de stries lipidiques ; b, formation intermédiaire d'une lésion d'athérosclérose avec début d'inflammation chronique ; c, formation d'une lésion d'athérosclérose non occlusive sensible à la rupture ; d, formation d'une lésion d'athérosclérose occlusive.

2.2 Conséquences cliniques de l'athérosclérose

La fissuration d'une plaque d'athérosclérose expose l'endothélium lésé aux constituants du sang, plus particulièrement les facteurs de la coagulation. L'adhérence et l'agrégation plaquettaires, la formation de thrombine, puis de fibrine aboutissent à la constitution d'un thrombus essentiellement plaquettaire, qui accroît progressivement ou brutalement le degré de rétrécissement, pouvant aller jusqu'à l'obturation de toute la lumière coronaire⁵⁰. La cause de cette rupture est inconnue et de nombreux facteurs de risque peuvent être impliqués dans son évolution⁵¹. Par exemple, l'étude de Framingham a mis en évidence des facteurs de risque corrélés à la survenue des maladies coronariennes tels que l'âge, le sexe, l'hérédité, le cholestérol, le diabète, l'hypertension et le tabac⁵².

2.2.1 L'ischémie myocardique ou insuffisance coronarienne

L'ischémie myocardique (ou insuffisance coronarienne) est due à une réduction du diamètre des artères coronaires. Elle résulte principalement des complications de l'athérosclérose. Elle entraîne une diminution du flux sanguin dans le cœur et donc à un apport insuffisant en oxygène (hypoxie) et en nutriments, qui ne correspond plus aux besoins énergétiques de l'organe. Certaines parties du cœur, en particulier le myocarde sont plus touchées par l'ischémie. Le myocarde, ou muscle cardiaque, est une couche musculaire épaisse, où résident notamment les cellules musculaires cardiaques spécialisées appelées cardiomyocytes⁵³.

Cette rupture de l'équilibre entre besoins et apports du myocarde peut être de 2 types : la sténose (obstruction partielle) d'une artère coronaire qui peut provoquer une angine de poitrine (ou angor) se manifestant le plus souvent par une douleur thoracique réversible, ou l'occlusion complète d'une artère coronaire entraînant un infarctus du myocarde irréversible². La perturbation de la circulation sanguine est due majoritairement à l'occlusion d'une artère coronaire par un caillot (ou thrombus) constitué à l'intérieur d'une artère atteinte d'athérosclérose (dans 90 % des cas)³⁷. Tant que la sténose d'une artère coronaire est inférieure à 70 % de son diamètre, la perfusion d'aval dans les conditions basales est maintenue, grâce à un phénomène adaptatif permettant la conservation du débit coronaire

normal en diminuant la résistance artérielle par vasodilatation. Pour des sténoses supérieures à 70 %, en dépit d'une vasodilatation maximale, la résistance vasculaire augmente très rapidement et peut se traduire par une ischémie survenant pour un effort minime même au repos²⁸.

En condition physiologique, la principale source énergétique des cardiomyocytes est l'adénosine triphosphate (ATP) issue de la β -oxydation des acides gras. Cette transformation métabolique nécessite une forte consommation en oxygène. Lors d'une obstruction artérielle partielle ou totale des artères coronaires, l'ischémie provoquée entraîne une souffrance myocardique dans le tissu peu ou pas irrigué. Le manque brutal d'oxygène contraint le métabolisme myocardique normalement exclusivement aérobie, à passer en mode anaérobie par utilisation préférentielle de la voie de la glycolyse, non consommatrice d'oxygène. Cependant les stocks d'ATP diminuent et l'absence d'oxygène au niveau du myocarde entraîne l'apparition d'anomalies d'ordre biochimique (production d'ions H^+ et de lactates), électrique et hémodynamique (modification de la contractilité et de la perfusion)^{54, 55}.

Les conséquences de l'ischémie sur le myocarde sont fonction de l'importance de l'étendue et de la durée de celle-ci. Une circulation collatérale composée de petites ramifications peut se développer pour contourner l'étranglement artériel. Cependant, il existe peu de communication entre les différentes branches coronaires et chaque branche irrigue un territoire fermé. Si l'obstruction est intégrale et montre un arrêt brutal de la circulation, aucune suppléance n'est possible et l'absence de vascularisation entraîne une nécrose tissulaire⁵³.

2.2.2 L'infarctus du myocarde

2.2.2.1 La nécrose myocardique

L'infarctus du myocarde (IM) est une nécrose du tissu cardiaque consécutive à une ischémie. Dans près de 90 % des cas, les principaux mécanismes à l'origine d'un infarctus aigu du myocarde sont dus à l'occlusion d'une artère coronaire par une plaque d'athérosclérose. Cependant dans de rares cas, il survient parfois en l'absence de toute lésion

athéromateuse. En effet, il existe des infarctus à coronaires angiographiquement normales et aussi des infarctus dus à une réduction brutale de la lumière artérielle liée ou non à la vasomotricité (spasme coronarien prolongé, dissection coronarienne, anomalie congénitale des artères coronaires, traumatisme du thorax...) ⁵⁶.

La nécrose est un type de mort cellulaire qui marque la destruction définitive d'une partie du muscle cardiaque dans une région précise du cœur. L'IM touche plus notamment la couche myocardique du cœur, en particulier le ventricule gauche. Les cardiomyocytes, constituant majeurs de ce tissu, ne semblent pas capables de proliférer de façon significative et ne peuvent alors remplacer la perte massive de cellules qui s'avère irrévocable ^{57, 58}. L'émergence de la thérapie cellulaire avec l'utilisation des cellules souches progénitrices est une des nouvelles perspectives thérapeutiques à l'étude pour régénérer le myocarde et pallier cette déficience ⁵⁹.

La nécrose myocardique est le stade ultime de la souffrance coronarienne aiguë, les lésions sont alors définitivement établies. La suspension d'irrigation entraîne une consommation minimale d'énergie des cellules myocardiques touchées par l'artère occluse, puis leur mort au bout d'une durée moyenne de 6 heures à cause de la privation d'oxygène et d'énergie ⁶⁰. La mort cellulaire progresse des couches endocardiques vers les couches épicaudiques et du centre de la zone irriguée par l'artère occluse vers sa périphérie. Elle cause des modifications structurales majeures du tissu cardiaque telles qu'une dilatation, en particulier au niveau du ventricule gauche ⁶¹. Ce phénomène est appelé remodelage. Il explique le phénomène d'insuffisance cardiaque observé même si la taille du territoire infarci est peu importante ^{2, 62}.

2.2.2.2 La reperfusion

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'IM 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 de 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 et de préserver sa fonction en limitant le processus de remodelage⁵³.

L'ischémie entraîne une privation des apports de l'oxygène et des nutriments avec une diminution des stocks d'ATP. Les voies du métabolisme anaérobie s'activent entraînant une accumulation de molécules telles que les ions H⁺ et l'acide lactique (Li and Jackson 2002). Le calcium contenu dans le réticulum endoplasmique est relargué et sa concentration augmente au niveau intracellulaire. L'activation de protéases par le calcium associée à l'augmentation de l'acidité intracellulaire va provoquer des dommages en particulier au niveau de la membrane cellulaire. Ces dommages sont susceptibles d'être réversibles ou limités, si le flux sanguin n'est interrompu que pendant un bref instant ou si l'occlusion artérielle n'est que partielle. En revanche, ils conduisent à la nécrose et deviennent alors irréversibles si l'interruption du flux sanguin est totale et de longue durée, et en l'absence de reperfusion (Ferdinandy, Schulz et al. 2007). La reperfusion se présente donc comme la seule solution pour pallier le phénomène ischémique et préserver le maximum de tissu en limitant l'étendue de la nécrose. Cependant, des lésions des tissus peuvent aussi être observées suite à une reperfusion. En effet, le retour soudain du flux sanguin entraîne la réintroduction d'oxygène dans la zone ischémisée, ce qui va favoriser la production de radicaux libres et restaurer la production d'ATP. La concentration en calcium intracellulaire continue son augmentation provoquant un processus de nécrose accélérée responsable de la destruction des membranes cellulaires couplée à des dysfonctionnements mitochondriaux. De plus, des mécanismes d'apoptose semblent aussi s'activer, toutefois la démonstration de leur implication est peu claire (Ferdinandy, Schulz et al. 2007). Les cellules inflammatoires sont également recrutées en masse pendant la reperfusion, en particulier les neutrophiles qui migrent par chimiotactisme entre les cellules endothéliales dans le tissu reperfusé et participent aux dommages membranaires par la production d'élastase, de protéases et de radicaux libres.

Les deux principales méthodes de reperfusion coronaire sont la thrombolyse et l'angioplastie dite primaire. La thrombolyse est une injection de médicaments par voie veineuse entraînant une lyse du thrombus (elle peut aussi être effectuée spontanément dans l'organisme par des agents antithrombotiques naturels) et l'angioplastie est une technique

chirurgicale permettant de dilater l'artère à l'endroit du rétrécissement. Le choix de la méthode à employer dépend des antécédents du patient (contre-indications), du temps de l'admission post-IM et de la disponibilité du traitement. Ces méthodes peuvent néanmoins être utilisées en parallèle. La thrombolyse a un effet bénéfique dans la reperfusion précoce après infarctus. Cependant elle ne traite pas la rupture de plaque mais uniquement la thrombose coronaire contrairement à l'angioplastie primaire. Bien qu'elle réduise l'augmentation de taille du ventricule gauche, une réocclusion de l'artère est toujours possible avec subsistance du phénomène de remodelage entraînant une dilatation ventriculaire progressive^{63, 64}. Ainsi, l'angioplastie primaire associée à la thrombolyse améliore la préservation du myocarde et la survie du patient comparée à la thrombolyse seule⁶⁵. L'angioplastie est considérée comme la meilleure technique de reperfusion dans les 90 minutes qui suivent la survenue de l'IM, cependant si elle ne peut être effectuée dans ce laps de temps, la thrombolyse lui est généralement préférée^{66, 67}.

Les meilleurs résultats sont obtenus lorsque la reperfusion est effectuée au plus vite après diagnostic d'IM. En effet, la reperfusion précoce après infarctus autorise la survie des cardiomyocytes qui ont résisté à la nécrose. Cependant des études montrent que la revascularisation peut être bénéfique même tardivement (plus de 12 heures post-MI), malgré les dommages myocardiques déjà occasionnés^{68, 69}. Dans des modèles de rongeurs d'IM, la reperfusion tardive réduit la taille de l'infarctus, la dilatation du ventricule gauche et les problèmes de contractilité^{70, 71}. Dans un modèle canin, elle permet d'accélérer le processus de cicatrisation en favorisant le remplacement du tissu myocardique nécrosé par un tissu cicatriciel⁷².

2.2.2.3 L'ischémie résiduelle

Malgré une reperfusion réussie avec recanalisation de l'artère responsable de l'IM dans les meilleurs délais pour préserver au maximum le myocarde, le rétablissement de la fonction du ventricule gauche n'est souvent que partielle⁶⁶. Ce rétablissement partiel peut être dû à une ischémie résiduelle causée par le rétrécissement ou l'occlusion de l'artère déjà reperfusée ou d'autres vaisseaux coronaires qui n'ont pas été impliqués dans l'infarctus récent, mais qui prive toutefois le myocarde d'oxygène et pose donc un risque de nouvel infarctus ou de dilatation ventriculaire⁶⁹.

Pour pallier cette ischémie résiduelle, une procédure de revascularisation différée peut être effectuée de 12 à 24 heures, voire même plusieurs semaines après une première reperfusion et conserver des effets bénéfiques en améliorant la fonction ventriculaire et en réduisant la dilatation myocardique⁷³. Les causes de dysfonction de la microcirculation coronaire peuvent être d'autres caillots causés par la rupture de la plaque, l'aggrégation plaquettaire ou les dommages de la reperfusion. Elles contribuent aussi au processus de remodelage ventriculaire. Dans un modèle d'IM canin avec reperfusion précoce, l'étendue de l'obstruction microvasculaire est liée à la déformation et au dysfonctionnement des zones bordantes de l'infarctus⁷⁴. L'amélioration de la perfusion microvasculaire post-MI améliore le pronostic vital et favorise un remodelage myocardique bénéfique chez le patient. Ces résultats suggèrent que le dysfonctionnement de la microcirculation pourrait être le lien entre la reperfusion, le remodelage et les conséquences de l'IM^{65,75}.

2.2.2.4 Notion de viabilité myocardique

La viabilité myocardique peut être décrite comme la capacité du myocarde à retrouver un rétablissement complet de ses fonctions mécaniques suite à une reperfusion post-IM. Cependant, des complications tardives peuvent apparaître après reperfusion myocardique et permettent de nuancer cette notion.

Bien que le flux sanguin soit rétabli avant que la nécrose ne soit complète, une dysfonction de la contractilité du ventricule gauche peut survenir suite à la reperfusion. Cependant, cette dysfonction est réversible et les parties non nécrosées du myocarde peuvent retrouver leur fonction contractile sans intervention supplémentaire. Toutefois cette récupération n'est pas immédiate et nécessite quelques heures ou quelques jours, le myocarde est dit sidéré (*stunning*)^{69,76}. Il faut alors plusieurs semaines pour évaluer si la fonction du ventricule gauche est préservée, ainsi que l'étendue de la nécrose myocardique⁷⁷. De plus, la réaction inflammatoire et le processus de cicatrisation occasionnés peuvent durer jusqu'à une semaine, voire même plusieurs mois après IM². Le myocarde est sidéré s'il est soumis à une ischémie sévère et aiguë. En revanche, s'il est soumis à une ischémie chronique, ses fonctions métaboliques diminuent drastiquement et de nombreuses cellules entrent en apoptose⁷⁸. Le myocarde est alors dit hibernant. La dysfonction de contractilité du ventricule gauche est alors persistante et seules les fonctions mécaniques des zones où l'activité apoptotique est faible peuvent potentiellement être rétablies grâce à une nouvelle revascularisation^{60,79}.

Diverses études montrent les effets bénéfiques de la revascularisation, même si la fonction myocardique n'est pas intégralement restituée⁸⁰. La viabilité myocardique ne se réduit donc pas uniquement aux fonctions mécaniques. De plus, les zones viables dans le myocarde, qui n'ont pas été revascularisées suite à la reperfusion, restent toujours vulnérables à l'ischémie. Ceci augmente potentiellement le risque d'apparition de problèmes cardiaques tels que le développement de l'insuffisance cardiaque qui serait réduit si le tissu était non viable⁸¹.

2.2.3 L'insuffisance cardiaque post-infarctus

L'insuffisance cardiaque (IC) se définit comme un état physiopathologique où le cœur est incapable d'assurer un débit sanguin systémique adapté à la demande métabolique (oxygène, nutriments) de l'organisme dans des conditions basales ou à l'effort.

2.2.3.1 Généralités

Dans les pays développés, l'insuffisance cardiaque est le phénotype évolutif de nombreuses pathologies cardiovasculaires : les cardiomyopathies dilatées, l'hypertension artérielle et les atteintes des valves du cœur gauche. Cependant, l'étiologie de l'IC est majoritairement liée aux maladies coronaires en cas de post-infarctus. Ce syndrome peut également être la conséquence d'une maladie du péricarde, d'une malformation cardiaque congénitale, d'un trouble du rythme ou de la conduction cardiaque. Il existe aussi des phénomènes liés à une mutation ponctuelle causant des troubles de la synthèse de protéines essentielles au bon fonctionnement des cardiomyocytes^{82,83}, cependant ils représentent moins de 1 % des cas⁸⁴.

L'insuffisance cardiaque peut être aiguë ou chronique. Le terme d'insuffisance cardiaque aiguë est employé en cas de survenue d'une IC *de novo* (chez un patient ne présentant pas de problème cardiaque au préalable) ou suite à la décompensation aiguë d'une insuffisance cardiaque chronique. L'insuffisance aiguë est généralement caractérisée par des signes de congestion pulmonaire (œdème), qui peuvent aussi être couplés à une insuffisance

cardiaque du cœur droit et un choc cardiogénique⁸⁵. L'insuffisance chronique est la forme la plus commune d'insuffisance cardiaque, qui peut être ponctuée de phases aiguës. Cependant c'est un syndrome complexe qui a déjà connu plusieurs définitions⁸⁶⁻⁸⁹.

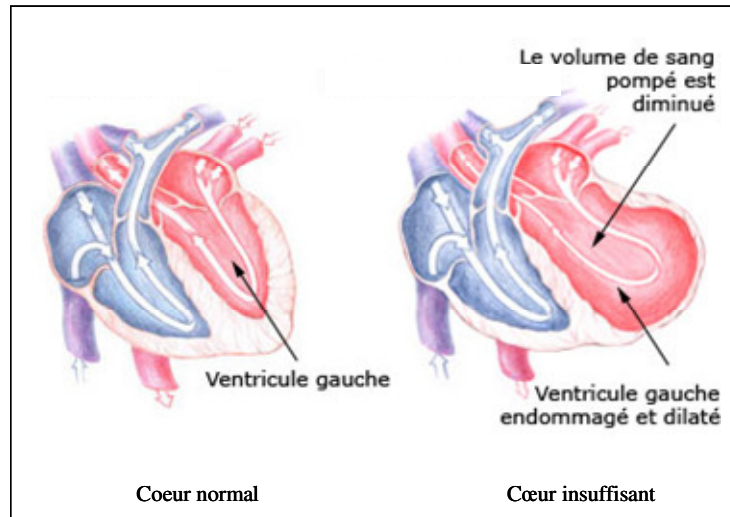


Figure 2 : Comparaison entre un cœur normal et un cœur insuffisant
(d'après www.heartfailure-europe.com).

L'insuffisance cardiaque est associée à une forte morbidité et mortalité, car elle est due à une multitude de symptômes possibles et son diagnostic est souvent réalisé tardivement après des mois voire des années d'évolution silencieuse. La progression de l'insuffisance cardiaque est généralement lente, que le facteur déclencheur soit d'origine extrinsèque ou intrinsèque (capital génétique). Dans un premier temps entrent en jeu les prémices des modifications structurales et fonctionnelles du myocarde conduisant à un remodelage délétère du ventricule gauche, puis le patient ressent les premiers signes de la pathologie⁹⁰ (**Figure 2**). Le risque d'apparition d'une insuffisance cardiaque après infarctus du myocarde est de 1 sur 5 quelque soit le sexe, et de 1 sur 9 pour l'homme et 1 sur 6 pour la femme même en l'absence d'IM⁹¹. De plus, il augmente avec le vieillissement de la population⁹². De même, un patient peut développer une IC entre 2 et 28 jours après IM⁴³. Une meilleure prise en charge des infarctus du myocarde à leur phase initiale, la prévention de l'insuffisance cardiaque et le

développement de thérapies visant à ralentir sa progression sont donc des objectifs majeurs dans la gestion des pathologies cardiaques ^{42, 62}.

2.2.3.2 Les différentes formes d'insuffisance cardiaque et leurs traitements

L'insuffisance cardiaque systolique est liée à une perte de la capacité d'éjection du sang vers les vaisseaux périphériques pour une partie ou la globalité du muscle cardiaque. L'insuffisance diastolique est définie comme une perte de capacité du cœur à se remplir normalement, bien que les patients présentent une fonction systolique préservée (avec une FE du ventricule gauche souvent supérieure à 50 % ⁹³). Elle compte actuellement pour 38 à 54 % de l'ensemble des insuffisances cardiaques cliniques ⁹⁴. Un diagnostic d'insuffisance diastolique est généralement établi après élimination d'une dysfonction systolique, car sa détection est laborieuse. Peu de recherches sont dédiées à cette forme spécifique d'insuffisance cardiaque ⁹⁵, les études sont souvent couplées avec celles de la forme systolique, qui génère plus de travaux. La déficience diastolique a pourtant tendance à augmenter depuis une quinzaine d'années ⁹⁶ et sa fréquence en cas d'hospitalisation est comparable à l'insuffisance systolique, même si son taux de mortalité est inférieur ^{97, 98}. Son pronostic est très voisin de l'insuffisance systolique avec fraction d'éjection (FE) altérée : les patients souffrant d'une complication systolique ou diastolique ont une chance de survie similaire et les traitements appliqués sont généralement les mêmes que l'insuffisance soit diastolique ou systolique.

Le diagnostic de l'insuffisance cardiaque est surtout clinique avec une identification de l'étiologie et une précision du mécanisme de la dysfonction cardiaque (systolique et/ou diastolique). La modulation des systèmes neurohormonaux peut être déterminante dans son évolution, d'où l'emploi d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) ⁹⁹, de diurétiques (spironolactone ¹⁰⁰...), ou de bêtabloquants ¹⁰¹ (inactivant les médiateurs du système adrénergique), qui suppriment les stimuli d'un remodelage délétère et présentent un effet bénéfique sur la mortalité et la morbidité des patients souffrant d'une insuffisance cardiaque. Les peptides natriurétiques se sont aussi révélés comme des cibles thérapeutiques potentielles ¹⁰² dans le traitement de l'IC, avec l'utilisation de formes recombinantes de peptide natriurétique B ou BNP (B pour brain car il a été isolé pour la première fois dans le cerveau de porc) ^{103, 104}.

Si les approches pharmacologiques se révèlent inefficaces, elles peuvent être couplées à d'autres traitements, faisant appel à la chirurgie et à l'implantation : des sondes permettant une stimulation multisite du myocarde (resynchronisation cardiaque) ^{105, 106}, des défibrillateurs automatiques pour prévenir la mort subite cardiaque ¹⁰⁷ et des systèmes d'assistance ventriculaire mécanique ¹⁰⁸. Néanmoins, ces dispositifs peuvent avoir un effet inverse à celui recherché : l'emploi de défibrillateurs automatiques implantables peut aussi conduire au développement d'une insuffisance cardiaque ¹⁰⁹. L'utilisation de ces matériaux, en fonction du type de patient, reste donc encore à être évaluée. En cas d'insuffisance cardiaque réfractaire à tous les traitements cités précédemment, la transplantation cardiaque s'avère être la dernière alternative ¹¹⁰. En dépit des progrès actuels, cette option présente toutefois des risques élevés en termes de morbidité et mortalité.

Les nombreux traitements de l'IC s'avèrent insuffisants pour remédier à sa prise de proportions épidémiques, ainsi qu'aux conséquences économiques et sociales qui en découlent, et ce, malgré la prévention face aux nombreux facteurs de risques cardiovasculaires. Les difficultés résident dans l'établissement du diagnostic de l'IC, qui s'avère fréquemment trop tardif pour pallier son développement et sa progression. D'autres approches mettant en jeu des marqueurs caractéristiques des pathologies cardiovasculaires, telles que l'IC, permettent une meilleure gestion des diagnostics et autorisent une identification précoce des patients à risque couplée à une approche thérapeutique plus adaptée dans le traitement de ces pathologies ¹¹¹.

3 Les biomarqueurs : outils diagnostiques des pathologies cardiovasculaires

3.1 *Les biomarqueurs : définition*

Les biomarqueurs sont désignés comme des paramètres biologiques mesurables et quantifiables exploités comme indices d'évaluation en physiologie, tels que le risque de développer une affection, le diagnostic d'une maladie, un processus métabolique...

La technique de mesure du biomarqueur sélectionné doit être validée et doit être une méthode simple, sensible, spécifique et reproductible, pouvant être réalisée à grande échelle.

Les biomarqueurs sont mesurés et évalués comme indicateur de processus biologiques normaux ou pathologiques. Ils permettent des évaluations précoces dans le dépistage des maladies et le suivi médical des patients, notamment comme : (1) outil diagnostique pour identifier les patients souffrant d'une anomalie biologique ; (2) outil permettant d'établir le stade d'une maladie ; (3) facteur pronostique et (4) outil de prédiction et de suivi de la réponse clinique à un traitement (les biomarqueurs permettent ainsi d'améliorer le choix de la posologie et d'évaluer les effets des médicaments). Les biomarqueurs ne sont pas obligatoirement des paramètres biologiques puisqu'il peut s'agir, par exemple, de mesures électrophysiologiques (électrocardiogramme, électroencéphalogramme) ou de techniques d'imagerie.

Les caractéristiques biologiques du biomarqueur doivent être connues : sa distribution dans la population saine ou malade, son évolution durant la maladie (physiopathologie) et sa cinétique (métabolisme).

3.2 Les biomarqueurs des maladies cardiovasculaires

De nombreux facteurs de risque ont été associés aux maladies cardiovasculaires ²⁷. Cependant de nouveaux marqueurs de risque de type biochimique sont étudiés en parallèle afin d'améliorer les outils dans la prévention et le traitement des pathologies cardiovasculaires ¹¹¹. Il existe aussi d'autres paramètres biologiques, telle que la réduction de la FE ventriculaire gauche, qui sont des marqueurs de diminution de la fonction contractile et la natrémie, impliquant une activation du système rénine angiotensine aldostérone.

Les biomarqueurs biochimiques des maladies cardiovasculaires sont multiples, ils sont essentiellement mesurés au niveau plasmatique à partir du sang périphérique. Leur prescription (choix et fréquence de dosage) couplée aux techniques d'imagerie, s'inscrit dans une démarche tenant compte du contexte clinique : aide au diagnostic, évolution d'une lésion athéromateuse (suivi après thrombolyse ou angioplastie coronarienne), remodelage myocardique... Leur détection est nécessaire dans le diagnostic et le traitement des pathologies cardiovasculaires ¹¹². Les trois principales catégories de marqueurs biochimiques des pathologies cardiovasculaires sont : des indicateurs de la réponse inflammatoire, des marqueurs de l'agression myocytaire et des médiateurs neurohormonaux. Elles correspondent

à des lésions cardiovasculaires au niveau des cardiomyocytes (nécroses, apoptose), des cellules vasculaires (dysfonction endothéliale, désendothélialisation), de la matrice extracellulaire (fibrose) et des altérations purement fonctionnelles (canaux ioniques, arythmies) ¹¹³.

3.2.1 Inflammation

Les pathologies cardiovasculaires comme l'athérosclérose entraînent le développement de réactions inflammatoires aiguës ou chroniques au niveau vasculaire. La détection des biomarqueurs de l'inflammation participant à cette réaction inflammatoire peut aider à la prévention et au diagnostic de ces maladies ¹¹³.

La protéine C-réactive (CRP) fait partie des exemples de biomarqueurs de l'inflammation vasculaire couramment utilisés en clinique ¹¹⁴. Sa concentration plasmatique augmente durant la phase aiguë de l'inflammation pouvant atteindre un maximum entre 24 et 48 heures. Elle peut diminuer en 6 heures après résolution du phénomène inflammatoire. La demi-vie de la CRP est de 20 heures et sa concentration peut facilement être estimée par dosage ultrasensible dans le plasma ou le sérum ¹¹⁵. Cette protéine est produite en majorité par les hépatocytes et son expression est principalement stimulée par la cytokine pro-inflammatoire interleukine-6 (IL-6) ¹¹⁶.

Cette protéine est mesurée dans la prédiction du risque de survenue de l'athérosclérose et ses complications parfois plusieurs mois ou années après la mesure initiale afin d'effectuer un suivi de l'individu ¹¹⁴. Les concentrations des CRP sont stables pour un même individu et suggèrent qu'en l'absence de développement d'une inflammation aiguë ou chronique, une seule mesure de CRP est suffisante pour estimer le risque cardiovasculaire ¹¹⁷. Une augmentation de la concentration supérieure à 10 mg/ml entraîne la suspicion d'une pathologie inflammatoire aiguë ou chronique et est associée au risque de développer une complication de l'athérosclérose. Des groupes à risque avec des concentrations déterminées ont été établis pour l'utilisation du dosage de la CRP dans les pratiques cliniques. Des concentrations inférieures à 1 mg/ml correspondent à des groupes à risque faible, comprises entre 1 et 3 mg/ml à un risque moyen, et supérieures à 3 mg/ml à un risque élevé ¹¹⁴. Si

l'augmentation de la CRP prédit la survenue de l'athérosclérose et de ses complications, des médicaments utilisés chez les patients à risque dans la prévention des maladies cardiovasculaires peuvent aussi la diminuer. Ainsi les statines utilisées pour baisser le taux de cholestérol des patients présentant une hypercholestérolémie et ayant développé une maladie coronaire diminuent aussi la CRP. De plus, la progression de l'athérosclérose est ralentie consécutivement à la diminution de la concentration de CRP ¹¹⁸. Des études sur des dosages de la CRP sur une période allant jusqu'à 20 ans ont montré que ce seul biomarqueur est un facteur prédictif de la survenue de l'IM, de la mortalité due aux maladies coronariennes et de l'insuffisance cardiaque ¹¹⁷. L'augmentation de la CRP fait partie des facteurs prédictifs des patients qui ont un risque élevé de développer une IC, sans avoir nécessairement d'antécédent d'IM, ce qui suggère l'implication du processus d'inflammation dans le développement et la progression de l'IC aiguë ou chronique par le biais d'un remodelage délétère du tissu myocardique ^{119, 120}.

L'inflammation est un mécanisme important dans le processus d'athérosclérose et dans le déclenchement des manifestations cliniques des maladies cardiovasculaires. Cependant, l'utilisation systématique de la mesure de la CRP comme facteur de la prédiction des maladies cardiovasculaires reste sujet à controverse et ce biomarqueur est encore à l'étude. En effet, certains experts considèrent que la mesure de la CRP n'est pas suffisante pour établir les risques de la survenue des maladies cardiovasculaires et que la prise en compte d'autres facteurs de risque est nécessaire ^{115, 121}.

3.2.2 Agression cardiomyocytaire

Lors d'un IM, les dommages tissulaires occasionnés par l'ischémie peuvent être mesurés grâce à des biomarqueurs caractéristiques de l'agression des cardiomyocytes. En effet, la nécrose entraîne l'éclatement des cellules qui libèrent leur contenu qui peut potentiellement diffuser dans la circulation sanguine. La prise en charge des patients présentant un IM a été redéfinie grâce aux dosages des troponines, qui sont devenues les marqueurs privilégiés pour mettre en évidence les dommages cellulaires au niveau du myocarde ¹²².

Les troponines sont des protéines situées dans le muscle strié squelettique et dans le myocarde, et sont impliquées dans la régulation de la contraction musculaire. Ce sont les isoformes cardiaques I et T, cardiospécifiques et très sensibles, qui interviennent dans la contraction myocardique, et dont le faible poids moléculaire leur permet d'être libérées dans le sang circulant si les cardiomyocytes perdent leur intégrité. En effet, le taux des troponines cardiaques dans le plasma est indétectable chez un individu sain. En revanche, il subit une augmentation rapide environ 4 heures après le début de la nécrose post-IM avec atteinte d'un pic de concentration à 24 heures. Cette libération de troponines peut même se prolonger jusqu'à une semaine après IM ¹²³.

Le dosage des troponines est devenu un des principaux outils diagnostiques dans la détection de l'IM ¹²⁴. En tant qu'outil pronostique, l'élévation des troponines suivant une insuffisance coronaire aiguë permet de prédire la mortalité précoce et les complications pouvant survenir tardivement jusqu'à un an ^{125, 126}. De plus le suivi postopératoire des patients par dosage des troponines permet de pallier les éventuels phénomènes d'ischémie résiduelle ¹²⁷. La présence de troponines est un biomarqueur prédictif de mortalité chez les patients souffrant d'IC aiguë décompensé ou d'IC chronique ^{128, 129}.

Bien que leur mesure soit devenue à la fois un outil diagnostique et pronostique dans les maladies cardiovasculaires, les troponines sont avant tout des biomarqueurs de l'agression des cardiomyocytes. En effet, leur concentration peut augmenter après une chirurgie cardiaque ayant occasionné des dommages tissulaires ¹³⁰. Les causes de leur augmentation sont donc toujours à déterminer avec précaution avant d'établir une conclusion.

3.2.3 Médiateurs hormonaux

Les modifications de contraintes de pression au niveau du myocarde, telle que la surcharge mécanique, sont mesurées grâce à des biomarqueurs caractéristiques du stress cardiomyocytaire comme les peptides natriurétiques qui sont des médiateurs hormonaux.

Les peptides natriurétiques sont synthétisés sous forme de précurseur (forme « pro ») principalement par les cardiomyocytes. Après leur clivage, des isoformes, en particulier le

BNP libéré par les ventricules, sont observables. Le pro-BNP est clivé par des endopeptidases en BNP et NT-proBNP (N terminal-proBNP) : ces deux peptides sont ensuite transportés dans la circulation sanguine, où seul le BNP est physiologiquement actif en se fixant sur les récepteurs de tissus cibles comme les vaisseaux, le cœur, le rein, le cerveau.... Les peptides natriurétiques sont des biomarqueurs reflétant le niveau de pression de remplissage du cœur. Ils constituent une famille de polypeptides d'origine cardiaque, ayant des effets diurétiques et natriurétiques (augmentation de l'élimination urinaire de sodium), et vasodilatateurs ¹³¹. Au niveau du myocarde, la synthèse de BNP peut être stimulée par une augmentation de la surcharge sodée et des contraintes mécaniques appliquées sur les parois du cœur. Ces contraintes provoquent un accroissement du volume extracellulaire et une distension des oreillettes et des ventricules. D'autres stimuli d'origine neurohormonale peuvent aussi être impliqués, ainsi, les peptides natriurétiques inhibent le système rénine-angiotensine-aldostérone et diminuent la pression artérielle ¹¹³.

Le BNP est éliminé par endocytose et a une demi-vie courte de 20 minutes, alors que celle du NT-proBNP est de l'ordre de 60 à 120 minutes. Les méthodes de dosage développées sont donc très rapides (moins de 15 minutes) et se font à partir du sang total de patient. Les dosages sanguins du BNP et du NTpro-BNP ont été évalués, en cas d'ischémie myocardique ^{132, 133}, et sont maintenant recommandés comme biomarqueurs dans le diagnostic de l'IC ¹³⁴ et comme outils pronostiques en tant que facteurs prédictifs de la morbidité et de la mortalité chez les patients souffrant d'IC ^{113, 135}. Cependant, leur spécificité diagnostique dans l'insuffisance cardiaque est réduite chez certains patients où il existe une variabilité entre le dosage sanguin du BNP et du NTpro-BNP ¹³⁶. De plus, le dosage du BNP varie en fonction de l'indice de masse corporelle ¹³⁷ (sa faible concentration pouvant être à l'origine de faux négatifs dans le diagnostic de décompensation cardiaque chez les insuffisants cardiaques obèses).

4 Synthèse

Les maladies cardiovasculaires ont des causes multifactorielles et certains patients ne présentent seulement qu'un seul voire aucun des facteurs de risques liés à ces maladies. Elles sont à l'origine de la majorité des décès dans le monde. En particulier le remodelage myocardique post-IM qui conduit au développement et à la progression d'une IC. Ce

processus peut être limité grâce à la reperfusion précoce ou tardive du cœur par l'emploi de traitements médicaux (thrombolyse) et/ou chirurgicaux (angioplastie primaire...). L'émergence d'outils diagnostiques et pronostiques grâce à l'étude de marqueurs caractéristiques de ces maladies est fondamentale dans le développement de nouveaux traitements, permettant ainsi l'identification précoce des patients à risque et l'adaptation de la prise en charge thérapeutique à l'échelle de la population.

Les marqueurs biologiques, essentiellement biochimiques de la dysfonction cardiaque sont de plus en plus utilisés pour le diagnostic et le suivi des patients, tels que la prédiction et le suivi de l'évolution d'une insuffisance cardiaque¹¹³ ou l'intérêt pronostique au cours de l'infarctus du myocarde¹²¹. Cependant, le dosage d'un seul biomarqueur se révèle insuffisant pour déterminer avec précision un diagnostic. L'emploi de modèles combinant plusieurs marqueurs reflétant chacun des aspects différents des pathologies cardiovasculaires, ainsi que du remodelage myocardique, est alors suggéré pour une plus grande pertinence¹³⁸. Toutefois, les résultats obtenus avec une approche multimarqueurs pour évaluer les risques cardiovasculaires se révèlent parfois équivalents à ceux obtenus en ne tenant compte que d'un seul facteur de risque classique^{111, 139}.

La recherche de nouveaux biomarqueurs est en plein essor¹¹¹. En effet, le besoin de développer de nouveaux indicateurs pronostiques permettrait une meilleure prise en charge des patients, ainsi qu'une détection plus précoce des pathologies évolutives comme l'insuffisance cardiaque. En conséquence, l'opportunité d'utiliser des techniques de biologie moléculaire (microarrays...), afin de mettre en évidence l'apparition de marqueurs précoces du remodelage myocardique délétère avant l'apparition de dommages structuraux, permettrait d'établir un dépistage des patients risquant de développer une insuffisance cardiaque, ainsi que des stratégies thérapeutiques préventives à adopter en fonction du profil du patient. A ce jour, les marqueurs cliniques utilisés sont des marqueurs indirects de la progression du remodelage cardiaque et la prédiction du risque d'évolution préjudiciable à l'échelle de l'individu reste encore indéterminée. De nouvelles cibles sont actuellement à l'étude comme les agents responsables du remodelage myocardique matriciel, tels que les métalloprotéinases matricielles.

CHAPITRE II :

LES METALLOPROTEINASES MATRICIELLES

MYOCARDIQUES

1 Les métalloprotéinases matricielles : généralités

La composition en macromolécules de la matrice extracellulaire (MEC) lui confère ses propriétés mécaniques telles que l'élasticité ou la résistance à l'étirement, qui lui permet également de se comporter comme un réservoir pour les divers produits sécrétés par les cellules qu'elle enveloppe. La MEC myocardique ou les tissus conjonctifs en général sont des structures dynamiques en constante formation et dégradation dans des conditions physiologiques normales¹⁴⁰. Dans un tissu sain, ce renouvellement reste stable. Cependant plusieurs processus biologiques, comme la migration cellulaire, la réparation tissulaire et la néovascularisation, requièrent la dégradation locale ou étendue de la MEC. Le remodelage ou remaniement de la MEC est donc un événement important dans de nombreux mécanismes physiologiques et pathologiques¹⁴¹.

La MEC étant constituée d'une grande variété de macromolécules (collagène, élastine, fibronectine, ...), les protéinases impliquées dans sa dégradation sont, elles aussi, très nombreuses. Parmi elles, la famille des métalloprotéinases matricielles (MMPs) est considérée comme étant la plus impliquée dans sa restructuration, et semble participer au phénomène de remodelage matriciel myocardique^{3, 142}. En effet, l'emploi d'inhibiteurs pharmacologiques de MMPs réduit la dilatation du ventricule gauche après IM³. Le remodelage matriciel (normal ou post-IM)¹⁴³ semble donc lié à la production et l'activation de ces protéinases par les cellules réparties au sein du tissu myocardique¹⁴⁴. Les MMPs sont donc des facteurs importants de la réponse du cœur post-IM.

1.1 Le rôle des métalloprotéinases matricielles

Les MMPs sont présentes dans tous les organismes et jouent un rôle déterminant dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en participant au remodelage de la MEC. C'est en 1962 que leur existence a été mise en évidence et que la première activité de type collagénase a été observée à pH physiologique, lors de l'étude de la maturation de la queue de têtard ¹⁴⁵. Depuis, il a été démontré que les membres de la famille des MMPs sont capables de dégrader la plupart sinon tous les constituants de la MEC (collagènes, protéoglycanes, élastine ou glycoprotéine de structure...) et que leur activité est effective à pH physiologique ¹⁴².

Cependant, l'activité de ces enzymes ne se résume pas au remaniement de la MEC. En effet, elles permettent non seulement le retrait dans les tissus de l'excès de MEC, mais aussi d'engendrer un remodelage matriciel contribuant à la régulation de diverses fonctions cellulaires et participent ainsi à la morphogénèse tissulaire et au processus de développement ¹⁴⁶. En plus de tous les composants de la MEC, les cibles des MMPs sont nombreuses et incluent d'autres protéases, des facteurs de coagulation ou de croissance, des récepteurs de surfaces, des cytokines, des chimiokines, ... et des interactions cellules-cellules ou cellules-matrice. Ainsi, l'action des MMPs sur la matrice nouvellement dégradée : (1) autorise la migration cellulaire en facilitant le passage des cellules d'un phénotype adhérent vers non adhérent ¹⁴⁷, (2) entraîne une modification du microenvironnement accompagné d'un changement du comportement cellulaire conduisant à la prolifération, à l'apoptose ou à l'organisation des cellules ¹⁴⁸, (3) module l'activité biologique de molécules actives qui ne sont pas des protéines matricielles (des facteurs de croissance, des récepteurs devenus solubles, des enzymes et leurs inhibiteurs...), par clivage direct, par relargage ou par protéolyse ¹⁴⁹.

Cet assortiment d'activités permet aux MMPs de participer à de nombreux processus physiologiques courants comme la néovascularisation, l'ossification et la cicatrisation ^{150, 151}, ou transitoires comme l'embryogenèse, le cycle menstruel et l'involution des glandes mammaires post-lactation ^{148, 151}. Ceci implique un étroit contrôle de l'expression des MMPs dans des conditions physiologiques basales. En effet, les MMPs sont communément peu exprimées dans un tissu sain, en revanche, leur production et leur activation s'élèvent rapidement lors de processus physiologiques ou pathologiques nécessitant une réparation ou

un remodelage tissulaires. En cas de dérégulation, de nombreuses pathologies comme l'arthrite rhumatoïde, des ulcères, des cancers ou encore des fibroses, peuvent se développer suite à une dégradation ou une synthèse excessive de MEC ¹⁵¹. Ainsi, la synthèse des MMPs qui augmente avec l'âge peut provoquer une dégradation excessive des tissus, tels que les artères, au cours du vieillissement ¹³⁹. Fréquemment, de fort taux de MMPs sont synonymes d'une évolution préjudiciable vers une pathologie comme par exemple une dégradation tissulaire accompagnant le développement d'ulcères chroniques, ou l'augmentation du pouvoir invasif d'un cancer en favorisant la dissémination des cellules malignes ¹⁵². Cependant, des études cliniques nuancent la relation entre la forte production de MMPs et le développement de pathologies. En effet, la diminution de l'activité des MMPs par l'emploi d'inhibiteurs pharmacologiques ne semble pas réduire la progression de l'arthrite, de la fibrose pulmonaire ou de certains cancers et peut même aller jusqu'à favoriser le développement de ces pathologies ¹⁵³. Suite à ces résultats inattendus, le développement de nouveaux inhibiteurs synthétiques plus sélectifs est actuellement en cours ¹⁵⁴.

1.2 Structures et activation des métalloprotéinases matricielles

1.2.1 Structures générale

Plus d'une vingtaine de MMPs a été identifiée jusqu'à présent chez les vertébrés. Chez l'Homme, vingt-quatre gènes codent pour les MMPs, dont le gène de la MMP-23 qui présente une duplication. Les MMPs humaines sont donc au nombre de vingt-trois. Au moins huit gènes de MMPs ont été localisés sur le chromosome 11 humain (MMP-1, -3, -7, -8, -10, -12, -13, -20), les autres gènes étant répartis parmi les chromosomes 1, 8, 12, 14, 16, 20 et 22 ⁴.

De nombreuses caractéristiques communes aux MMPs suggèrent qu'elles dérivent d'un ancêtre commun : ce sont toutes des endoprotéases à zinc (d'où le préfixe « métallo »), qui possèdent une forte homologie dans leur séquence protéique (de 40 à 80 %), ainsi que dans leurs structures. En effet, les MMPs possèdent au moins trois domaines structuraux en commun ¹⁵⁵ : (1) un prédomaine avec une séquence contenant un peptide signal permettant leur adressage ; (2) un prodomaine les maintenant sous forme inactivée ; (3) un domaine catalytique avec un site catalytique renfermant un atome de zinc associé au site actif (fixant et

clivant les substrats spécifiques et où peuvent se lier des inhibiteurs) et un atome de calcium (nécessaire à leur stabilité et impliquant une activité calcium-dépendante) (**Figure 3**).

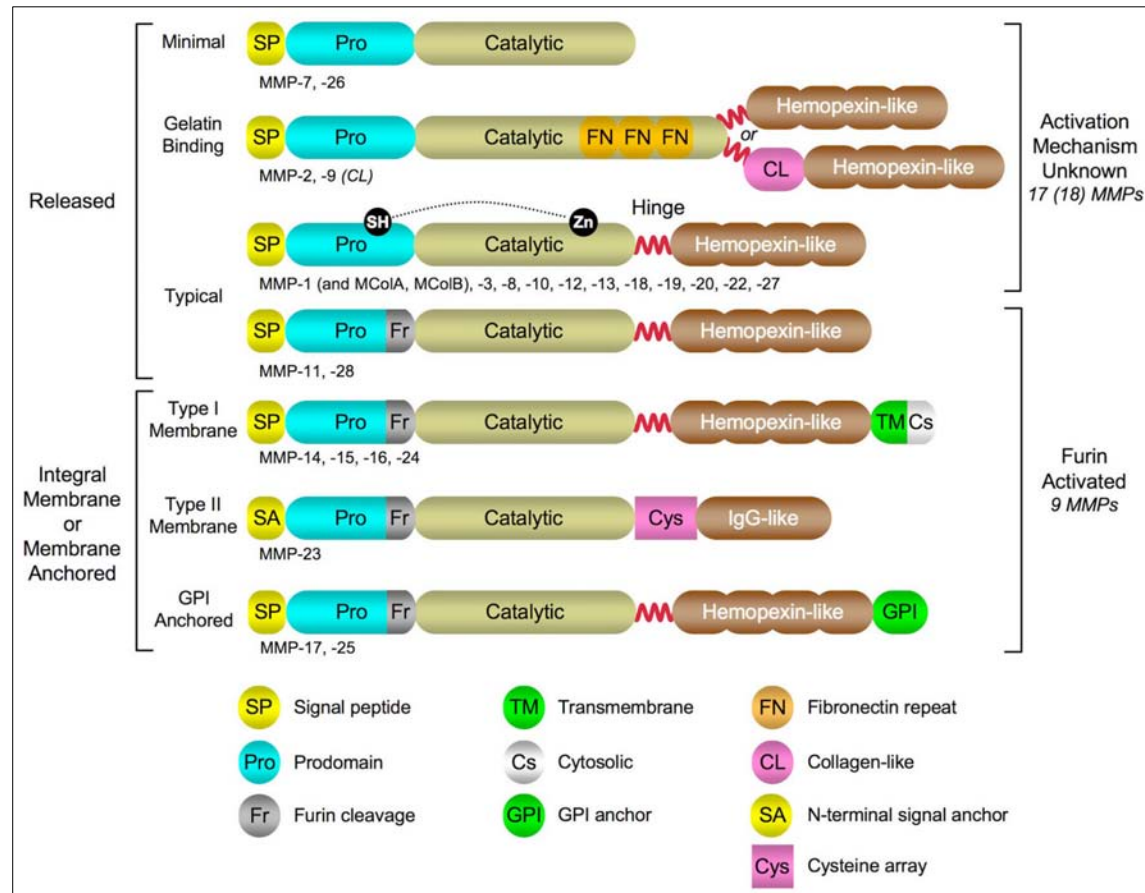


Figure 3 : Structures générales des MMPs

(d'après Fu et al. 2008¹⁵⁵).

Les MMPs sont synthétisées sous forme de pré-proenzyme afin d'être guidées jusqu'à leur lieu d'action. Le peptide signal est clivé, dès que la MMP a atteint la localisation désirée.

La plupart des MMPs possède aussi un quatrième domaine structural localisé en position C-terminale. Il présente généralement une chaîne polypeptidique hydrophobe homologue à l'hémopexine, et est fixé au domaine catalytique par une région charnière. Il est impliqué dans les interactions protéines-protéines et participe à la liaison entre les MMPs et

leurs substrats ou leurs inhibiteurs, ainsi qu'à leur localisation, leur internalisation et leur dégradation. Son rôle contribue donc aussi à la modulation de l'activité des MMPs ¹⁵⁶ (**Figure 3**).

Les MMPs sont classifiées selon leurs spécificités de substrats et de leurs caractéristiques structurales en cinq familles distinctes : collagénases, gélatinases, stromélysines, matrilysines et MMPs de type membranaire (MT-MMPs) ^{4, 155, 157, 158} (**Tableau 1** page 60).

1.2.2 Mécanisme d'activation des métalloprotéinases matricielles

Les métalloprotéinases matricielles sont généralement sécrétées dans l'espace extracellulaire sous une forme latente appelée proenzyme ou zymogène (pro-MMPs) par les cellules. Leur activation requiert le clivage par protéolyse du prodomaine maintenant la protéine dans un état inactif. Elle a lieu en général dans l'espace extracellulaire, mais peut aussi se faire au niveau de la surface cellulaire, ainsi que dans l'espace intracellulaire au niveau des membranes des organelles telles que l'appareil de Golgi ¹⁵⁹.

L'activation des MMPs peut être induite par des protéases (sérine protéases de type trypsine, plasmine...) ¹⁶⁰ ou par le biais d'autres métalloprotéinases matricielles (MT-MMPs...) qui rendent possible les processus ultérieurs de clivage. Comme dans toutes les cascades d'activation, la génération de l'enzyme active est finement régulée. La conformation de la forme zymogène est maintenue par une interaction entre un résidu cystéine du prodomaine et l'atome de zinc du site catalytique des MMPs. Après rupture de cette coordination, un changement de conformation se produit et l'atome de zinc devient accessible au substrat. L'activation de certaines pro-MMPs en MMPs fonctionnelles est achevée par une autolyse (par l'action d'autres MMPs). Ainsi, par exemple, l'activation de la pro-MMP-1 en MMP-1 active requiert l'action de la MMP-3 ¹⁵⁸ et l'activation des MMPs -2 et -13 nécessite la participation de la MT1-MMP ^{161, 162} (**Tableau 1**).

1.3 Les métalloprotéinases matricielles dans le tissu myocardique

Différentes MMPs ont été détectées dans le cœur et sont produites en faible quantité par les cellules composant le tissu myocardique adulte humain sain, où elles résident sous leur forme zymogène (**Tableau 1**). Elles sont principalement sécrétées par les cellules de type fibroblastique et par les cardiomyocytes. La plupart dégradent de multiples substrats comme les protéoglycanes.

Famille et nom commun	Classification	Localisation chromosomique	Principaux substrats et/ou fonction
Collagénases			
Collagénase interstitielle	MMP-1	11q22.3	Collagènes I, III, et composants de la membrane basale; active les MMPs-2 et -9
Collagénase-2	MMP-8	11q21	Collagènes I, III et fibronectine
Collagénase-3	MMP-13	11q22.3	Collagènes I et III
Gélatinases			
Gélatinase A	MMP-2	16q21	Collagènes I et IV, gélatines, élastine et fibronectine ; active les MMPs-9 et -13
Gélatinase B	MMP-9	20q11.2-13.1	Collagènes IV, gélatines, élastine et fibronectine
Stromélysines			
Stromélysine-1	MMP-3	11q22.3	Collagène III et IV, fibronectine, laminine, élastine; active les MMPs-1, -7, -8, -9 et -13
Matrilysines			
Matrilysine-1	MMP-7	11q21-q22	Collagènes I, III et IV, fibronectine, laminine, élastine
MMPs de type membranaire			
MT1-MMP	MMP-14	14q11-q12	Collagènes I, III, et composants de la membrane basale; active la pro-MMP-2 et la pro-MMP-13

Tableau 1 : Métalloprotéinases identifiées dans le tissu myocardique (d'après Spinale, 2002 ¹⁶³).

Les collagénases, MMP-1, -8 et -13, sont principalement responsables de la dégradation des fibres de collagène de la MEC et bien que la MMP-8 soit considérée comme

exclusivement sécrétée par les cellules inflammatoires périphériques, sa présence peut être due aux cellules présentes dans le cœur comme les mastocytes¹⁶³⁻¹⁶⁵. La MMP-3 dégrade en particulier l'élastine et tous les composants de la membrane basale (comme le collagène de type IV, la fibronectine, la laminine...) ¹⁶⁶. Le collagène dégradé par les MMPs génère des fragments qui vont servir de substrats à d'autres MMPs, comme les gélatinases MMP-2 ou MMP-9. La MMP-2 et la MMP-9 métabolisent aussi l'élastine et des composants de la membrane basale. La MMP-7 possède aussi de nombreux substrats comme les collagènes de type I, III et IV ainsi que la fibronectine^{151, 167}. Ce sont les MT-MMPs (dont la MT1-MMP) qui ont la plus forte activité protéolytique en dégradant entre autres tous les types de collagènes fibrillaires et tous les composants de la membrane basale¹⁴⁴ (**Tableau 1**).

2 Modulation de l'activité des métalloprotéinases et remodelage matriciel

La régulation de l'activité des MMPs est contrôlée à de multiples niveaux, tant intracellulaires qu'extracellulaires et reste l'objet de nombreuses études. Les principaux mécanismes de régulation de ces enzymes se font par la transcription des gènes, la post-traduction des protéines, et l'inhibition par interaction avec des inhibiteurs endogène.

2.1 *Régulation transcriptionnelle*

2.1.1 Les différents types de promoteurs des MMPs

Suite à une succession de stimuli d'origine biologique ou mécanique, une cascade d'évènement peut conduire à la synthèse de facteurs de transcription qui se fixent sur les régions promotrices des gènes codant pour les différents types de MMPs et induisent la production des ARN messenger correspondants (**Figure 4**).

Les deux principaux éléments de réponse localisés dans les promoteurs des gènes des MMPs sont l'*activator protein-1* (AP-1) et le *polyoma enhancer A binding protein-3* (PEA-3) qui interagissent avec la famille de protéines Fos-Jun et Ets¹⁶⁸. Les gènes de la MMP-2 et de la MT1-MMP diffèrent des autres car ils ne présentent ni les éléments de réponse précédents

ni la TATA box. Ceci a longtemps laissé supposer que ces enzymes étaient produites de manière constitutive, cependant divers stimuli, capables de faire varier leur production, ont mis en évidence l'existence de facteurs de transcription associés à leurs éléments de réponse¹⁶⁹. Les enzymes MMP-1, MMP-7, MMP-13 et MT1-MMP ont au minimum un élément de réponse aux facteurs de croissance transformant (TGF), le TGF *inhibitory element* (TIE), qui interagit avec les facteurs de transcription de la famille des SMAD¹⁷⁰. D'autres FT, comme SP-1, se fixent sur les régions riches en GC des promoteurs de MMP-2, MMP-9 et MT1-MMP¹⁶⁹. Le promoteur de la MMP-9 est le seul à avoir un site répondant au *nuclear factor-κB* (NF-κB)¹⁷¹. Cependant MMP-1 et MMP-13 ont un site de réponse fonctionnel similaire à NF-κB¹⁷².

La répétition des éléments de réponse dans un même promoteur et l'intensité des stimuli provoquant la production ou la libération de facteurs de transcription, sont autant de paramètres qui influencent la production des transcrits codant pour les MMPs et qui peuvent avoir des répercussions sur les pathologies cardiaques. De plus, certains types cellulaires exprimant les MMPs peuvent avoir des réponses différentes et parfois contraires à des stimuli identiques¹⁷³.

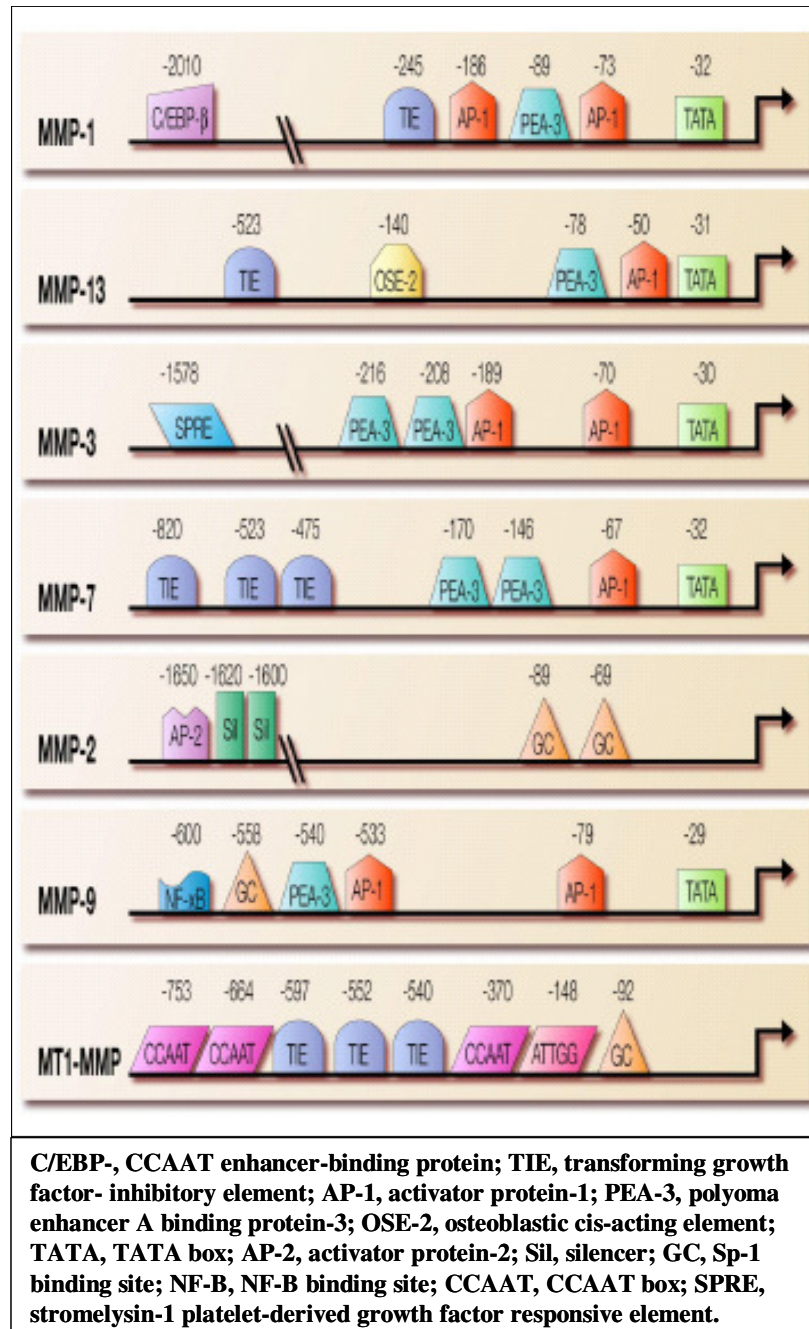


Figure 4 : Principaux éléments de réponse aux facteurs de transcription se fixant sur le promoteur des différents types de MMPs (d'après Spinale, 2007⁴).

2.1.2 Principaux éléments régulateurs de la transcription

De nombreuses molécules bioactives de type cytokines, hormones, facteurs de croissance ou encore des protéines matricellulaires modulent la production des MMPs, en activant les voies de signalisation autorisant leur transcription.

Un grand nombre de cytokines sont impliquées dans le remodelage matriciel, parmi lesquelles, le *tumor necrosis factor*-alpha (TNF- α) et l'IL-1- β ¹⁷⁴. En se fixant sur leurs récepteurs, ces deux cytokines pro-inflammatoires provoquent une cascade de signalisation qui active principalement les voies AP-1 et NF- κ B. Par exemple, IL-1- β augmente la production des protéines MMP-2 et MMP-9 par les fibroblastes cardiaques chez le rat adulte, et cette augmentation est réduite par l'inhibition de la voie NF- κ B ¹⁷⁵. Elle entraîne aussi une augmentation de MMP-1, qui est réduite par l'inhibition des voies MAPK/AP-1 et NF- κ B dans des fibroblastes humains gingivaux ¹⁷⁶. Le TNF- α induit une augmentation de MMP-13 par les chondrocytes articulaires humains, qui est inhibée en bloquant les voies d'AP-1 et de NF- κ B ¹⁷⁷. De même, la surexpression de TNF- α dans le cœur de souris transgéniques entraîne un remodelage myocardique progressif, avec une augmentation transitoire des MMPs ¹⁷⁸. Dans une autre étude avec le même type de modèles transgéniques, cette surexpression entraîne principalement l'augmentation de la production de MMP-9 associée à une cardiomyopathie ; en revanche, si elle est couplée à une inhibition de l'expression du gène NF- κ B, le niveau de MMP-9 décroît et la fonction cardiaque s'améliore. Dans les fibroblastes cardiaques néonataux ou adultes de rats, le TNF- α comme l'IL-1- β augmente la production des MMPs et plus particulièrement des MMP-2 et -9, ce qui, associé à une diminution de la synthèse de collagène, suggère la contribution de ces deux cytokines dans la dilatation ventriculaire ¹⁷⁹.

Les médiateurs hormonaux comme la norépinéphrine, l'angiotensine II et l'endothéline-1 provoquent une vasoconstriction des artères et peuvent générer une hypertension artérielle, allant jusqu'à provoquer un remodelage myocardique, qui peut conduire au développement d'une insuffisance cardiaque ¹⁸⁰⁻¹⁸². Ils sont donc susceptibles d'activer les voies de signalisation pouvant induire une activation de la transcription des MMPs qui contribue au remodelage tissulaire. La norépinéphrine est une neurohormone dont

l'augmentation est caractéristique de la progression d'une insuffisance cardiaque^{180, 183}. L'augmentation de sa synthèse a des répercussions sur la production d'autres molécules bioactives comme l'angiotensine II et l'endothéline-1, produites en partie par l'activation du système neurohormonal, et donc des effets indirects dans le cadre du remodelage myocardique et de l'insuffisance cardiaque. La norépinéphrine augmente la transcription de MMP-2 dans le cœur de rat¹⁸⁴ et agit indirectement sur la transcription des MMPs par la voie des récepteurs β - et α -adrénergiques¹⁸⁵. L'angiotensine II stimule les voies de signalisation Janus kinase-*signal transducers and activators of transcription* (JAK-STAT), qui activent les facteurs de transcription AP-1, STAT et NF- κ B^{186, 187}. Dans les cardiomyocytes néonataux de rats, l'angiotensine II augmente la transcription de MMP-9¹⁸⁸ et l'emploi d'antagonistes de ces récepteurs inhibe l'induction de MMP-2 et MT1-MMP due à des contraintes d'étirement¹⁸⁷. Cependant, l'existence de rétrocontrôles ou des interférences entre voies de signalisation peut inverser ou rendre transitoire les effets de ce médiateur : ainsi les fibroblastes cardiaques de rat traités par l'angiotensine II voient leur production de MMP-1 diminuer alors que le collagène de type I augmente¹⁸⁹. L'endothéline-1 stimule les voies des différents isotypes de PKC qui activent des facteurs de transcription de type NF- κ B ou Ets^{181, 190}. Elle augmente l'expression des protéines MMP-1 par les cellules de l'endothélium vasculaire de chat et MT1-MMP par les cardiomyocytes de porc^{190, 191}. De plus, son inhibition par le blocage de ses récepteurs réduit l'activation des MMPs et la dilatation du ventricule gauche post-IM chez la souris¹⁹², ce qui suggère que l'endothéline-1 contribue à la progression du remodelage ventriculaire après IM.

Parmi les facteurs de croissance, le plus étudié est un membre de la superfamille du TGF, le TGF- β . Il stimule les voies de signalisation des SMAD qui peuvent se fixer sur des régions promotrices comme TIE, AP-1¹⁹³. Le TGF- β est impliqué *via* la voie des SMAD dans l'hypertrophie des cardiomyocytes et la synthèse de la MEC par les myofibroblastes humains après IM¹⁹⁴. Ce facteur de croissance connu pour ses propriétés profibrotiques est supposé favoriser la croissance de la MEC et réduire sa dégradation. Ainsi, il inhibe la production de MMP-1 *via* AP-1 dans des lignées de fibroblastes murins et humains^{170, 195, 196}. Cependant, il induit la production de MMP-13 dans des lignées de fibroblastes humains¹⁹⁵, et associé au TNF- α , il induit la production de MMP-9 *via* un élément de réponse TIE dans des fibroblastes dermiques humains¹⁹⁷. Le TGF- β peut donc à la fois activer ou réprimer la

synthèse de certains types de MMPs. Ce double effet peut être caractéristique d'un rétrocontrôle ou de l'activation de voies de signalisation croisées¹⁹⁸.

Les protéines matricellulaires sont des protéines impliquées dans les interactions cellules-matrices. Elles sont aussi appelées facteurs matricellulaires. Ces facteurs peuvent se comporter comme des cytokines ou des molécules d'adhésion se complexant avec la membrane cellulaire et induire localement des stimuli physiques ou chimiques en cas de stress, par exemple, pendant le remodelage tissulaire ou un IM^{199, 200}. Ces protéines sont peu présentes en conditions physiologiques normales, à part lors de l'embryogenèse. En revanche, leur expression est augmentée en conditions pathologiques. Les protéines matricellulaires les plus décrites dans les pathologies cardiaques sont la thrombospondine-2 (TSP-2) et l'ostéopontine (OPN)^{201, 202}. L'OPN peut moduler la transcription des MMPs *via* les éléments de réponse de NF- κ B^{203, 204} et la TSP-2 par la voie d'AP-1^{205, 206}. L'OPN peut inhiber l'activité des MMPs-2 et -9 induite par l'IL-1 β dans les fibroblastes cardiaques de rat adulte²⁰⁷. En revanche, elle induit l'activation de ces mêmes MMPs *via* NF- κ B, ainsi que l'expression de MT1-MMP, dans des lignées de mélanome de souris^{208, 209}. Les fibroblastes de souris déficientes en TSP-2 perdent leurs propriétés d'adhérence et montrent une augmentation du taux de MMP-2²¹⁰. Il en est de même pour les souris déficientes cardiaques en TSP-2, qui voient les formes zymogènes des MMPs-2 et -9 augmenter²⁰². Les modèles d'hypertrophie cardiaque de souris déficientes en OPN montrent une diminution de l'hypertrophie et de l'accumulation matricielle²¹¹⁻²¹³. TSP-2 est impliquée dans la transition de l'hypertrophie à la rupture cardiaque chez le rat hypertendu²⁰². De plus, la souris déficiente en TSP-2 présente une composition et une structure matricielles anormales²¹⁰.

2.2 Régulation post-traductionnelle

Après avoir subi les étapes de transcription des gènes et de post-transcription des ARNm, les MMPs sont traduites sous la forme de proenzymes. Après l'étape de traduction, ces formes zymogènes peuvent subir des transformations appelées modifications post-traductionnelles, telles que l'O-glycosylation, et qui ont généralement lieu dans l'appareil de Golgi.

Les formes zymogènes des MMPs peuvent subir des modifications post-traductionnelles suite à un stress oxydant, comme par exemple une activité excessive d'enzymes entraînant la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène, qui peut conduire à l'activation des MMPs ²¹⁴⁻²¹⁶. La myéloperoxydase est une enzyme avec une activité de peroxydase associée à une activité de chloration, utilisant le peroxyde d'hydrogène et les ions chlorures pour former l'acide hypochloreux. Elle peut activer la MMP-7 dans les macrophages humains des lésions athérosclérotiques ²¹⁷. Le peroxyde d'azote quant à lui est impliqué dans les dommages cardiaques causés par l'ischémie-reperfusion et par les cytokines pro-inflammatoires. Il induit le relargage et l'activation de la MMP-2 dans la circulation du cœur perfusé de rat, indiquant que les dommages cardiaques provoqués sont en relation avec l'activation de la MMP-2 ²¹⁴. Les effets des produits du stress oxydant sur l'activation des MMPs sont cependant à nuancer : en effet, les enzymes utilisées pour induire le stress oxydant peuvent être contaminées et contenir des agents activateurs des MMPs ayant une activité protéolytique ²¹⁸.

Les MMPs membranaires comme MT1-MMP ont une activité protéolytique uniquement après insertion dans la membrane cellulaire. Les événements de la post-traduction sont donc essentiels pour produire une enzyme fonctionnelle. De plus, tous les domaines constituant la MT1-MMP sont indispensables pour qu'elle soit pleinement opérationnelle et la moindre modification peut affecter sa circulation intracellulaire ou son activité ²¹⁹⁻²²¹. L'ischémie myocardique et la reperfusion chez le porc entraînent toutes deux une augmentation de l'activité de la MT1-MMP associée à une augmentation de la circulation de la protéine vers la membrane cellulaire ²²². Les étapes de circulation intracellulaire de la MT1-MMP sont essentiellement régulées par des protéines de type furine qui reconnaissent son prodomaine et permettent sa maturation, lui donnant ainsi sa longueur finale ²¹⁹. Ces enzymes sont donc nécessaires à l'activation de MT1-MMP, qui peut alors à son tour activer la MMP-2 ²²³. L'O-glycosylation est une des modifications post-traductionnelles principales de MT1-MMP. Elle joue sur la stabilité de la protéine par réduction de sa taille en provoquant une autocatalyse pouvant aller jusqu'à son inactivation ²²⁴. Enfin, une fois à la surface des cellules, MT1-MMP peut aussi être endocytée et placée dans des vésicules de réserve à l'intérieur de la cellule ²²¹. Cette MMP étant fortement exprimé après IM, l'étude de la régulation de ses mécanismes post-traductionnels s'avère indispensable pour une meilleure compréhension du remodelage myocardique ²²⁵.

2.3 Les inhibiteurs des métalloprotéinases matricielles

En plus de leur homologie structurale, les différentes métalloprotéinases matricielles présentent d'autres caractéristiques communes : elles peuvent être inhibées par des agents chélateurs (type EDTA), ainsi que des inhibiteurs endogènes.

2.3.1 Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases

Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMPs) sont les principaux inhibiteurs de MMPs. Ce sont des protéines de faible poids moléculaire, qui inactivent les métalloprotéinases matricielles en se fixant sur leur site actif et en les empêchant de se lier à leur substrat¹⁵⁷. Le complexe MMP/TIMP est stable et irréversible. L'activité des TIMP-1 influence directement celle lié à l'activité des MMPs et donc le processus de remodelage myocardique⁴.

Les inhibiteurs TIMPs sont constitués de quatre membres (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 et TIMP-4). Ils sont tous exprimés dans le tissu cardiaque humain en conditions physiologiques normales et sont synthétisés par les mêmes cellules qui synthétisent les MMPs. TIMP-4 est peu présent dans l'ensemble des tissus, cependant, c'est la forme de TIMPs la plus exprimée dans le tissu cardiaque et la dernière à avoir été identifiée²²⁶.

La fixation des MMPs par les TIMPs se fait avec un ratio moléculaire stœchiométrique de 1 :1¹⁵⁸. En raison de la faible homologie de séquences entre les TIMPs, des différences d'affinité existent pour un type de MMP donné, tel que MT1-MMP qui est fixée avec une affinité moindre par TIMP-1²²⁷. TIMP-3 est le seul TIMP pouvant directement se lier aux protéines de la MEC²²⁸⁻²³⁰.

Comme pour les MMPs, les promoteurs des TIMPs possèdent de nombreux éléments de réponse aux facteurs de transcription tels que AP-1, AP-2, PEA-3, Sp1 et Ets¹⁷². Le promoteur de TIMP-2 possède une succession de motifs Sp-1 et AP-2, ainsi qu'une séquence similaire à la TATA box²³¹. Celui de TIMP-3 possède également plusieurs motifs Sp-1, mais pas de TATA box²³². Chez la souris, le promoteur de TIMP-4 contient un site de fixation

GATA et un élément de réponse unique dans l'initiation de la transcription²³³. Cependant, les motifs des promoteurs impliqués divergent complètement de ceux des MMPs, ce qui implique des différences d'activation en fonction des stimuli entre les TIMPs et les MMPs, mais aussi entre TIMPs²³¹. Ainsi une stimulation de cellules mésangiales de rat par du TGF- β entraîne une réduction de la transcription de MMP-2 mais une augmentation de celle de TIMP-1²³⁴, ce qui laisse supposer un effet opposé de ce facteur de croissance sur la régulation MMP/TIMP. Cependant, il a aussi été démontré qu'il pouvait entraîner une induction de MMPs^{195, 197}. Les effets du TGF- β sur la transcription MMP/TIMP dépendent donc de la concentration, du temps, du tissu, et de l'espèce étudiée.

TIMP-1 inhibe pratiquement toutes les MMPs sauf MMP-2 et MT1-MMP. De même, TIMP-2 inhibe presque toutes les MMPs sauf la MMP-9. TIMP-3 se fixe sur les MMPs -1, -2, -3 et -9. TIMP-4 inhibe l'activité des MMPs -1, -2, -3, -7 et -9^{3, 151, 160, 229, 235-237}. L'activité des TIMPs ne se résume pourtant pas uniquement à leurs propriétés inhibitrices. En effet, ils peuvent également se lier aux formes zymogènes des MMPs au niveau de sites autres que le site catalytique. Ainsi, TIMP-2 se fixe à la pro-MMP-2 et ce complexe se lie à MT1-MMP, ce qui peut alors activer la MMP-2. Cependant, un excès de TIMP-2 peut tout de même inhiber MT1-MMP¹⁵⁵. De plus, les TIMPs sont aussi impliqués dans des phénomènes tels que l'apoptose, la différenciation ou le cycle cellulaire. TIMP-1 et -2 peuvent ainsi induire la croissance cellulaire dans des lignées d'ostéosarcome humain²³⁸, alors que l'induction par transfection d'un phénotype cancéreux dans des fibroblastes cardiaques est inhibée par TIMP-4, provoquant ainsi l'apoptose²³⁹. De même, TIMP-3 active l'apoptose dans les cellules musculaires lisses de rat, alors que TIMP-1 l'inhibe dans des lymphocytes B^{240, 241}. Une étude sur des fibroblastes cardiaques de souris surexprimant les différentes formes de TIMPs montre une différenciation des cellules vers un phénotype myofibroblastique quelque soit le TIMP surexprimé²⁴². Tout ce panel d'activités opéré par les TIMPs est indépendant des MMPs et susceptible de participer au remodelage myocardique.

2.3.2 D'autres inhibiteurs naturels des MMPs

Il existe également d'autres types d'inhibiteurs endogènes de MMPs. Parmi eux, la glycoprotéine α 2-macroglobuline est un inhibiteur à large spectre piégeant les protéases du

plasma quelque soit leur classe (trypsine, sérine protéase, plasmine...). Les protéases sont ainsi séquestrées à l'intérieur de l' α 2-macroglobuline qui les emprisonne en changeant de conformation. Le complexe formé est alors endocyté par les macrophages, puis éliminé. L'activité des MMPs dans le plasma est donc principalement régulée par l' α 2-macroglobuline²⁴³. De même, les inhibiteurs membranaires tels que RECK (pour *reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs*) empêchent l'activation des pro-MMPs -2, -9 et -14²⁴⁴.

3 La balance MMPs/TIMPs dans le remodelage matriciel

De nombreuses études chez l'Homme^{77, 245, 246} et dans des modèles animaux^{144, 247, 248} ont montré une augmentation de l'expression et de l'activité des MMPs immédiatement après l'infarctus ou pendant le processus de remodelage post-IM. Ce phénomène est à mettre en parallèle avec une diminution de l'expression des TIMPs, conduisant à une augmentation du ratio MMPs/TIMPs. Suite à ces observations, de nouvelles investigations ont été menées afin de définir le rôle des MMPs dans le remodelage matriciel post-IM, en particulier au niveau du ventricule gauche, notamment grâce à l'emploi d'inhibiteurs synthétiques de MMPs et de modèles animaux dont les souris transgéniques.

L'utilisation de souris knock-out pour différentes formes de MMPs et de TIMPs a permis de mettre en évidence l'importance de la régulation de l'expression et de l'activité des MMPs suite à un infarctus du myocarde. Dans des conditions physiologiques, les souris déficientes en MT1-MMP ont de sévères problèmes de croissance induisant l'apparition de nanisme et de malformations tissulaires majeures^{249, 250}. Les souris déficientes en MMP-3 présentent des troubles de la prolifération cellulaire et de la réponse inflammatoire et développent des problèmes de cicatrisation avec augmentation de la taille de la cicatrice en cas de dommage myocardique^{251, 252}. Les modèles de souris knock-out pour TIMP-3 développent une dilatation spontanée du ventricule gauche qui augmente avec l'âge, accompagnée d'une dysfonction cardiaque²⁵³. Suite à l'induction d'un infarctus du myocarde, les souris n'exprimant pas MMP-7 voient leur taux de survie s'améliorer même si la taille de la zone infarctée est similaire à celle des souris contrôles²⁵⁴. La suppression de TIMP-1 entraîne une importante augmentation de la dilatation du ventricule gauche avec perte matricielle accompagnée d'une dysfonction systolique sévère^{255, 256}. La déficience en MMP-2 réduit la dilatation du ventricule gauche consécutive à un IM²⁵⁷. La délétion ciblée des

différentes formes de MMPs et de leurs inhibiteurs endogènes montre l'importance du maintien de la balance MMPs/TIMPs dans le remodelage myocardique post-IM. Un équilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire myocardique permet la conservation d'un phénotype cardiaque sain.

Le remodelage myocardique après infarctus conduit à une dilatation progressive du ventricule gauche, pouvant mener au développement d'une insuffisance cardiaque ². Chez l'animal, cette dilatation peut être atténuée grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de MMPs sélectifs ²⁵⁸⁻²⁶⁰ ou à plus large spectre ^{247, 261, 262}, allant même jusqu'à diminuer la taille de la zone infarctée. Ces études montrent que la modulation de l'activité des MMPs peut être une cible thérapeutique potentielle dans l'amélioration du remodelage myocardique. Cependant, un traitement prolongé peut entraîner des effets délétères pouvant causer la mort de l'animal ²⁶³. De même, les prémices d'essais cliniques réalisés chez des patients souffrant d'infarctus du myocarde et traités avec un inhibiteur à large spectre ne montrent pas de réduction de la dilatation du ventricule gauche ²⁶⁴. En dépit des résultats satisfaisants sur les animaux, l'évaluation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des MMPs est donc recommandée dans l'optique d'un traitement chez l'Homme. En effet, les nombreux types de MMPs, ainsi que la fenêtre à la fois spatiale et temporelle du traitement sont autant de paramètres à améliorer en vue d'une éventuelle thérapie par les inhibiteurs de MMPs ^{165, 265}.

4 La MMP-9 : un rôle prépondérant dans le cœur

La métalloprotéinase matricielle-9, également appelée gélatinase B, est sécrétée dans l'espace extracellulaire sous une forme zymogène par les polynucléaires neutrophiles, les monocytes/macrophages, les (myo)fibroblastes, les myocytes et les cellules endothéliales. Son principal substrat est la gélatine B (forme de collagène dénaturé). La forme latente de la MMP-9 (92 kDa) est sécrétée dans l'espace extracellulaire et requiert une activation par protéolyse d'un fragment de 10 kDa à l'extrémité N-terminale de la proenzyme.

L'expression et l'activité des MMPs, en particulier de la MMP-9, augmentent en cas de dommages myocardiques liés à un infarctus. Nous avons démontré que la surproduction de MMP-9 est un facteur de risque cardiovasculaire et un biomarqueur du remodelage du ventricule gauche et de l'insuffisance cardiaque après infarctus du myocarde ⁸. Ces

observations ont également été validées par d'autres groupes ⁵⁻⁷. Ainsi, parmi les différentes métalloprotéinases matricielles exprimées dans le cœur (**Tableau 1**), la MMP-9 se révèle avoir un rôle prépondérant dans le remodelage myocardique post-IM.

La fonction de la MMP-9 dans le remodelage myocardique a été étudiée grâce à des modèles de souris transgéniques. Dans des conditions basales, les souris knock-out pour la MMP-9 présentent une augmentation de l'expression des MMPs -3 et -13 dans les ventricules, probablement due à des mécanismes compensatoires ²⁶⁶. Après un infarctus du myocarde, les modèles de souris déficientes pour MMP-9 montrent une diminution de la dilatation du ventricule gauche et du remodelage myocardique délétère. De plus, le processus de cicatrisation au niveau de la zone infarctée semble ralenti et est associé à une diminution du nombre de macrophages dans l'infiltrat tissulaire. En parallèle, la vasculogénèse et de la perfusion augmentent ^{150, 254}. Ces données montrent que la MMP-9 favorise la migration des cellules inflammatoires du tissu myocardique et qu'elle est impliquée dans des processus qui limitent la vasculogénèse et favorisent un remodelage délétère post-IM. D'autres études présentent un ralentissement de la cicatrisation avec réduction de l'infiltrat leucocytaire et diminution de l'activité protéolytique de la MMP-9 au sein de la lésion tissulaire après IM ²⁶⁷.

L'effet de la déficience en MMP-9 reste cependant encore à préciser car il reste à établir s'il provient de l'inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire ou d'autres cascades d'activation qui limitent la réaction inflammatoire des leucocytes. De plus, ces expériences sur des souris knock-out ne signifient pas forcément que l'inhibition de la MMP-9 permet une amélioration du remodelage du ventricule gauche, même si sa dilatation peut être limitée.

De récentes études chez des patients rapportent un effet bénéfique de l'inhibition de la MMP-9 dans la phase précoce post-infarctus ¹⁶⁵, mais pas pendant la phase de remodelage ²⁶³. La MMP-9 fait donc partie des cibles thérapeutiques potentielles dans la prévention et/ou le traitement de l'insuffisance cardiaque, tout en faisant intervenir la notion de fenêtre spatiale et temporelle dans l'approche thérapeutique.

5 Synthèse

Les MMPs sont une famille de protéases à zinc impliquées essentiellement dans le remodelage matriciel des tissus. L'activité des MMPs est négligeable en conditions physiologiques basales, cependant elle peut augmenter en fonction de leur niveau d'expression. La régulation des MMPs se fait principalement au niveau de la transcription des gènes, de la post-traduction des protéines et de l'action d'inhibiteurs endogènes, majoritairement les TIMPs.

En cas de stress, la surexpression des MMPs induite par différents médiateurs (cytokines, facteurs de croissance...) peut entraîner un déséquilibre de la balance MMPs/TIMPs en faveur des MMPs dans le développement de pathologies. Il n'y a alors plus d'équilibre entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire, ceci au profit de la dégradation. Cette rupture d'équilibre peut provoquer des lésions tissulaires et entraîner une perte des caractéristiques initiales des tissus telles que les propriétés mécaniques.

Parmi toutes les MMPs, la MMP-9 semble avoir un rôle clef dans le remodelage myocardique après infarctus, et de nombreuses études démontrent que c'est un biomarqueur du remodelage et que sa surproduction est un facteur de risque cardiovasculaire. La fréquence de l'insuffisance cardiaque augmente dans la population, ce qui justifie le développement de nouvelles approches thérapeutiques. Son aggravation est liée au processus de remodelage myocardique qui intervient dans son évolution. L'étude du remodelage et de ses mécanismes est donc fondamentale dans le développement de nouveaux traitements, permettant ainsi l'identification précoce des patients à risque et l'adaptation de la prise en charge thérapeutique à l'échelle de la population.

CHAPITRE III :

LE PROCESSUS DE REMODELAGE MYOCARDIQUE

APRES INFARCTUS DU MYOCARDE

1 Le remodelage myocardique post infarctus

Le processus de remodelage du cœur est initié suite à une maladie cardiaque (infarctus du myocarde, cardiopathies indéterminées). Sa progression peut être modulée par la participation de facteurs environnementaux ou génétiques. Dès le début des années 80, ce processus a particulièrement été décrit au niveau du ventricule gauche après un infarctus du myocarde chez le rat ²⁶⁸ ou chez l'humain ²⁶⁹, et la reconnaissance de l'importance de son traitement dans les stades précoces post-infarctus prend son essor au début des années 90 ²⁷⁰. La physiopathologie de l'insuffisance cardiaque est due à la plus ou moins longue transformation du cœur à cause d'un remodelage délétère, essentiellement au niveau du ventricule gauche, quelle que soit son étiologie.

L'origine du remodelage myocardique est un stress biomécanique causé par une surcharge mécanique systolique et/ou diastolique excessive sur le muscle cardiaque, souvent après un infarctus du myocarde, couplée à l'activation de certains systèmes neurohormonaux tels que le système rénine angiotensine aldostérone ²⁷¹. L'apparition d'anomalies structurales et la vitesse d'évolution du remodelage cardiaque dépendent de la durée de ce stress.

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 l'étendue de la zone nécrosée en cas d'IM. Il s'accompagne d'une augmentation du volume du cœur ²⁷², avec amincissement des parois du ventricule gauche. Au niveau du myocarde, le phénomène de remodelage se traduit par un changement de la vascularisation accompagné de changements constitutionnels de la matrice extracellulaire et phénotypiques des cellules (anomalies des flux calciques, modifications des protéines du

sarcomère et du cytosquelette, production anormale de facteurs de croissance et de cytokines...).

La progression du remodelage est incontestablement la conséquence de modifications de l'expression de nombreux gènes^{273,274} au sein des cellules composant le tissu myocardique. Ce sont essentiellement les gènes impliqués dans l'hypertrophie des cardiomyocytes dont l'expression augmente, cependant la réexpression de gènes transcrits uniquement pendant la période de vie fœtale est aussi observée²⁷⁵. Parmi ces variations d'expression génique, certaines favorisent une adaptation de la cellule à son nouvel environnement avec synthèse d'autres iso-formes de myosine²⁷⁶ ; d'autres sont préjudiciables comme les perturbations de l'homéostasie calcique qui entraînent des troubles du rythme cardiaque²⁷⁷. De plus, de nombreuses voies de transduction du signal activées par un stress biomécanique sont à l'origine du développement de l'insuffisance cardiaque²⁷⁸. L'utilisation de souris transgéniques réprimant ou surexprimant une de ces voies de signalisation spécifique est un modèle de choix pour mettre en exergue le lien entre stress biomécanique et remodelage myocardique²⁷⁹. Différentes voies de signalisation ont pu ainsi être répertoriées comme bénéfiques (voies de la protéine kinase Ce^{280,281}) ou délétères (voies de la protéine kinase A²⁸² et de la protéine kinase C β ²⁸³) dans l'évolution de l'insuffisance cardiaque.

Ainsi, selon les mécanismes impliqués, le remodelage myocardique peut s'avérer *adaptatif* ou *maladaptatif*. *Adaptatif*, s'il contribue à restituer la fonction cardiaque perdue, ainsi qu'un débit sanguin suffisant pour les besoins de l'organisme. *Maladaptatif*, s'il conduit au développement d'une insuffisance cardiaque. L'identification de ces mécanismes s'avère donc être une cible potentielle dans le développement de traitements pour améliorer la fonction 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^{2,284}. Le tissu cicatriciel qui remplace la zone infarctée nécrosée après sa détersion, 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 leur cardiomyocytes être altérées car ils subissent le phénomène d'hypertrophie de compensation, afin de limiter la dilatation cardiaque²⁸⁵.

2 Composition du tissu myocardique : cellules et matrice extracellulaire

Afin de maintenir son intégrité structurale, sa survie et sa régulation, chaque tissu requiert un environnement extracellulaire spécifique à ses besoins. Cet environnement est l'équivalent d'un tissu de remplissage ou tissu conjonctif qui forme un réseau fibrillaire de macromolécules organisées en une structure tridimensionnelle et qui contribue au maintien de l'architecture et de l'intégrité du tissu. Il est communément appelé matrice extracellulaire (MEC)^{140, 143, 286}. La matrice extracellulaire est essentiellement composée d'eau, de glycoprotéines (collagènes, fibronectines...), de protéoglycanes (PGs) et d'acide hyaluronique²⁸⁷⁻²⁸⁹. La distribution de ces constituants lui confère ses propriétés biomécaniques et permet la diffusion de diverses molécules comme des nutriments ou des médiateurs solubles. Les cellules caractéristiques du tissu peuvent être complètement bordées par la MEC ou n'être qu'en contact partiel avec elle. Ce contact offre un support et des signaux de régulation aux cellules²⁹⁰.

La composante structurale principale de la plupart des MEC de mammifères est une famille de glycoprotéines : les collagènes. La majorité des isoformes de collagènes sont produites suite à une série de modifications post-traductionnelles et de réactions d'assemblage : la fibrille, puis la fibre de collagène sont produites. Les réseaux de collagène confèrent une résistance mécanique à la déformation et participent à l'adhésion des cellules à la matrice, ainsi qu'à la migration cellulaire¹⁶⁷. Les collagènes interviennent dans la réparation tissulaire en cas de dommages, en participant à l'agrégation plaquettaire. La dégradation des fibres de collagènes de la MEC est provoquée par des protéases de type collagénase ou gélatinase¹⁶⁴. Le collagène dénaturé peut se fixer sur des récepteurs membranaires spécifiques de la famille des intégrines. Il les active, leur permettant ainsi de véhiculer la transduction du signal de dommage cellulaire^{286, 289}.

Une autre famille de glycoprotéines solubles constitue la matrice extracellulaire : les fibronectines^{291, 292}. Présentes sous forme de dimères, elles sont impliquées dans le phénomène d'adhésion cellule/MEC. En plus de se lier aux intégrines grâce à leur motif RGD (arginine-glycine-acide aspartique), elles possèdent des domaines de liaison spécifiques des composants de la matrice extracellulaire comme les collagènes et les protéoglycanes (de type

héparanes sulfates), permettant leur intégration matricielle, ainsi que des domaines de liaison à la fibrine, jouant un rôle majeur dans la réparation tissulaire. La présence de fibronectine dans un caillot de fibrine facilite la migration des cellules dans ce même caillot ; sa liaison aux héparanes sulfates (HSs) facilite leur intégration matricielle et améliore l'adhésion cellulaire *via* les HSs membranaires²⁹³.

Incorporés à la membrane cellulaire ou associés à la matrice, les protéoglycanes forment une famille de protéines couplées à une famille de polysaccharides, les glycosaminoglycanes (GAGs). Ils sont présents dans tous les tissus et à la surface de la plupart des cellules. Certains types comme les HSs sont ubiquitaires, alors que d'autres ne sont présents que dans un type tissulaire tel que l'agrécan dans le cartilage^{288, 294}. Les propriétés des PGs dépendent des groupements carboxyles ou sulfates des GAGs qui leur sont associés. Ainsi l'acide hyaluronique (HA), qui est un des composants majeurs de la matrice extracellulaire, n'est pas sulfaté, alors qu'un HS peut être sulfaté au maximum trois fois. Cette diversité dans le degré de sulfatation est tissu spécifique ou dépend du processus biologique. Les glycosaminoglycanes existent sous forme liée à une protéine centrale grâce à une sérine et un court polysaccharide de liaison, sauf dans le cas de l'HA. Des protéoglycanes comme les HSs jouent un rôle dans la régulation des facteurs de croissance qu'ils peuvent lier *via* leur glycosaminoglycanes. Cette liaison limite la dégradation de ces médiateurs et permet la formation de « réservoirs » de facteurs de croissance dans la matrice extracellulaire. De plus, des gradients de concentration en facteurs de croissance peuvent se créer en fonction de la composition en glycosaminoglycanes des PGs. Les héparanes sulfates associés à la membrane jouent des rôles importants d'adhésion pour les cellules par le biais de sites de liaisons présents sur les fibronectines, mais aussi sur les collagènes (comme ceux de type I et III). Au niveau mécanique, les protéoglycanes augmentent la résistance aux forces de compression des tissus en augmentant leur volume par l'attraction de nombreuses molécules d'eau grâce à la charge négative de leurs GAGs^{295, 296}.

Le tissu myocardique n'est pas formé uniquement de cardiomyocytes. En effet, chez l'Homme ou chez des mammifères comme le chien, le cheval ou le rat, les cardiomyocytes constituent seulement 25 % de la population cellulaire, même s'ils représentent 75 % de son volume²⁹⁷ et 90 % de sa masse²⁹⁸. Les 75 % de cellules restantes sont qualifiées de « non myocytes », elles sont principalement composées de fibroblastes, ainsi que de cellules formant des capillaires et des vaisseaux sanguins. L'équilibre entre la synthèse et la

dégradation de la matrice extracellulaire myocardique est principalement assuré par les fibroblastes ²⁹⁰. Cependant, lors d'un stress cellulaire (tel qu'un infarctus du myocarde) avec destruction de la matrice, les fibroblastes possèdent la capacité de se différencier en myofibroblastes (avec réorganisation de la distribution de microfilaments d'actine de type musculaire au niveau du cytosquelette), capables de participer plus activement à l'homéostasie de la MEC ²⁹⁸.

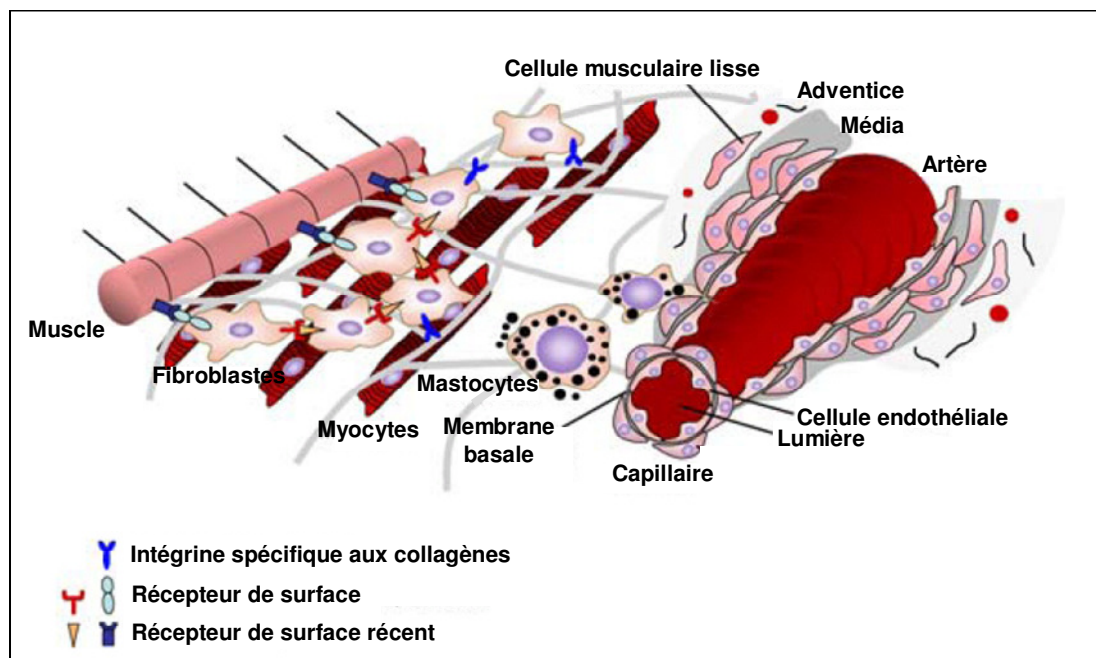


Figure 5 : Modèle d'interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire dans le cœur (d'après Banerjee et al., 2006 ²⁹⁰).

Chaque tissu possède une matrice extracellulaire qui lui est propre : la matrice myocardique est composée principalement de fibres de collagènes ²⁸⁹ de type I (85 %) et III (11 %), d'élastine, de fibronectine et de laminine ²⁹⁹. Le collagène de type I apporte une résistance à la rupture et limite ainsi l'étirement et la déformation tissulaire. Le collagène de type III et l'élastine lui confèrent ses propriétés de résilience. Outre les cardiomyocytes et les fibroblastes, la MEC contient une faible proportion de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses (**Figure 5**). En fonction de la réponse du système immunitaire, elle peut

aussi être colonisée par des acteurs de type polynucléaires neutrophiles ou monocytes-macrophages.

3 Vagues cellulaires après infarctus du myocarde : les différentes phases conduisant au remodelage myocardique et à l'insuffisance cardiaque

Après IM, le remodelage provoque de nombreuses modifications au niveau de l'architecture du ventricule gauche et implique à la fois les zones de tissu myocardique infarctées et non infarctées. Le remodelage du ventricule gauche détermine la capacité myocardique, ainsi que la fonction résiduelle du ventricule gauche²⁷⁰. C'est un processus pouvant évoluer sur plusieurs mois ou plusieurs années. A court terme, les molécules endogènes sécrétées post-IM activent les réponses cellulaires et physiologiques. Si le remodelage est aigu, il peut provoquer une insuffisance cardiaque avec arythmie pouvant aller jusqu'à la rupture^{268, 300}. A plus long terme, le remodelage mène à la dilatation du ventricule gauche et entraîne une augmentation de la surcharge mécanique avec une diminution de la réserve cardiaque suivi du développement d'une IC^{1, 301}.

Toute lésion tissulaire, quelle que soit sa source (ici une ischémie prolongée entraînant l'apparition d'une zone infarctée dans le tissu myocardique) provoque une cascade de réponses conduisant à la formation d'un tissu de réparation et potentiellement à la cicatrisation de la blessure. De nombreux processus potentiellement dynamiques impliquant les composants du myocarde (cellules, matrice extracellulaire...), des médiateurs solubles (cytokines, facteurs de croissance...), ainsi que des cellules d'origine sanguine et mésenchymateuse, sont nécessaires à ce phénomène de réparation tissulaire^{300, 302}.

La réparation cardiaque post-IM est un processus hautement complexe qui implique des phases pouvant se superposer incluant l'inflammation, la formation d'un nouveau tissu et le remodelage de ce tissu^{301, 303}. De nombreuses disparités dans l'expression et l'activité des MMPs et des TIMPs sont observées après IM selon les espèces^{4, 144, 304}. Différents modèles animaux d'IM ont permis de mettre en évidence l'existence d'une fenêtre à la fois spatiale et temporelle dans le processus de remodelage myocardique, accompagnée de variation de la balance MMPs/TIMPs. Ce processus permet de distinguer trois phases²⁶⁵ (**Figure 6**) :

(1) durant les 7 premiers jours suivant l'IM, un début de détersion du tissu nécrosé du myocarde est observé suite à l'infiltration des cellules immunitaires en quantité importante dans la zone infarctée pendant des périodes dites « inflammatoires » (aiguës et/ou chroniques). Un déséquilibre MMPs/TIMPs est provoqué au profit des MMPs, qui vont dégrader la MEC existante et permettre l'infiltration des cellules inflammatoires (neutrophiles et macrophages) dans la zone infarctée pour éliminer les myocytes nécrosés. Les cellules inflammatoires vont relarguer des cytokines, des facteurs de croissance et angiogéniques, ainsi que des MMPs. C'est la phase de cicatrisation précoce ;

(2) de 7 à 21 jours post-infarctus, pendant la phase de remodelage précoce, les cellules inflammatoires associées aux fibroblastes et aux cellules endothéliales forment un tissu de granulation qui remplace le tissu lésé, afin de rétablir l'intégrité tissulaire. La phagocytose des cellules nécrosées se poursuit pendant que les (myo)fibroblastes et les cellules endothéliales migrent puis prolifèrent dans la zone infarctée. Les (myo)fibroblastes synthétisent une matrice désorganisée qui forme un tissu provisoire et les cellules endothéliales forment de nouveaux vaisseaux sanguins. La zone infarctée n'est pas la seule à supporter des modifications structurales et fonctionnelles, puisque les zones bordantes subissent une réponse hypertrophique suite à l'augmentation du volume de leurs cardiomyocytes, ce qui influence la capacité cardiaque ;

(3) la phase de remodelage tardif intervient en général 8 semaines après l'IM et peut durer plusieurs mois. Pendant cette phase, les cellules appartenant au tissu de granulation substituent ce tissu conjonctif par un tissu cicatriciel tentant de mimer les propriétés du tissu d'origine. 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-IM, le ventricule gauche subit une dilatation progressive et une diminution de sa fonction, conduisant au développement d'une IC.

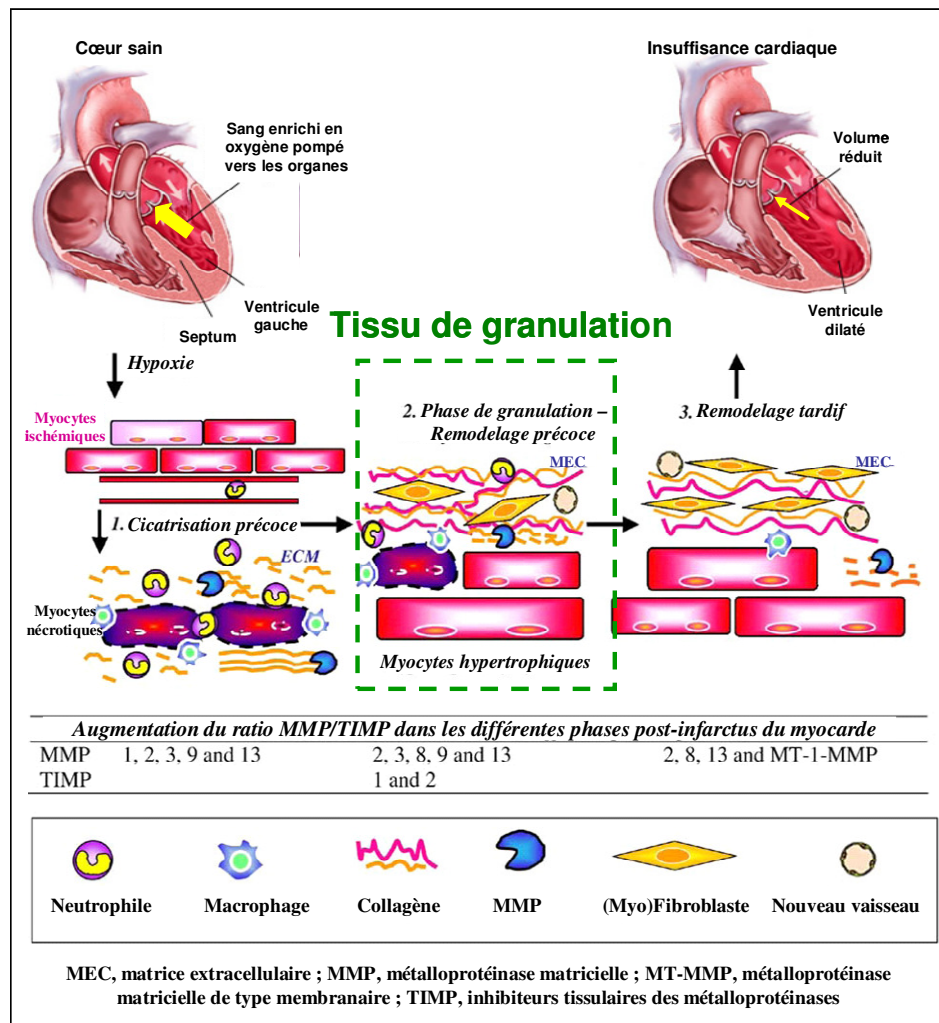


Figure 6 : Etapes du remodelage ventriculaire gauche post-infarctus conduisant au développement d'une insuffisance cardiaque (d'après Vanhoutte et al., 2006²⁶⁵).

3.1 La phase inflammatoire ou cicatrisation précoce

La phase inflammatoire ou phase de cicatrisation précoce implique différents types cellulaires pendant les 7 premiers jours qui suivent l'IM. Ces cellules sont soit résidentes au niveau du foyer de la blessure, soit recrutées à partir du sang ou des tissus voisins. Suite à un

infarctus du myocarde, le phénomène d'ischémie entraîne la nécrose des cardiomyocytes et des autres cellules du tissu cardiaque. Le contenu de ces cellules va se répandre dans le milieu extracellulaire et provoquer une réaction inflammatoire, détruisant les composants de la MEC myocardique.

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 provisoire³⁰⁵. L'activation des plaquettes et des cellules du tissu endommagé 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^{37, 293}.

Les mastocytes, peu nombreux mais résidents permanents du tissu conjonctif, 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 transitoirement³⁰¹.

Les polynucléaires neutrophiles, connus pour constituer la première barrière de défense contre l'infection par des agents pathogènes, sont aussi les premières cellules de l'immunité recrutées dans la zone infarctée, où elles libèrent par dégranulation divers médiateurs et enzymes, dont la MMP-9. Leur rôle est de phagocyter les débris des tissus nécrosés. Leur migration est stimulée par les produits de l'activation plaquettaire, par les peptides de dégradation des bactéries (formyl-peptides), ou par des molécules libérées par les cellules constitutives du myocarde (telles que l'IL-8 par les cellules endothéliales)³⁰⁶. De plus, ces agents chimioattracteurs facilitent la différenciation des neutrophiles de façon à augmenter leur adhésion aux cellules endothéliales vasculaires. Leur propre libération de protéinases facilite leur migration à travers l'endothélium vasculaire. Le recrutement des neutrophiles dans la zone infarctée jusqu'à deux jours post-IM provoque un relargage en masse de MMP-9, ce qui peut contribuer à une dégradation excessive de la MEC cardiaque et à un remodelage myocardique inadapté^{303, 307}. Par ailleurs, les neutrophiles sont considérés comme étant la principale source de MMP-9 pendant la phase de cicatrisation précoce^{303, 307}. 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 cicatrisation¹⁷.

L'expression et l'activité des MMPs et des TIMPs pendant la phase inflammatoire varient selon les espèces^{4, 144, 304}. Chez la souris, la MMP-9 est présente dans sa forme active sous 24 heures après infarctus et est principalement produite par les neutrophiles et les macrophages^{307, 308}, de plus le troisième jour, son activité augmente à la fois dans la zone infarctée et la zone bordante³⁰⁹. 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. En revanche, chez le lapin, la MMP-9 retrouve son niveau d'expression basal dès 4 jours et la régulation de MMP-2 est mineure³⁰⁴. Chez le rat, les niveaux de MMP-2 et -9 sont élevés respectivement sous 24 heures et jusqu'à 16 semaines post-IM¹⁴⁴. La MMP-3 est surexprimée jusqu'à 48 heures post-IM chez la souris, alors que chez le lapin son expression continue pendant 14 jours et sa synthèse ainsi que celle de la MMP-9 sont détectées dans les cardiomyocytes sous 2 jours^{267, 308}. Chez le rat, la MMP-1 est synthétisée majoritairement par les fibroblastes. Son activité augmente dès le troisième jour et atteint un pic au jour 7^{310, 311}. Le rat et la souris présentent une augmentation de l'activité de la MMP-13 dont l'origine est indéterminée^{144, 266} et un accroissement très élevé des ARNm codant pour les TIMPs-1 et -2 pendant la phase de cicatrisation précoce, cependant le profil d'expression protéique reste identique^{144, 303, 311}. En revanche, l'expression de l'ARNm codant pour TIMP-4 ne varie pas, cependant une diminution du niveau de protéine est observée vers 7 jours³¹². Chez le lapin, l'expression de TIMP-1 au niveau protéique est réduite dans la zone infarctée les quatre premiers jours suivant l'IM, puis retourne à son niveau basal³⁰⁴. Ces études sur modèles animaux montrent que la rupture de l'équilibre MMPs/TIMPs a un rôle dans l'augmentation de 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-IM^{251, 304}.

3.2 *Du remodelage précoce au remodelage tardif*

Entre 7 et 21 jours après IM, se profile la phase de remodelage précoce qui correspond à la formation d'un tissu provisoire, le tissu de granulation. La formation d'une matrice provisoire de fibrine et de fibronectine grâce au caillot sanguin permet à différents types cellulaires (cellules immunitaires et endothéliales, fibroblastes) de migrer à travers ou sur celle-ci. Le processus de remplacement du tissu altéré par le tissu de granulation débute. Sa formation 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 (néoangiogénèse) permettant de soutenir le métabolisme cellulaire^{301, 313}. Parallèlement à ces événements, les cardiomyocytes appartenant aux régions bordantes de la zone infarctée subissent une réponse hypertrophique pouvant influencer la capacité cardiaque²⁶⁵.

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. C'est sous cette forme différenciée qu'ils libèrent de grandes quantités de MMPs et terminent le processus de cicatrisation amorcé par les neutrophiles^{157, 314}. Le tissu provisoire sécrète un gradient d'agents chimioattractants tels que la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), qui va se fixer sur les récepteurs aux chimiokines CCR2 des monocytes, les guidant jusqu'à la zone lésée et stimulant leur adhésion à l'endothélium des vaisseaux sanguins ainsi que leur transmigration à travers la paroi vasculaire^{16, 315, 316}. Le premier rôle des macrophages est la détertion du foyer de blessure par la phagocytose des débris tissulaires. Ils investissent le tissu myocardique environ deux à quatre jours après infarctus et leur infiltration tissulaire est facilitée grâce à la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs dont la MMP-9²⁵¹.

Afin d'apporter l'oxygène et les nutriments essentiels aux cellules du tissu de granulation en formation, de nouveaux vaisseaux sanguins sont nécessaires. Cette néovascularisation est permise par la libération de facteurs de croissance comme le vascular endothelial growth factor (VEGF), qui stimulent la prolifération des cellules endothéliales. Ces cellules vont alors produire des protéases facilitant leur migration et leur prolifération pour permettre la formation de nouveaux réseaux capillaires jusqu'à la zone infarctée^{313, 317}.

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. C'est le phénomène de fibroplasie, où 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^{293, 313}. 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 III²⁹⁹. 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^{318, 319}. Le tissu infarcté nécrosé est alors remplacé par un tissu de granulation provisoire riche en fibronectine, en collagène, en PGs et en protéines matricielles telles que l'OPN et les TSP-1 et -2^{4, 199}.

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 IM, néanmoins elle reste élevée jusqu'à deux semaines par rapport au niveau basal^{267, 308, 311}. Dans le même temps, les myofibroblastes infiltrés prolifèrent et participent à l'augmentation de la synthèse de MMP-2^{144, 303, 320} et l'activité de la MMP-3 reste élevée, ainsi que celle de la MMP-13 dont l'origine reste indéterminée^{266, 304}. Chez le rat et le mouton, la MMP-8 principalement issue de la dégranulation des neutrophiles est maintenue à un niveau protéique élevé jusqu'à 16 semaines après infarctus^{144, 248}. 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^{144, 262, 303, 311}. Chez le lapin, l'expression protéique de TIMP-1 reste à son niveau basal³⁰⁴.

La phase de granulation laisse place à la phase de remodelage tardif qui débute environ 21 jours après IM²⁶⁵. 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 néoangiogenèse, ainsi que

celui des cellules présentes dans le tissu diminue par apoptose, pour ne laisser qu'un nombre normal de fibroblastes ¹⁹. Le tissu cicatriciel résultant ne recouvre toutefois jamais toutes les caractéristiques du tissu myocardique initial. En effet, même en synthétisant une MEC de qualité, les myofibroblastes du tissu cicatriciel ne pourront avoir une activité contractile similaire à celle des cardiomyocytes qui ont été détruits durant l'IM et qui ne peuvent être remplacés. Cette dernière étape a lieu pendant le remodelage myocardique du ventricule gauche après infarctus. C'est un processus continu qui peut être très long (de quelques semaines à quelques années), et peut conduire au développement d'une IC ^{2, 270}.

Durant la phase de remodelage tardif dans un modèle d'IM chez le mouton, les MMPs-1 et -9 diminuent huit semaines après infarctus, alors que la MMP-2 augmente ³⁵. Ceci suggère une implication de la MMP-9 principalement dans les événements immédiats suivant l'infarctus comme la phase de cicatrisation précoce ^{157, 308, 314}. En revanche, après la phase aiguë de l'IM, une autre série de MMPs entre en jeu. La MMP-8 principalement sécrétée par les neutrophiles augmente huit semaines après IM, ce qui suggère une réponse inflammatoire chronique suite à un remodelage tardif, pouvant conduire au développement et à la progression d'une IC ^{1, 2, 60 301, 303}. Il en est de même pour la MMP-13 et la MT1-MMP, alors qu'en parallèle les MMPs-7 et -3 diminuent. L'expression des TIMPs-1, -2 et -3 devient indétectable dans la zone infarctée et diminue dans ses régions bordantes. Des résultats analogues ont été obtenus dans un modèle porcin ^{258, 261}.

4 Evènements majeurs dans l'évolution du remodelage myocardique

4.1 *Apoptose et tissu de granulation*

Après infarctus du myocarde, les cellules nécrosées suite à une ischémie sont éliminées par phagocytose par les neutrophiles et les macrophages appartenant au tissu de granulation ¹⁶. Ces cellules entrent en apoptose après la phase aiguë de l'infarctus et il en est de même pour une partie des cardiomyocytes lors d'insuffisance cardiaque chronique.

L'apoptose, mort programmée par la cellule, permet l'homéostasie d'un tissu par élimination de cellules défectueuses, ou encore la résolution du phénomène d'inflammation

par élimination de cellules immunitaires qui ont accompli leur rôle (ici, les neutrophiles), assurant ainsi un retour à la normale¹⁷. Il existe une voie intrinsèque (*via* les mitochondries) et une voie extrinsèque (passant par les « récepteurs de mort » ou « death receptors ») permettant l'induction de l'apoptose³²¹ (**Figure 7**). Ces voies sont activées par différents types de stress pouvant entraîner une apoptose, tels que le stress extracellulaire (carence en oxygène, en facteurs de croissance, ou en nutriments...) ou le stress intracellulaire (lésions de l'ADN, réduction des télomères, dérégulation de l'expression d'oncogène ...).

Des études ont montré que l'inhibition de l'apoptose du tissu de granulation, ou des cardiomyocytes, permettrait une amélioration du remodelage ventriculaire gauche après infarctus chez la souris, le rat ou le lapin¹⁸⁻²⁰.

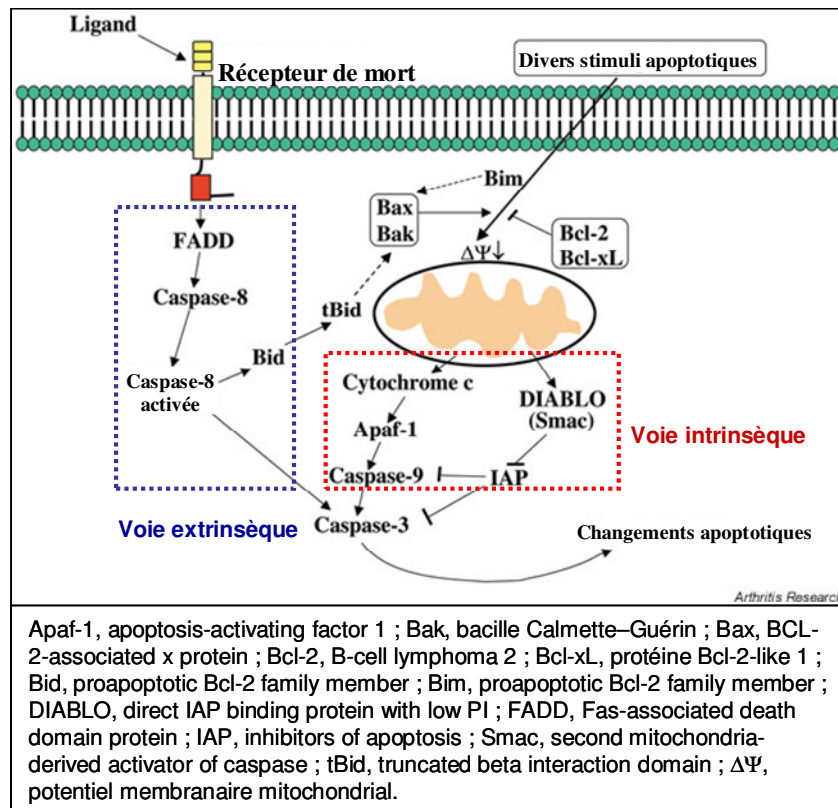


Figure 7 : Représentation des principales voies de l'apoptose (d'après Mak et Yeh, 2002³²¹).

4.2 Importance des glycosaminoglycanes dans le tissu de granulation

Le tissu de granulation ne possède pas les mêmes propriétés mécaniques que le tissu myocardique initial. Il n'est que temporaire et doit donc être remplacé par un tissu cicatriciel plus proche du tissu sain initial, ce qui correspond à la dernière étape de la cicatrisation : le remodelage tissulaire.

La transition du tissu de granulation en tissu cicatriciel vise notamment à remplacer la matrice riche en collagène III en une matrice riche en collagène de type I, en élastine et en protéoglycanes. Le tissu de granulation en formation contient principalement des glycosaminoglycanes non sulfatés, comme l'acide hyaluronique ²⁸⁷, alors que les protéoglycanes comme les héparanes sulfates en sont absents. Lorsque le tissu de granulation évolue jusqu'à l'étape de remodelage, la quantité d'acide hyaluronique diminue et les protéoglycanes réapparaissent. L'acide hyaluronique est produit essentiellement lors de la migration cellulaire, alors que l'arrivée des protéoglycanes correspond au moment où les cellules commencent à synthétiser du collagène. Le remodelage est caractérisé par une activité élevée des métalloprotéinases matricielles, couplée à une forte synthèse de collagène. Les facteurs de croissance liés aux héparanes sulfates sont ainsi protégés de cette forte activité protéolytique présente dans la réparation tissulaire. Leur libération recommence lorsque les cellules ont cessé de migrer. Les glycosaminoglycanes jouent donc également des rôles importants et sont hautement régulés lors de la réparation tissulaire ²⁸⁸.

4.3 Voie du TLR4 et remodelage myocardique

L'appellation LPS regroupe les lipopolysaccharides formant les principaux composants de la membrane externe des bactéries Gram-négatives et sont de forts stimulateurs de l'immunité innée de leur hôte. Chaque molécule est composée d'une partie hydrophile polyosidique et d'une ancre hydrophobe constituée de glycolipide appelée lipide A ³²². L'activation du système de reconnaissance du LPS entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et le TNF- α ¹⁷⁴. Ces cytokines pro-inflammatoires sont présentes dans le cœur consécutivement à l'infarctus ³²³, d'où l'utilisation fréquente de ce modèle d'étude dans les traitements *in vitro* pour mimer les conditions post-infarctus.

Le système de reconnaissance du LPS est constitué de 3 éléments : le *Toll-like Receptor 4* (TLR4), le récepteur CD14 (qui peut exister sous forme soluble) et la protéine accessoire MD-2³²⁴. Lorsque le LPS se trouve dans le milieu extracellulaire, il est capté par une protéine de liaison, la LPS Binding Protein (LBP). Le complexe LBP/LPS interagit alors avec un complexe trimoléculaire formé à la surface des macrophages par les protéines TLR4, CD14 et MD-2 (**Figure 8**). Suite à la formation de ce complexe et en particulier la partie lipide A du LPS, l'activation du récepteur TLR4 provoque une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires. Les souris déficientes en TLR4 ne répondent plus au LPS et résistent au choc endotoxique^{325, 326}. Cependant, la liaison LPS/TLR4 n'est pas suffisante pour provoquer une réponse complète au LPS, car le TLR4 doit être couplé à la molécule sécrétée MD-2 ainsi qu'au récepteur CD14³²⁷.

TLR4 est très exprimé dans le tissu myocardique chez l'Homme, le rat ou la souris. De même, les modèles de souris montrant un remodelage myocardique après ischémie et les patients souffrant de cardiomyopathie dilatée présentent une augmentation de l'expression de TLR4³²⁸. Les modèles d'ischémie-reperfusion provoquent une lourde réponse inflammatoire dans les tissus. Après ischémie-reperfusion myocardique, les souris déficientes en TLR4 montrent une diminution de la réponse inflammatoire, de l'infiltration tissulaire par les neutrophiles et de la taille de l'infarctus³²⁹. Cependant ce dernier effet ne semble pas lié à la balance MMPs/TIMPs³³⁰. L'inhibition de TLR4, par l'emploi d'analogues synthétiques de lipide A, réduit les dommages de l'ischémie-reperfusion et la production de marqueurs de l'inflammation, dans un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique chez la souris³³¹. Ces résultats suggèrent que TLR4 contribue à l'activation de la réaction inflammatoire dans le cœur après ischémie-reperfusion. De plus, l'activation du récepteur TLR4 est décrite comme médiatrice de l'apparition d'un remodelage maladadaptatif après infarctus³³². Toutefois, même si son rôle semble délétère, l'activation de TLR4 peut aussi s'avérer bénéfique puisqu'elle réduit l'apoptose dans les cardiomyocytes isolés de souris³³³.

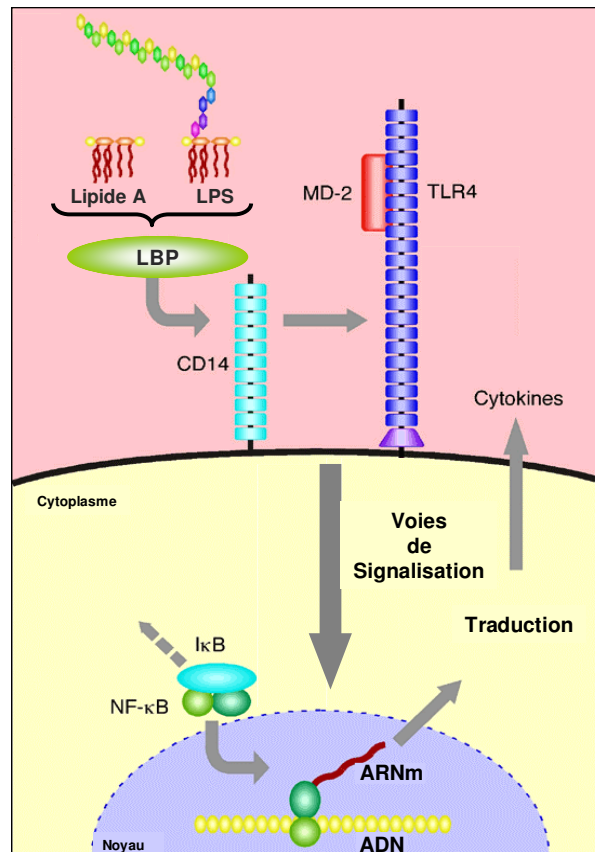


Figure 8 : Schéma du système de reconnaissance du LPS et des lipides A (d'après GlycoWord, <http://www.gak.co.jp/FCCA/glycoword/wordE.html>).

Bien que le LPS soit le principal ligand du récepteur TLR4, il existe d'autres ligands types lipide A pouvant activer TLR4. Ce sont des dérivés de LPS obtenus par un traitement à l'acide et à la chaleur, qui sont hautement toxiques, comme le diphosphoryl lipide A (DLA), ou qui aident à l'immunisation, comme le monophosphoryl lipide A (MLA)^{334, 335}. Cependant, il semble peu probable que ces agents activateurs soit naturellement présents dans le cœur après IM. La stimulation du TLR4 post-IM s'effectue donc par d'autres moyens.

Ce sont des composants de la MEC dégradée ou des cytokines pro-inflammatoires, qui s'avèrent être des ligands endogènes du récepteur TLR4, comme l'acide hyaluronique^{287, 336}, les héparanes sulfate³³⁷ et l'IL-1 β ³²⁸. Ainsi, chez la souris, certains ligands de type HS membranaire limitent la progression de la dilatation cardiaque après infarctus²⁹⁴, alors que l'IL-1 β est impliquée dans la progression du remodelage du ventricule gauche³³⁸. L'emploi de ligands endogènes ou d'antagonistes du TLR4 est donc une piste thérapeutique possible dans la prévention du remodelage myocardique délétère.

5 Synthèse

Le remodelage myocardique post infarctus est du à l'activité excessive des MMPs libérées au détriment des TIMPs par les cellules recrutées ou constitutives du tissu cardiaque endommagé et de ses zones bordantes. Il est constitué de 3 phases : (1) la phase inflammatoire ou cicatrisation précoce, (2) la phase de granulation ou phase de remodelage précoce et (3) la phase de remodelage tardif.

C'est un processus de cicatrisation sensé remplacer le tissu cardiaque lésé par un tissu cicatriciel dont les propriétés sont proches du tissu initial. Cependant, l'activation des MMPs post-IM peut s'avérer délétère et conduire à la synthèse d'un tissu qui ne peut retrouver ses caractéristiques originelles. En effet, les MMPs montrent une augmentation d'activité après infarctus qui correspond à une fenêtre spatiale et temporelle qui leur sont propres. Ainsi, la MMP-9 très présente dans la phase aiguë de l'IM correspondant à la phase de cicatrisation précoce, semble liée à la dilatation et à la dysfonction ventriculaire conduisant à un remodelage myocardique délétère pouvant entraîner le développement d'une IC.

L'étude de la balance entre les MMPs et les TIMPs au sein du myocarde après infarctus montre que ce sont des cibles thérapeutiques potentielles, notamment la MMP-9. Cependant le contrôle de leur expression, de leur activation, ainsi que leur site de relargage après IM, afin de limiter la perte de la qualité du tissu et de se rapprocher de sa composition initiale, reste à être établi et de plus amples études seront nécessaires pour y parvenir. L'emploi de molécules aux vertus cardioprotectrices telles que l'adénosine semble, pour moduler l'activité des MMPs, semble être une des pistes potentielles à examiner.

CHAPITRE IV : L'ADENOSINE, MODULATEUR DE LA FONCTION MYOCARDIQUE

1 Métabolisme de l'adénosine et ses principaux effets biologiques

1.1 Métabolisme de l'adénosine

L'adénosine (9- β -D-ribofuranosyl-6-aminopurine) est un nucléoside de type purine, qui est ubiquitaire, c'est-à-dire présent dans toutes les cellules de l'organisme (**Figure 9**). Son étude ³³⁹, celle de ses récepteurs, ainsi que les effets physiologiques et pharmacologiques liés à leur activation ³⁴⁰, ont fait l'objet de nombreuses recherches.

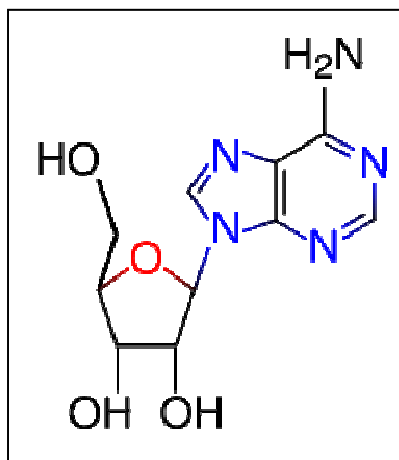


Figure 9 : Formule topologique de la molécule d'adénosine.

L'adénosine endogène est synthétisée à partir de l'hydrolyse de la S-adénosylhomocystéine (SAH) ou la déphosphorylation de l'adénosine monophosphate (AMP) (**Figure 10**), la seconde voie de synthèse étant la plus importante quantitativement ³⁴¹.

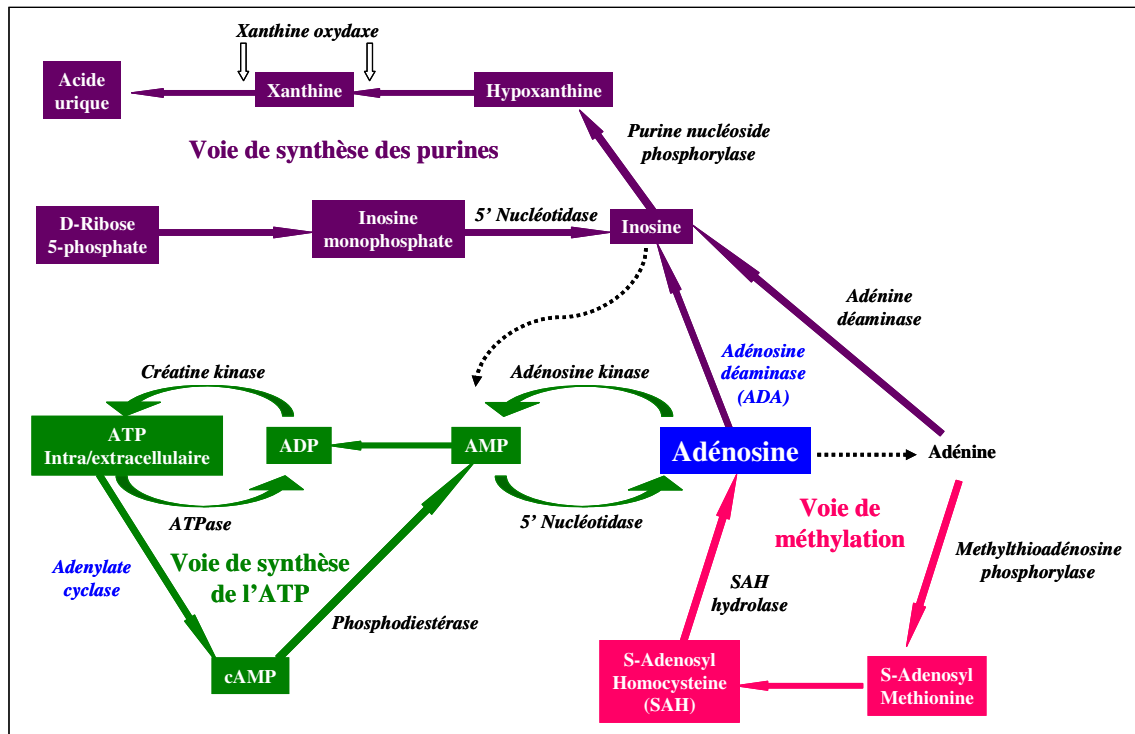


Figure 10 : Synthèse et métabolisme de l'adénosine dans le cœur (d'après Olsson et Pearson, *Physiol Rev*, 1990 ³⁴²).

La première voie est celle de la méthylation, où le catabolisme de la SAH par la S-adénosylhomocystéine hydrolase forme de l'homocystéine et de l'adénosine. La seconde voie est dépendante de l'ATP (adénosine triphosphate) qui est formée à partir de l'ADP (adénosine diphosphate) au cours de la glycolyse, mais surtout au cours de la respiration mitochondriale. L'ATP va former de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) par une adénylate cyclase et le cAMP va lui-même former de l'AMP grâce à une phosphodiesterase. L'adénosine est ensuite produite suite à l'hydrolyse de l'AMP par une enzyme à la fois intra et extracellulaire, l'endo ou ecto 5' Nucléotidase (ou CD73). L'adénosine est dégradée en inosine par

l'adénosine déaminase (ADA), et les nucléosides produits par la voie de synthèse des purines peuvent être recyclés en AMP.

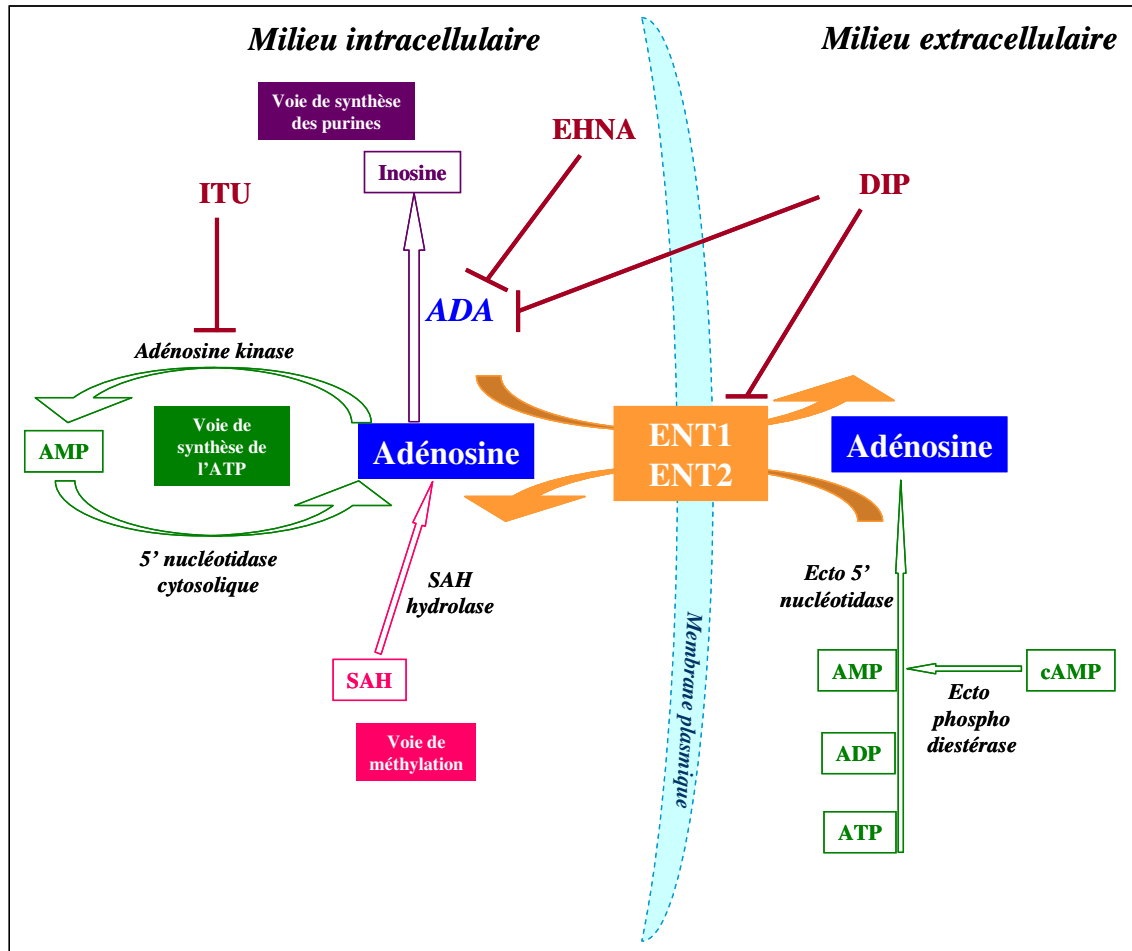


Figure 11 : Exemple de voies d'inhibition du transport et de la métabolisation de l'adénosine.

En agissant sur l'activité des enzymes qui la métabolisent, la dégradation de l'adénosine peut être limitée. L'inhibition de l'ADA par l'érythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl) adénine hydrochloride (EHNA)³⁴³ ou de l'adénosine kinase par l'iodotubéricidine (ITU)^{344, 345} tend à augmenter la concentration d'adénosine intracellulaire ainsi que sa demi-vie (**Figure 11**).

Les transporteurs membranaires appelés *equilibrative nucleoside transporters* (ENT) sont bidirectionnels, ils captent l'adénosine extracellulaire ou relarguent l'adénosine intracellulaire selon son gradient de concentration (**Figure 11**)³⁴⁶. Ces transporteurs peuvent être inhibés par des nucléosides mimant l'adénosine³⁴⁷ ou des substances non nucléosidiques tel que le dipyridamole (DIP)^{348, 349}. Le dipyridamole est aussi un vasodilatateur qui permet l'accumulation de l'adénosine dans le flux sanguin en inhibant l'ADA³⁵⁰.

Le blocage des voies d'inhibition du transport et du catabolisme de l'adénosine entraîne une élévation de la concentration en adénosine extracellulaire et une augmentation de la réponse à l'adénosine par ces récepteurs. Ainsi, pendant une hypoxie ou une ischémie, la consommation d'ATP augmente drastiquement et la rephosphorylation de l'adénosine par l'adénosine kinase est inhibée, ce qui entraîne une augmentation immédiate et conséquente de la concentration d'adénosine extracellulaire, autorisant la stimulation de ses récepteurs au site de son relargage³⁵¹.

1.2 Evaluation de la concentration d'adénosine

La demi-vie de l'adénosine entrant dans la circulation générale est extrêmement courte : inférieure à une seconde. Ce qui rend son administration difficile et contraint à effectuer des perfusions par voie intraveineuse de manière continue³⁵². En effet, l'adénosine délivrée dans la circulation sanguine est, immédiatement après sa libération, captée les érythrocytes et les parois des vaisseaux sanguins³⁵³, où elle est métabolisée en inosine sous l'influence de l'ADA. Ceci entraîne une dégradation rapide et continue de l'adénosine.

Les différentes techniques permettant de doser l'adénosine extracellulaire plasmatique font intervenir des agents bloquant les transporteurs membranaires, la formation extracellulaire et la dégradation de l'adénosine, afin de s'affranchir de tout artefact³⁵⁴. La concentration de l'adénosine plasmatique est de l'ordre de 50 nM chez un sujet sain³⁵⁵, cependant elle ne reflète par la concentration de l'adénosine au niveau des tissus interstitiaux. En effet, l'endothélium vasculaire se comporte comme une barrière imperméable pour l'adénosine vasculaire ou interstitielle et ces cellules activent sa dégradation. Par exemple : l'endothélium des artères coronaires de cobayes ne permet une accumulation d'adénosine qu'à partir de l'administration d'une concentration d'adénosine de 1 μ M³⁵⁶. De même, des

patients subissant des perfusions d'adénosine avant angioplastie, ne présentent pas un préconditionnement du myocarde à cause d'une faible distribution de l'adénosine à travers l'interstitium, cependant l'utilisation de DIP peut modérer cet effet ³⁵⁷. L'utilisation de sondes de microdialyse permet aussi de mesurer la concentration d'adénosine au niveau tissulaire ou intravasculaire, cependant les mesures peuvent être biaisées à cause des dommages dus à l'implantation des sondes, particulièrement lors d'examens impliquant des contractions musculaires ^{358, 359}.

1.3 Les principaux effets biologiques de l'adénosine

Bien que la demi-vie de l'adénosine soit courte, son spectre d'activité biologique est très large et touche divers systèmes ou organes vitaux, ce qui en fait une cible thérapeutique dans de nombreuses pathologies.

Au niveau du système nerveux central, l'adénosine (Ado) joue un rôle neuromodulateur ³⁶⁰ inhibant l'activité locomotrice et induisant un effet sédatif, anxiolytique et anti-convulsant (lutte contre l'épilepsie, la psychose, la maladie de Parkinson...) ^{361, 362}. De plus, elle est impliquée dans le phénomène de neuroprotection en cas de stress métabolique, telle qu'une ischémie cérébrale ^{363, 364}. Diverses études réalisées chez la souris ont montré des effets positifs de l'adénosine sur d'autres systèmes : (1) n'entraînant pas de résistance à l'insuline, elle joue un rôle dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline et s'avère être une cible thérapeutique potentielle dans le traitement du diabète de type 2 ou de l'obésité due à l'insulino-résistance ³⁶⁵ ; (2) elle semble nécessaire à la transduction du signal conduisant à la filtration glomérulaire du rein ³⁶⁶ ; (3) elle induit un rétrocontrôle négatif qui réduit et résout une inflammation localisée dans un tissu comme le foie, ou étendue suite à un choc septique ³⁶⁷.

L'utilisation de l'adénosine grâce à ses différents modes d'action suggère une résultante bénéfique pour l'organisme. Cependant, toujours chez la souris, son action est potentiellement délétère dans le traitement du glaucome, car elle implique l'augmentation de la pression intraoculaire ³⁶⁸. Il en est de même dans le système respiratoire, où l'Ado module l'activité d'un grand nombre de cellules immunitaires impliquées dans certaines maladies pulmonaires inflammatoires chroniques, telles que les mastocytes dans l'asthme ³⁶⁹. Elle

modifie ainsi la contraction des muscles lisses et la sécrétion de mucus dans les bronches et son inhalation par un malade souffrant d'asthme entraîne une broncho-striction suivie de difficultés respiratoires, alors que son effet est nul chez un individu sain^{370, 371}. De plus, son utilisation dans le cadre d'une thérapie anticancéreuse est à nuancer, car elle est susceptible, selon les voies d'activation impliquées et les lignées cellulaires étudiées, d'induire le phénomène d'apoptose ou de le réprimer³⁷²⁻³⁷⁴.

Les effets de l'adénosine peuvent être opposés selon le tissu ou le système traité. Ils sont dus à la stimulation de ses différents récepteurs, dont le fonctionnement est extrêmement complexe.

1.4 Adénosine : sources, effets vasculaires et cardioprotection

La déphosphorylation de l'AMP par l'ecto 5' Nucléotidase (ou CD73) est considérée comme la principale source d'adénosine interstitielle dans un tissu hypoxique, tel que le myocarde ischémique³⁷⁵, qui peut alors activer ses récepteurs. Cette enzyme est particulièrement exprimée à la surface cellulaire en cas d'hypoxie et en conditions inflammatoires^{376, 377}. En effet, suite à différents stress, l'adénosine est libérée dans le milieu extracellulaire à la fois par des mécanismes transcriptionnels et par des mécanismes non transcriptionnels³⁷⁸. Par exemple, l'hypoxie transitoire provoque des changements métaboliques par voie non transcriptionnelle (inhibition de l'adénosine kinase, relarguage de l'adénosine par ses transporteurs...) ³⁷⁸, alors que l'hypoxie chronique résulte en l'augmentation des transcrits des enzymes de surface de la voie de l'adénosine³⁷⁶ (**Figure 11**).

Les plaquettes sanguines contiennent de nombreux granules riches en ATP, ADP et AMP et leur activation, puis leur dégranulation entraînent une augmentation de la concentration en nucléotides extracellulaires qui peuvent être métabolisés en adénosine lors d'une inflammation ou d'une ischémie³⁷⁹ (**Figure 11**). Les premières études impliquant des cellules inflammatoires autres que les plaquettes comme une source de nucléotides datent du début des années 90 et concernent les neutrophiles activés. Elles témoignent d'un relarguage d'AMP extracellulaire lorsque ces cellules sont en coculture avec des cellules endothéliales³⁸⁰. Cependant des résultats plus récents montrent que c'est en fait l'ATP qui est relargué à la place de l'AMP, et qu'il est ensuite converti en AMP par une succession d'enzymes (**Figure**

11) situées à la surface des cellules endothéliales, le produit final obtenu étant l'adénosine^{381, 382}. Le relargage de l'ATP par les neutrophiles ne s'effectue pas par dégranulation, mais par transport *via* un hexamère de connexine 43^{383, 384}.

Au niveau vasculaire, l'adénosine est un antiagrégant plaquettaire et son injection par voie intraveineuse ou intra-artérielle, notamment intra-coronaire, entraîne une vasodilatation. De nombreuses études ont montré que l'administration d'adénosine par voie intraveineuse chez l'Homme augmente le rythme cardiaque^{385, 386}, ce qui semble en contradiction avec les résultats obtenus sur modèles animaux, où l'adénosine présente des propriétés vasodilatatrices avec diminution de la contractilité et de la fréquence cardiaques³⁸⁷. Cependant cet effet contraire chez les humains semble être en relation avec le système nerveux sympathique et l'influence de chémorécepteurs. En effet, l'administration d'adénosine par l'aorte en amont des chémorécepteurs carotidiens augmente le rythme cardiaque et la pression sanguine, alors qu'une injection en aval diminue ces paramètres³⁸⁸. Ces effets antagonistes ou complémentaires de l'adénosine semblent bénéfiques en cas d'ischémie ou d'exercice musculaire, où l'augmentation de l'adénosine extracellulaire induit une vasoconstriction générale, associée à une vasodilatation locale, ce qui permet une redistribution du flux sanguin vers le muscle ou le tissu concerné.

C'est à la fin des années 80 que les premières études sur les propriétés vasodilatatrices de l'adénosine chez l'Homme prennent leur essor, avec un modèle d'évaluation de la pression sanguine de l'avant-bras par l'artère brachiale couplé ou non à des contraintes physiques autorisant l'occlusion veineuse^{389, 390}. L'injection d'adénosine dans l'artère brachiale entraîne une vasodilatation rapide qui peut être inhibée par l'emploi d'inhibiteurs naturels de l'adénosine comme la caféine ou la théophylline³⁹⁰. Ce phénomène semble être dépendant du relargage de monoxyde d'azote (NO) par l'endothélium puisque l'utilisation d'inhibiteurs de la NO-synthase atténue la réponse provoquée³⁹¹. Cependant, d'autres études ne négligent pas la participation des récepteurs à l'adénosine^{392, 393}.

Le relargage d'adénosine endogène joue un rôle important dans les conditionnements pré- ou post-ischémie, qui se définissent par une brève occlusion artérielle sériée ou non, immédiatement après l'ischémie prolongée ou immédiatement après la reperfusion et qui permettent une réduction des dommages causés par l'ischémie-reperfusion³⁹⁴⁻³⁹⁶. Dans tous les modèles animaux étudiés auparavant, le conditionnement pré- ou post-ischémie associé à

l'adénosine endogène peut aller jusqu'à réduire la taille de l'infarctus de 50 à 70 %. Cet effet protecteur peut être reproduit par administration d'adénosine exogène ^{397, 398}. Cependant l'efficacité réelle de l'adénosine sur la réduction des dommages dus à l'ischémie-reperfusion semble liée à l'implication des récepteurs à l'adénosine ^{399, 400}.

Le phénomène de reperfusion après une ischémie peut entraîner une augmentation des dommages myocardiques ⁶¹. L'adénosine peut réduire ces dommages en prévenant la nécrose et l'apoptose des cardiomyocytes dans des modèles expérimentaux ⁴⁰¹. Sur un modèle canin d'ischémie-reperfusion, l'injection d'adénosine par voie intra-coronaire réduit la taille de l'infarctus et améliore la fonction ventriculaire. Cet effet semble dû à l'inhibition de l'activation des neutrophiles, qui empêche la formation de lésions endothéliales ³⁸⁸. Une étude sur des patients atteints d'un IM aigu subissant une angioplastie associée à l'injection d'adénosine par voie intra-coronaire montre une amélioration du flux sanguin et de la fonction ventriculaire, ainsi qu'un nombre significativement faible de complications cliniques suite à l'injection ⁴⁰². L'étude AMISTAD (Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine), montre que l'administration d'adénosine couplée à une thrombolyse effectuée chez des patients ayant subi un IM aigu, réduit de 33 % la taille de l'infarctus 6 jours après le traitement ⁴⁰³. L'étude de plus grande envergure AMISTAD II, où des patients subissant une thrombolyse ou une angioplastie ont reçu de l'adénosine par voie intraveineuse à faible ou à forte dose, a permis de confirmer ces résultats. Malgré l'absence de différence au niveau de la mortalité ou dans l'IC congestive à 6 mois, le groupe ayant reçu la forte dose d'adénosine a montré une diminution de la taille de l'infarctus à 5 jours ⁴⁰⁴. Une analyse effectuée postérieurement à cette étude montre que la mortalité est réduite si l'adénosine est reçue sous trois heures après l'infarctus ⁴⁰⁵.

Au niveau du cœur, l'adénosine est bradycardisante et peut donc être utilisée pour traiter les tachycardies supraventriculaires ⁴⁰⁶. En effet, elle inhibe l'adénylate cyclase et entraîne une hyperpolarisation des membranes cellulaires en favorisant l'ouverture des canaux potassiques. C'est une action identique à celle de l'acétylcholine, où l'adénosine s'oppose à l'augmentation de la contractilité cardiaque due aux catécholamines ⁴⁰⁷.

Les bénéfices de l'adénosine sur le système cardiovasculaire sont multiples, et son rôle dans la cardioprotection après ischémie myocardique, en dépit de quelques controverses à la fin des années 90 ⁴⁰⁸, n'est plus à démontrer ⁴⁰⁹, même si les mécanismes qui en découlent

sont encore mal définis ¹⁵. L'étude des effets de l'activation des différents récepteurs à l'adénosine permet de déchiffrer certains de ces mécanismes.

2 Les récepteurs à l'adénosine

Les récepteurs à l'adénosine sont au nombre de quatre : A1, A2a, A2b et A3. Ils présentent une répartition tissulaire spécifique et leurs voies d'activation se distinguent selon les protéines G qui leur sont associées (**Tableau 2**). L'étude de modèles animaux transgéniques réprimant ou surexprimant ces récepteurs ainsi que l'étude de leur spécificité face à divers agonistes et antagonistes ont permis la modulation de leur activité et en partie leur caractérisation.

Sous-type de récepteur à l'adénosine couplé aux protéines G	Sous unité de la protéine G	Localisation chromosomique	Activité adénylate cyclase	Agonistes	Antagonistes	Localisation élevée et intermédiaire *
A1	Gi/o	1q32.1	↓AMPc	CPA NECA ** (Sigma)	DPCPX (Sigma)	Cerveau, cœur, estomac, canal déférent, rate, aorte, œil, vessie, muscle squelettique, reins, foie, tissu adipeux
A2a	Gs	22q11.23	↑AMPc	CGS 2160 NECA ** (Sigma)	SCH 58261 (Sigma)	Striatum, nucleus accumbens, tubercule olfactif, cellules immunitaires, vaisseaux sanguins, poumons, cœur
A2b	Gs Gq/11	17p12-p11.2	↑AMPc	Il n'existe pas d'agonistes spécifiques connus NECA ** (Sigma)	MRS 1754 (Sigma)	Dans tous les tissus en faible densité
A3	Gi Gq/11	1p13.2	↓AMPc	IB-MECA NECA ** (Sigma)	PSB 10 (Tocris, Grande-Bretagne)	Testicules, poumons, reins, placenta, cerveau, cœur, rate, foie, utérus, vessie, jéjunum, aorte, colon proximal, œil

* Distribution des ARNm; ** NECA, 5'-(N-Ethylcarboxamido)adenosine = agoniste non spécifique des récepteur à l'adénosine; CPA, N6-cyclopentyladénosine; DPCPX, 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine; CGS 21680, 2-p-(2-Carboxyethyl)phenethylamino-5-N-ethylcarboxamidoadénosine; SCH 58261, 7-(2-phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine; MRS 1754, 8-[4-(((4-Cyanophenyl)carbamoylmethyl)oxy)phenyl]-1,3-di(n-propyl)xanthine; IB-MECA, 1-Deoxy-1-[6-(((3-Iodophenyl)methyl)amino)-9H-purin-9-yl]-N-methyl-β-D-ribofuranuronamide; PSB 10, 8-Ethyl-1,4,7,8-tetrahydro-4-methyl-2-(2,3,5-trichlorop henyl)-5H-imidazo[2,1-i]purin-5-one monohydrochloride.

Tableau 2 : Classification, localisation et propriétés des récepteurs à l'adénosine (d'après Fredholm BB et al. 2001, Jacobson KA et al. 2006, Muller CE 2003, ^{14, 410, 411}).

2.1 Généralités

Les premières études montrant que l'adénosine peut modifier la physiologie d'un organisme datent de 1929⁴¹². Elles ont donné suite à de nombreuses recherches où l'Ado a été utilisée comme un agent de stimulation⁴¹³, et qui ont mis en évidence l'implication de récepteurs spécifiques situés à la surface de la cellule permettant de transmettre un signal^{414, 415}.

Ces récepteurs sont dits purinergiques. Ils appartiennent à une famille composée de deux groupes : P1 pour les récepteurs activés par l'adénosine et P2 pour ceux activés par l'ATP⁴¹⁶. Selon leur action sur l'adénylate cyclase, les récepteurs P1 sont scindés en deux catégories : A1 pour son inhibition et A2 pour sa stimulation⁴¹⁷⁻⁴¹⁹. La catégorie des récepteurs A2 est subdivisée en deux groupes selon les propriétés de leur site de liaison : A2a pour une haute affinité pour l'adénosine et A2b pour une basse affinité^{420, 421}. Au début des années 90, un quatrième récepteur a été décrit : le récepteur à l'adénosine A3^{422, 423}.

Les quatre récepteurs à l'adénosine A1, A2a, A2b et A3 (respectivement A1AR, A2aAR, A2bAR et A3AR) ont été clonés à partir d'espèces différentes et leur structure est maintenant bien déterminée⁴¹⁰. Chez l'Homme, seuls les récepteurs A1 et A3 sont situés sur le même chromosome (**Tableau 2**). Pour une espèce définie, il existe peu d'homologie entre ces différents récepteurs. De plus, les mêmes sous-types possèdent eux aussi une faible homologie entre différentes espèces. Cette dissemblance permet d'expliquer les différences de puissance et de spécificité des ligands de ces récepteurs intra et inter espèces^{340, 424}. Ceci est important pour interpréter des résultats souvent discordants entre différentes espèces.

Les quatre sous-types de récepteurs de l'adénosine ont une conformation commune : ce sont des protéines comprenant 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G, avec leur partie N-terminale exposée dans le milieu extracellulaire⁴²⁵. Les protéines G sont hétérotrimériques : elles possèdent les sous-unités G α et G β/γ . Il existe 16 isoformes α , 5 isoformes β et 14 isoformes γ ⁴²⁶. Elles sont responsables de la transduction du signal véhiculé par les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), après fixation d'un ligand. Une fois activées, les protéines G interagissent avec différentes classes d'effecteurs, dont les enzymes membranaires adénylate cyclase et phospholipase C (PLC), impliquant la production de

seconds messagers indispensables à la transmission du signal à l'intérieur de la cellule. Il existe de nombreux seconds messagers : par exemple, la phospholipase C clive le phosphatidyl-inositol-4,5-diphosphate (PIP2) en deux seconds messagers : l'inositol-triphosphate (IP3) et le diacylglycérol (DAG). L'IP3 se lie à des canaux calciques du réticulum endoplasmique et permet d'augmenter la concentration intracytoplasmique en calcium et le DAG favorise l'ouverture de canaux calciques membranaires en agissant sur la protéine kinase C (PKC). L'AMPc produit à partir d'ATP grâce à l'adénylate cyclase membranaire, est aussi un second messenger qui agit sur la protéine kinase A (PKA), responsable de l'activation de nombreuses voies de signalisation.

Selon leur activité, les protéines G sont réparties en sous-classes. Les principales sous-classes impliquées dans la signalisation des récepteurs à l'adénosine sont : G_s pour une stimulation de l'adénylate cyclase et G_i pour son inhibition, la protéine G olfactive G_{olf} qui stimule aussi l'adénylate cyclase, G_o qui agit sur l'ouverture des canaux potassiques et $G_{q/11}$ qui permet l'activation de la phospholipase C^{340, 410, 427, 428}. Chaque récepteur à l'adénosine a donc sa spécificité cellulaire et active des voies de signalisation différentes. Les voies majeures sont représentées **Figure 12**. Dans tous les cas, les voies finales d'activation sont classiques (MAPK, NF- κ B, CREB), néanmoins les réponses intracellulaires dues aux récepteurs peuvent varier en fonction de leur localisation, des conditions de leur stimulation, ou encore de l'environnement¹⁴.

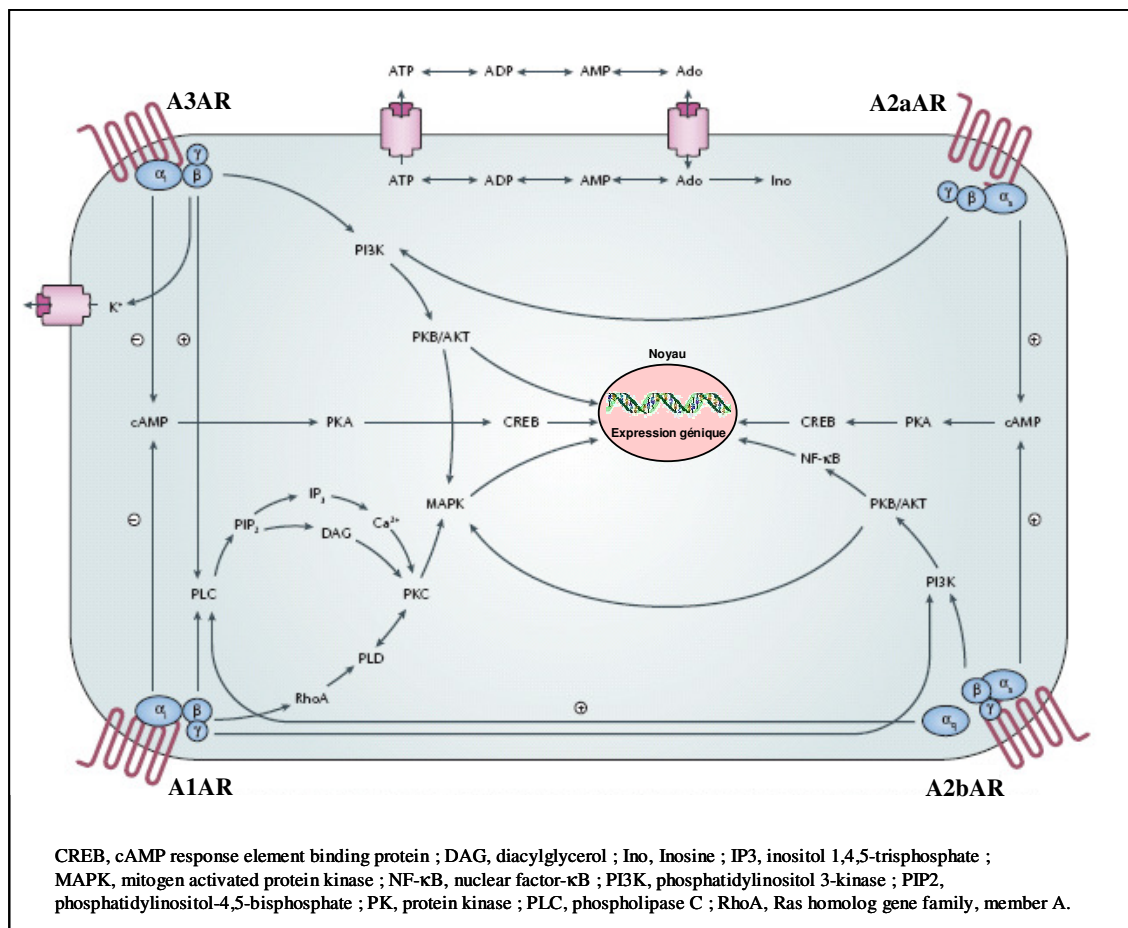


Figure 12 : Voies principales d'activation des récepteurs à l'adénosine
(d'après Jacobson KA et al. 2006¹⁴).

La troisième boucle intracellulaire et la partie C-terminale du récepteur A1 contribuent au couplage avec les protéines G_i . Cependant, selon la nature du ligand employé, les classes G_s et $G_{q/11}$ peuvent également être activées. Le couplage du récepteur A2a avec G_s se fait uniquement avec sa troisième boucle intracellulaire, il peut aussi être associé à G_{olf} . Le récepteur A2b est principalement couplé à G_s et peut activer la voie de la phospholipase C par $G_{q/11}$. Le récepteur A3 inhibe l'adénylate cyclase *via* G_i et peut être couplé à $G_{q/11}$ (**Tableau 2** page 100).

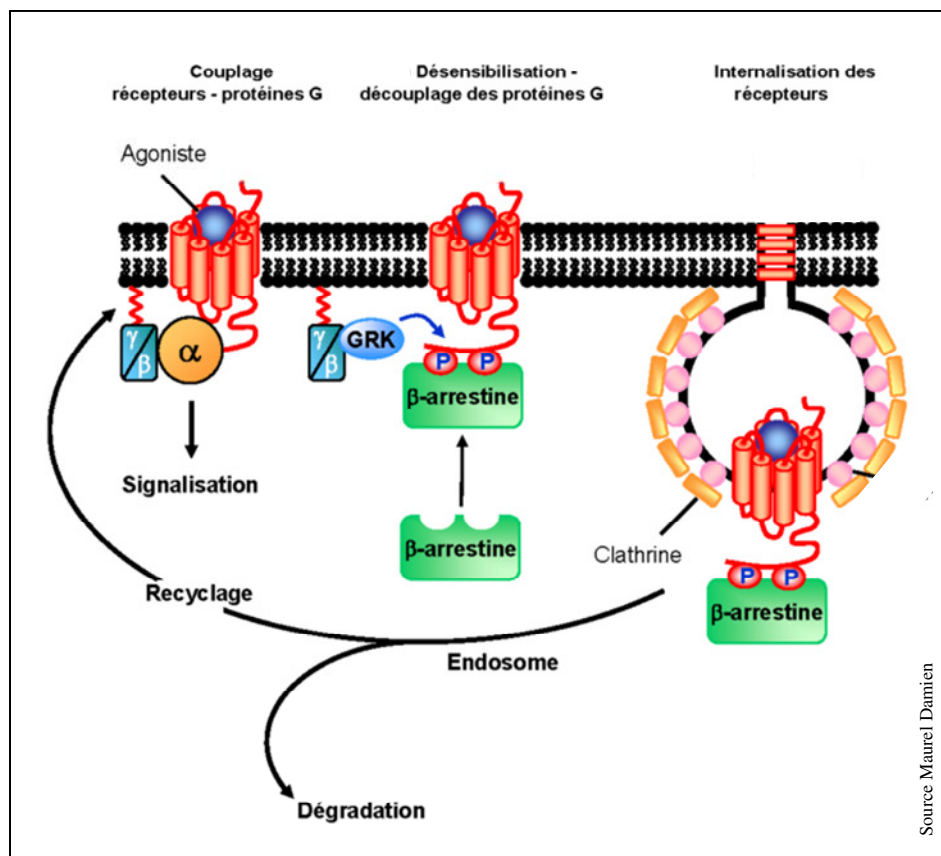


Figure 13 : Désensibilisation et internalisation des récepteurs couplés aux protéines G.

Dans la cellule, l'activation prolongée d'un récepteur par son ligand se traduit par une diminution de l'affinité de ce récepteur pour ce ligand, par une baisse de son couplage aux protéines G et par une diminution du nombre de récepteurs à la surface cellulaire. C'est le phénomène de désensibilisation, au cours duquel les GPCR réagissent à une activation par un agoniste en s'internalisant⁴²⁹. Quand le ligand se lie à son récepteur, il active les protéines G. Les protéines kinases des récepteurs couplés aux protéines G (GRK) phosphorylent ce récepteur qui se découple fonctionnellement des protéines G. Son affinité pour les protéines β-arrestines augmente, lesquelles vont se fixer sur le récepteur et empêcher toute nouvelle activation par d'autres protéines G. De plus, les β-arrestines peuvent se lier avec la clathrine pour permettre une endocytose du récepteur. Après internalisation dans des endosomes, soit des phosphatases permettent le recyclage des récepteurs avec une réexposition sur la membrane, soit ils sont redirigés vers des lysosomes où ils seront dégradés, réduisant ainsi le nombre de récepteurs exprimés à la surface de la cellule (**Figure 13**).

La phosphorylation ou la palmitoylation de la région C-terminale ainsi que la phosphorylation de la troisième boucle intracellulaire des récepteurs à l'adénosine sont impliquées dans leur désensibilisation et leur internalisation^{430, 431}. Ce phénomène a été démontré pour les quatre sous-types de récepteurs à l'adénosine⁴³²⁻⁴³⁴. La désensibilisation réduit l'activité des récepteurs et joue un rôle dans la durabilité, l'intensité et la qualité du signal. Chaque récepteur à l'adénosine a une régulation propre : A1AR est difficilement phosphorylé, d'où son internalisation très lente et sa demi-vie d'environ sept heures ; en revanche, le phénomène dure moins d'une heure pour les récepteurs A2aAR et A2bAR, et seulement quelques minutes pour A3AR. Par ailleurs, la désensibilisation d'A3AR est si rapide qu'elle équivaut à un blocage du récepteur par un antagoniste⁴³⁵.

2.2 *Le récepteur à l'adénosine A1*

Le récepteur A1 à l'adénosine est fortement exprimé dans le cerveau (cortex, cérébellum, hippocampe) et les cardiomyocytes⁴³⁶.

Le récepteur A1 a été le plus étudié et le mieux caractérisé dans le système cardiovasculaire, surtout dans des modèles de souris transgéniques. L'élimination du récepteur A1 dans un modèle de souris knock-out n'a pas d'effet en conditions physiologiques normales. Cependant, la souris dépourvue d'A1AR résiste moins aux dommages causés en cas d'ischémie-reperfusion myocardique^{437, 438}, contrairement aux souris surexprimant A1AR^{439, 440}. De même, en phase de conditionnement pré-ischémique, le récepteur A1 est activé dans les tissus rénaux et cérébraux afin de prévenir les dommages liés au phénomène d'ischémie-reperfusion^{441, 442}. La stimulation d'A1AR favorise l'ouverture des canaux potassiques. Ceci résulte, au niveau cardiaque, en une diminution du rythme, de la contractilité et de la conduction cardiaques, ainsi qu'en une réduction de l'excitabilité neuronale et de la libération de neurotransmetteurs. L'utilisation d'agonistes d'A1AR permet de diminuer la fréquence cardiaque et la contractilité atriale, ce qui entraîne un retour à la normale du rythme cardiaque chez les patients souffrant de tachycardie supraventriculaire paroxystique⁴⁴³.

Des antagonistes d'A1AR sont étudiés dans le traitement de l'anxiété, la démence ou de la dépression ⁴⁴⁴. La perte d'A1AR chez la souris knock-out entraîne des signes d'hyperalgie ⁴⁴⁵, alors que l'utilisation d'agonistes d'A1AR chez des patients limite la douleur causée par des migraines en limitant la vasoconstriction ⁴⁴⁶. Les neutrophiles humains expriment A1AR à leur surface, ce qui facilite leur chimiotactisme et leur adhésion à l'endothélium ⁴⁴⁷. En cas de dommages pulmonaires, A1AR semble avoir un rôle protecteur en limitant le phénomène de remodelage et d'inflammation ⁴⁴⁸. Les agonistes d'A1AR sont également considérés comme des candidats potentiels dans le traitement de l'obésité due à une résistance à l'insuline ³⁶⁵.

Comme analogue de l'adénosine, le CPA (N6-cyclopentyladénosine) est un exemple d'agoniste avec une forte puissance et une grande sélectivité pour A1AR et la molécule DPCPX (8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine) montre une activité antagoniste sélective pour ce récepteur (**Tableau 2** page 100).

2.3 Le récepteur à l'adénosine A2a

Le récepteur A2a, surtout présent dans le striatum et le tubercule olfactif ⁴⁴⁹, est également distribué dans les organes périphériques ^{436, 450}.

L'activation d'A2aAR est vasodilatatrice ⁴⁵¹ et inhibe l'agrégation plaquettaire ; ses agonistes sont donc des agents antithrombotiques potentiels suite à un infarctus du myocarde ⁴⁵². Cet effet est donc bénéfique en cas d'ischémie myocardique et permet aussi de contribuer à améliorer le flux coronaire ⁴⁵³. La réduction des dommages tissulaires causés par le phénomène d'ischémie-reperfusion myocardique est aussi dépendante de l'activation d'A2aAR, qui conduit à l'inhibition de l'accumulation et de l'apoptose des neutrophiles au sein du tissu cicatriciel ^{454, 455}. En annulant l'action des cellules immunitaires, l'activation d'A2aAR résulte en un effet anti-inflammatoire dans de nombreux tissus ⁴⁵⁶ : par exemple, en inhibant l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium ^{457, 458} et la dégranulation par les mastocytes pulmonaires humains ⁴⁵⁹. L'A2aAR joue donc un rôle important dans la cardioprotection, puisque son activation en phase de conditionnement post-ischémique entraîne une diminution de la réaction inflammatoire leucocytaire ^{460, 461}. En effet, l'inflammation est une composante majeure du remodelage myocardique après ischémie-

reperfusion et son inhibition par l'utilisation d'agonistes d'A2aAR permet d'améliorer la fonction cardiaque dans des modèles porcine et murin d'infarctus^{462, 463}. De plus, des modèles de souris transgéniques développant une dysfonction systolique ventriculaire gauche suite à la surexpression de TNF- α voient l'expression du récepteur A2a diminuer de 50 %⁴⁶⁴, ce qui montre le lien étroit entre l'expression de ce récepteur et la production de cytokines dans le cœur. Cependant, de récentes études dans des modèles d'ischémie myocardique chez le rat montrent des résultats contradictoires avec ceux obtenus sur les autres espèces : l'utilisation d'agonistes d'A2aAR en prétraitement à une ischémie est sans effet, alors qu'un prétraitement avec des antagonistes communs à A2a et A2b bloque l'effet cardioprotecteur dû au récepteur A1⁴⁶⁵.

L'élimination du récepteur A2a chez la souris knock-out entraîne une augmentation de l'anxiété, de l'agressivité et de la pression sanguine⁴⁶⁶, ainsi qu'une augmentation de la réponse aux stimuli inflammatoires³⁶⁷. De plus, le blocage d'A2aAR a un effet antidépresseur suggérant que l'utilisation de ses antagonistes pourrait s'avérer utile dans le traitement de la dépression⁴⁶⁷. L'inactivation d'A2aAR protège contre les dommages neuronaux dus à une ischémie cérébrale^{468, 469}. Cependant, chez la souris nouveau-née, la délétion d'A2aAR augmente les dommages cérébraux consécutifs à une ischémie⁴⁷⁰. De plus, l'utilisation d'agonistes d'A2aAR protège les tissus périphériques, en particulier les reins, suite à une ischémie^{378, 471}. Le récepteur A2a semble être responsable du phénomène d'excitation due à la caféine⁴⁷². Sur des lignées cellulaires de mélanome, la voie de l'apoptose est induite par la stimulation d'A2aAR³⁷³.

Un des agonistes sélectifs pour le récepteur A2a est le CGS 21680 (2-p-(2-Carboxyéthyl) phénéthylamino-5-N-éthylcarboxamidoadénosine) et le plus puissant antagoniste est le SCH 58261 (7-(2-phényléthyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine) (**Tableau 2** page 100).

2.4 Le récepteur à l'adénosine A2b

Le récepteur à l'adénosine A2b est distribué dans l'ensemble du corps mais en faible densité^{436, 473, 474}.

Les modèles de souris knock-out pour ce récepteur présentent une faible mais significative augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires en conditions basales ⁴⁷⁵. Des modèles avec des délétions ciblées d'A2bAR pour des cellules comme les macrophages ou les cellules musculaires lisses ont également vu le jour, mettant en évidence son rôle protecteur contre l'inflammation ^{475, 476}. Son expression dans le rein et dans des lignées de cellules rénales laisse supposer une implication dans la croissance et la prolifération cellulaires ^{477, 478}. La dégranulation de mastocytes humains et canins étant due à l'activation d'A2bAR ^{370, 479}, l'utilisation d'antagoniste d'A2bAR dans le traitement de l'asthme est alors devenue une cible thérapeutique potentielle ⁴⁸⁰. Le développement d'antagonistes d'A2bAR est aussi envisagé dans le traitement du diabète, car l'utilisation d'agonistes non spécifiques des récepteurs à l'adénosine augmente la production de glucose chez les hépatocytes de rats *via* le récepteur A2b ⁴⁸¹. Le récepteur A2b est impliqué dans le remodelage du tissu pulmonaire après réaction inflammatoire ⁴⁸². La stimulation d'A2bAR supprime la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages de souris traités par l'INF γ , ils sont désactivés ⁴⁸³. Le remodelage myocardique délétère est limité par l'utilisation de la voie d'A2bAR ^{484, 485}.

Bien que son affinité pour le NECA (5-(N-éthylcarboxamido) adénosine) soit relativement élevée, il n'existe pas d'agoniste sélectif pour le récepteur A2b. En revanche, la molécule MRS 1754 (8-[4-[(4-Cyanophényl) carbamoylméthyl] oxy] phényl]-1,3-di (n-propyl) xanthine) est un antagoniste sélectif pour le récepteur A2b (**Tableau 2** page 100).

2.5 Le récepteur à l'adénosine A3

Le récepteur A3 diffère des autres récepteurs par sa répartition dans les tissus et sa pharmacologie très variables entre les espèces ^{486, 487}.

L'activation du récepteur A3 peut provoquer une résistance à l'ischémie et induire un phénomène de cardioprotection ^{395, 488, 489}. En effet, après ischémie-reperfusion, l'activation d'A3AR semble avoir des effets bénéfiques à la fois en phase de conditionnements pré-et post-ischémiques dans les modèles humains et animaux ^{15, 490}. Chez le lapin et le chien, l'activation d'A3AR confère une protection contre l'ischémie myocardique après reperfusion ^{491, 492, 493}. La surexpression d'A3AR chez la souris à un effet identique ⁴⁹⁴, cependant si elle

est trop importante, elle peut conduire au développement d'une cardiomyopathie ⁴⁹⁵. Les résultats obtenus sur les modèles de souris knock-out pour A3AR sont très contrastés. De façon étonnante, une souris avec une délétion globale pour A3AR possède aussi une résistance aux dommages causés par l'ischémie myocardique ⁴⁹⁶⁻⁴⁹⁸. L'hypothèse étant que les mastocytes, qui sont les cellules exprimant le plus A3AR dans le tissu myocardique, ne peuvent plus s'activer par dégranulation *via* A3AR et ainsi provoquer une réaction inflammatoire qui endommagerait le myocarde. Ces résultats corroborent aussi ceux selon lesquels l'activation d'A3AR serait délétère et induirait l'apoptose cardiomyocytaire chez le rat et conduirait ainsi à endommager le tissu cardiaque ^{498, 499}. Une même étude chez la souris knock-out avec activation et délétion d'A3AR montre des propriétés analogues ⁵⁰⁰, cependant, les résultats suggèrent un phénomène de mécanisme compensatoire avec les autres récepteurs à l'adénosine. Le niveau d'expression du récepteur A3 étant faible dans les cardiomyocytes, son effet délétère ou cardioprotecteur est susceptible d'être véhiculé de manière indirecte, par exemple par la modulation des cellules immunitaires où il est fortement exprimé. Une étude plus récente sur un modèle de souris knock-out pour A3AR ne montre aucune tolérance suite à une ischémie myocardique, de plus elle révèle que l'effet cardioprotecteur d'une activation par des agonistes d'A3AR suite à un infarctus n'est pas dû aux mastocytes ⁵⁰¹. Dans le processus inflammatoire, l'activation d'A3AR permet de diminuer la production d'IL-6 mais pas de TNF- α par les cardiomyocytes de rat ^{502, 503}.

Dans les désordres inflammatoires, l'A3AR est impliqué dans la réaction allergique chez la souris où son activation favorise la dégranulation des mastocytes ^{504, 505}. Bien que, comme expliqué précédemment, le récepteur A2b soit connu pour induire l'activation de l'adénosine des mastocytes humains et canins, un rôle du récepteur A3 ne peut être totalement écarté ^{479, 506}. De plus, l'ARNm du récepteur A3 est présent, bien qu'à de faibles concentrations, dans les mastocytes de poumon humain, ce qui ne permet pas d'exclure l'hypothèse que le récepteur A3 soit impliqué dans l'activation du mastocyte par l'adénosine ⁵⁰⁷. Les études effectuées sur des souris dépourvues d'A3AR démontrent un rôle clef pour ce récepteur dans l'inhibition de la dégranulation des neutrophiles induite par LPS ou TNF- α ^{508, 509}. De plus, l'A3AR influencerait la migration et le chimiotactisme des neutrophiles en fonction de la concentration d'ATP extracellulaire dans les interactions neutrophiles-endothélium ⁵¹⁰. Chez la souris, le récepteur A3 est impliqué dans la régulation du flux coronaire et dans le contrôle de la pression intraoculaire ^{340, 368}, et l'emploi d'antagonistes sélectifs ou la délétion d'A3AR protège contre l'insuffisance rénale ⁵¹¹. Chez le chat, l'emploi

d'agonistes d'A3AR protège contre l'apoptose et les dommages des tissus pulmonaires après reperfusion ⁵¹². Bien qu'il soit faiblement exprimé dans le tissu cérébral ^{436, 513}, le récepteur A3 activé affaiblit le système locomoteur de la souris ⁵¹⁴, cependant l'administration chronique d'agonistes spécifiques protège contre les dommages d'une ischémie cérébrale chez la gerbille ⁵¹⁵. L'activation du récepteur A3 dans les lignées cellulaires cancéreuses joue un rôle dans le cycle cellulaire, néanmoins elle est paradoxale car elle induit ou atténue le phénomène d'apoptose ^{372, 373, 516}. Se servir du récepteur A3 comme cible dans des traitements anticancéreux est donc à prendre avec précaution.

L'IB-MECA (1-Déoxy-1-[6-[(3-Iodophényl)méthyl]amino]-9H-purin-9-yl]-N-méthyl-β-D-ribofuranuronamide) est un agoniste puissant et sélectif d'A3AR et le PSB 10 (8-éthyl-1,4,7,8-tétrahydro-4-méthyl-2-(2,3,5-trichlorophényl)-5H-imidazo [2,1-i] purin-5-one mono hydro chloride) est un de ses antagonistes sélectifs (**Tableau 2** page 100).

3 Synthèse

L'adénosine est une molécule ubiquitaire, dont la demi-vie est inférieure à une seconde. Cependant, sa concentration extracellulaire augmente au niveau vasculaire ou interstitiel lors d'une ischémie, d'une inflammation ou d'une occlusion veineuse due à un exercice physique. Cela lui confère des propriétés protectrices au niveau des tissus, en particulier dans la cardioprotection après ischémie myocardique, même si les mécanismes qui en résultent sont encore mal définis. La déphosphorylation de l'AMP par l'ecto 5' Nucléotidase est considérée comme la principale source d'adénosine interstitielle dans un tissu hypoxique.

L'adénosine possède quatre récepteurs : A1, A2a, A2b et A3, qui sont couplés aux protéines G. Leur stimulation par l'adénosine engendre des mécanismes divers et complexes au niveau cardiovasculaire. Ainsi A1AR est impliqué dans les effets bénéfiques du conditionnement pré-ischémique et la diminution du rythme cardiaque ; A2aAR est vasodilatateur, il favorise à la fois le conditionnement post-ischémique et la réponse inflammatoire dans le cœur ; A2b possède des propriétés vasodilatatrice ; et enfin, A3AR répond positivement aux deux types de conditionnements pré- et post-ischémique.

Les propriétés de l'adénosine en termes de cardioprotection font de cette molécule un agent thérapeutique de choix dans le traitement des pathologies cardiovasculaires et dans le développement d'agonistes et d'antagonistes spécifiques de ses récepteurs dans le domaine de la pharmacologie.

MATERIELS

&

METHODES

1 Culture cellulaire

Les réactifs ont été acquis chez Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique), sauf mention contraire.

Les cellules primaires ainsi que les lignées de cellules utilisées pour les manipulations sont cultivées dans du milieu de culture identique au milieu « complet » (voir composition ultérieurement) mais supplémenté avec 1 % de sérum de veau fœtal (SVF ; Eurobio, Les Ulis, France) décomplémenté, car le SVF contient la protéine MMP-9 qui pourrait interférer avec nos résultats expérimentaux.

Pour chaque condition expérimentale, des surnageants de culture dépourvus de cellules sont prélevés puis conservés avec des inhibiteurs de protéases et de l'albumine sérique bovine (BSA) à 0,2 % en concentration finale, afin de prévenir la dégradation de la MMP-9⁵¹⁷. Les cellules sont lysées dans du TriReagent™ afin d'extraire les ARN totaux. Les échantillons sont stockés à – 80 °C jusqu'à utilisation.

La cytotoxicité de chaque traitement est vérifiée à l'aide du Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Vilvoorde, Belgique), où l'activité de l'enzyme lactate déshydrogénase (LDH), relarguée dans le surnageant en cas de rupture de la membrane cellulaire, est mesurée. Aucun des traitements employés ne s'est avéré cytotoxique.

Afin de s'assurer que les manipulations ont été réalisées dans des conditions dépourvues d'endotoxines contaminante pouvant activer le TLR4, chaque solution ou réactif employés ont été testés par le kit E-TOXATE®.

1.1 Lignée promonocytaire THP-1

1.1.1 Mise en culture

Les cellules THP-1 (American Type Culture Collection, Middlesex, UK) sont issues d'un patient souffrant d'une leucémie monocyttaire aiguë. Nous les avons donc utilisées à titre de modèle d'une cellule monocyttaire. Le temps de doublement de ces cellules est court, environ 26 heures. Ce sont des cellules qui restent en suspension sous forme de monocytes, et qui deviennent adhérentes une fois différenciées en macrophages après 48 heures d'un traitement avec 150 nM de phorbol myristate acétate (PMA).

Les cellules de la lignée monocyttaire THP-1 sont mises en culture dans un incubateur à 37 °C et 5 % CO₂. Elles sont amplifiées dans un milieu de culture usuel : RPMI 1640 contenant 2 mM d'ultraglutamine (Lonza, Bruxelles, Belgique) supplémenté avec 1 % de pénicilline-streptomycine (Lonza), 1 % de solution d'acides aminés non essentiels (Lonza), 1 % de pyruvate de sodium (Lonza) et 10 % de SVF, ce milieu est dit « complet ». Le milieu de culture est renouvelé tous les 2 jours.

1.1.2 Manipulations effectuées sur les cellules THP-1

1.1.2.1 Traitements

Les THP-1 sous forme monocyttaire sont prétraités 15 minutes avec différentes molécules avant leur différenciation en macrophages par 150 nM de PMA pendant 48 heures : 10 µM d'EHNA, de l'adénosine (0,01 à 100 µM), des agonistes ou antagonistes de l'Ado (0,1 à 10 µM) (**Tableau 2** page 100), 10 µM de DIP. Les conditions contrôles ont été réalisées en présence d'un prétraitement de 0,3 % de diméthyl sulfoxyde (DMSO), qui est le solvant de reconstitution de l'EHNA. Les THP-1 différenciés en macrophages après 24 heures sont aussi stimulés durant 24 heures supplémentaires avec 100 ng/mL de lipopolysaccharide (LPS), 10⁻⁷ M de N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), 10 µg/ml d'acide hyaluronique (HA),

10 µg/ml d'héparane sulfate (HS) ou en milieu hypoxique grâce à l'utilisation du système anaérobie GasPak⁵¹⁸ (GasPak 100/GasPak-Pouch, avec dégagement de 15 % CO₂ en 24 heures ; BD Biosciences, Erembodegem-Aalst, Belgique).

1.1.2.2 Transfection et ARN interférants

Nous avons utilisé la technique de Nucléofection[®] pour effectuer des transfections transitoires sur nos cellules. Les autres techniques de transfection plus classiques utilisant par exemple des vecteurs lipidiques ne donnant pas d'efficacité satisfaisante. Le principe de la Nucléofection[®] est de transférer un vecteur d'expression (siARN, plasmide...) au cœur du noyau des cellules par électroporation. L'appareillage utilisé est le Nucleofector[®] (Amaxa Inc., Allemagne). Cet appareil possède des programmes électriques adaptés à nos types cellulaires qui, couplés à des tampons spécifiques de nos cellules, favorisent la pénétration de nos vecteurs d'intérêt en limitant la mort cellulaire.

Les transfections transitoires s'effectuent sur des cellules THP-1 sous forme monocyttaire. Elles sont accomplies grâce au NucleofectorTM et au kit NucleofectorTM solution V (Amaxa Inc., Cologne, Allemagne), selon les recommandations du fournisseur. Les cellules sont transfectées avec 1,4 µg de siARN correspondant au transcrite de chaque récepteur à l'adénosine. Les conditions de contrôle sont effectuées sur des cellules subissant la Nucléofection[®] sans être mises en présence de siARN.

48 heures après transfection, l'inhibition des transcrits codants pour nos gènes d'intérêt par les siARNs est maximale. C'est à ce moment qu'est effectué le prétraitement de 15 minutes avec le solvant de l'EHNA ou 10 µM d'Ado/EHNA, suivi de la phase de différenciation de 48 heures par le PMA.

Pour la synthèse de siARN spécifiques de la forme humaine des récepteurs à l'adénosine, nous avons utilisé la banque de siARN Qiagen (Venlo, Pays-Bas). Nous avons sélectionné des séquences cible de l'ARNm codant pour les récepteurs à l'adénosine et obtenu les siARNs suivants : siARNs A2a, 5'-CAGGAGTGTCTGATGATTCA-3' ; siARN A2b, 5'-CACGTATCTAGCTAATATGTA-3' et siARN A3, 5'-CCCTATCGTCTATGCCTATAA-3'.

1.1.2.3 Migration cellulaire

La capacité migratoire des THP-1 sous forme monocyttaire a été étudiée à l'aide d'un système Transwell® avec des pores membranaires de 5 µm en plaque 24 puits (Corning®, Bornem, Belgique). Les membranes sont recouvertes avec une solution de gélatine B à 2 % (Sigma) et séchées à température ambiante pendant 2 heures. Une solution à 10 ng/ml de Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1 (PeproTech., Londres, UK) est disposée dans le compartiment inférieur du Transwell®, afin d'attirer les cellules déposées dans sa partie supérieure.

Les THP-1 sous forme monocyttaire sont cultivés 24 heures dans un milieu dépourvu de sérum et d'antibiotiques en présence ou non de 10 µM d'Ado/EHNA. Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes avec ou sans les inhibiteurs de MMPs : l'inhibiteur synthétique GM6001 (10 nM ou 1 µM) ou l'inhibiteur endogène de la MMP-9, TIMP-1 (10 ng/ml, R&D Systems™, Oxon, UK) ; avant d'êtreensemencées à raison de $7,5 \times 10^4$ cellules par puits. Après 24 heures de migration, les cellules ayant traversé la membrane sont récoltées et lysées. Leur contenu en acides nucléiques est ensuite coloré avec le CyQuant GR® dye (Invitrogen, Merelbeke, Belgique) pendant 15 minutes. La fluorescence est mesurée par le lecteur de microplaque POLARstar Optima (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) avec une longueur d'onde d'excitation de 492 nm et une longueur d'onde d'émission de 520 nm. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle au nombre de cellules ayant traversé la membrane du Transwell®.

1.2 Isolement et traitements des neutrophiles primaires humains

1.2.1 Purification des neutrophiles primaires humains

Les neutrophiles primaires humains sont isolés à partir du sang total de volontaires sains prélevé dans des tubes héparinés par la technique d'isolement classique basée sur la sédimentation du Dextran/Ficoll. Le gradient de Ficoll (Lymphoprep de MP Biomedicals, Illkirch, France) permet de séparer les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC

pour peripheral blood mononuclear cells) des neutrophiles. Le sang frais est dilué dans du tampon salin phosphate (PBS pour phosphate buffered saline, Lonza) avec Ca^{2+} et Mg^{2+} (1/1, V/V), le Ficoll est ensuite ajouté puis l'ensemble est centrifugé à $400 \times g$ pendant 30 minutes à température ambiante. L'anneau formé par les PBMC, le plasma et les résidus de Ficoll sont éliminés. Le culot restant contenant les globules rouges et les neutrophiles est traité par une solution à 1 % de Dextran 500 (Amersham Biosciences Diegem, Belgique) et 0,85 % de NaCl, dilué dans du milieu RPMI (« complet » sans sérum), afin d'isoler les neutrophiles. La sédimentation des cellules a ensuite lieu pendant une heure à 4 °C. Le surnageant est récupéré, dilué au demi avec du milieu RPMI (« complet » sans sérum), puis centrifugés 10 minutes à $200 \times g$ à 4 °C. Un choc osmotique est effectué afin de lyser les globules rouges : le culot est resuspendu dans de l'eau stérile à 4 °C pendant 10 secondes, puis la suspension est transvasé dans une solution de NaCl (0,43 M) diluée dans du PBS. L'ensemble est centrifugé 10 minutes à $200 \times g$ à 4 °C. Cette étape peut être répétée si les globules rouges sont encore présents. Le culot cellulaire contenant les neutrophiles est alors resuspendu dans du milieu « complet ». La suspension de neutrophiles est quantifiée en présence de bleu trypan et les cellules sont reprises dans du milieu « complet » à la densité souhaitée. Après purification, les cellules sont incubées pendant 2 heures dans du milieu « complet », afin de prévenir une éventuelle activation.

La pureté des cellules est supérieure à 93 % et a été déterminée par l'utilisation d'anticorps anti-CD16 pour neutrophiles (Immunotools, Friesoythe, Allemagne) avec le cytomètre BD FACSCanto™ (BD Biosciences). La viabilité cellulaire est supérieure à 98 % et est estimée par un comptage au bleu trypan.

1.2.2 Traitements des neutrophiles primaires humains

Les neutrophiles sont prétraités pendant 5 minutes par différentes molécules comme l'Ado (de 0,01 à 25 μM), ses analogues : des agonistes (0,1 à 100 nM) ou des antagonistes (1 à 100 nM) (**Tableau 2** page 100), le DIP (100 μM) ou l'ITU (100 μM). Les cellules sont ensuite stimulées par la fMLP (10^{-7} M), le LPS (10 ng/mL), ou l' H_2O_2 (10 mmol/L) pendant 15 minutes (conditions H_2O_2 et fMLP), ou 2 heures (condition LPS).

Pour les expériences de Nucléofection[®], les neutrophiles sont transfectés avec 1,4 µg de siARN selon les recommandations du fournisseur. Les conditions de contrôle sont effectuées sur des cellules subissant la Nucléofection[®] sans être mises en présence de siARN. Les cellules sont incubées 48 heures avant un prétraitement par l'Ado suivi d'une stimulation par la fMLP.

1.3 Isolation de monocytes et culture de macrophages humains

1.3.1 Prélèvements sanguins

Avant tout prélèvement, les patients atteints d'IM signent un consentement éclairé nous permettant d'utiliser leur sang pour la recherche, conformément à la déclaration d'Helsinki. Le prélèvement s'effectue au moment de la reperfusion mécanique après infarctus. Nous avons également utilisé du sang provenant de patients souffrant d'hémochromatose recueilli lors de leur saignée. Les grandes quantités de sang (250-500 ml) obtenues pour un patient nous ont permis de réaliser des expériences nécessitant un nombre important de cellules. Ces patients signent également un consentement éclairé.

1.3.2 Purification des monocytes

1.3.2.1 Isolement des cellules mononucléaires du sang périphérique

Les PBMC sont isolées stérilement à partir de sang total humain provenant des patients ou des volontaires sains par gradient de Ficoll en tubes Leucosep (Greiner, Wemmel, Belgique). Ce système permet de séparer les globules rouges des PBMC et du plasma grâce à une membrane poreuse placée dans le tube. Le Ficoll est centrifugé 1 minute à 200 x g puis 30mL de sang total sont déposés et centrifugés à 400 x g pendant 30 minutes à température ambiante. Les PBMC qui forment un anneau fin à l'interface du Ficoll et du plasma au-dessus de la membrane sont collectés. Ensuite, ils sont rincés avec du PBS contenant des ions Ca²⁺ et Mg²⁺ (Lonza, Belgique) puis centrifugés 15 minutes à 200 x g à 15 °C. Les culots sont

resuspendus dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (Lonza) avec 2 mM d'EDTA (Sigma, Allemagne), puis centrifugés 15 minutes à 200 x g à 10 °C. Les culots sont alors resuspendus dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} avec 2 mM d'EDTA et 0,5 % de sérum de veau fœtal SVF et cette suspension de PBMC est quantifiée en présence de bleu trypan. Les cellules sont ensuite centrifugées 15 minutes à 200 x g à 10 °C. Les PBMC sont repris dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} avec 2 mM d'EDTA et 0,5 % de SVF en vue de la sélection des monocytes et conservées à 4 °C.

1.3.2.2 Isolement des monocytes par sélection négative

L'isolement des monocytes est réalisé stérilement par sélection magnétique indirecte grâce au kit Monocyte Isolation kit II (Miltenyi, Royaume-Uni). Dans un premier temps, les PBMC sont mis en présence de Fc Blocking Reagent (saturation des récepteurs Fc de surface des cellules, inhibition de fixation non spécifique du mélange d'anticorps biotinylés ajouté par la suite) et d'un mélange d'anticorps biotinylés (anti-CD3 et anti-CD7 marqueurs des lymphocytes T, anti-CD16 marqueur des neutrophiles, anti-CD19 marqueur des lymphocytes B, anti-CD56 marqueur des cellules NK, anti-CD123 marqueur des cellules progénitrices, granulocytes et mégacaryocytes et glycophorine qui permet de retenir les globules rouges). Dans un second temps, les PBMC sont mis en présence d'un anticorps anti-biotine couplé à des microbilles magnétiques. La suspension cellulaire est ensuite déposée sur une colonne magnétique placée sur un aimant. Les monocytes, non marqués, sont élués par 3 lavages successifs au PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} avec 2 mM d'EDTA et 0,5 % de SVF puis centrifugés 10 minutes à 300 x g à 4 °C. Le culot est resuspendu en milieu « complet ». Les cellules sont ensuite numérées puisensemencées à la densité désirée dans du milieu RPMI contenant les mêmes additifs que le milieu mais « complet » avec seulement 1 % de SVF.

La pureté des cellules est supérieure à 90 % et a été déterminée par l'utilisation d'anticorps anti-CD14 pour monocytes (BD Biosciences) avec le cytomètre BD FACSCanto™ (BD Biosciences). La viabilité cellulaire est supérieure à 98 % et est estimée par un comptage au bleu trypan. Le rendement obtenu est généralement un million de monocytes pour 10 ml de sang purifié.

1.3.3 Culture et traitements des macrophages primaires humains

Après purification, les monocytes primaires humains sont différenciés en macrophages avec un traitement de 50 ng/mL de facteur de stimulation des colonies macrophagiques (M-CSF pour macrophage-colony stimulating factor) pendant 7 jours.

Les macrophages sont traités pendant 15 minutes, 6 ou 24 heures avec du DMSO (le solvant de l'EHNA) ou 10 μ M d'Ado/EHNA. Ils peuvent aussi être stimulés 24 heures avec 100 ng/mL de LPS après le prétraitement Ado/EHNA.

2 Étude de l'expression des transcrits d'intérêt

Toutes les manipulations sont réalisées en environnement dépourvu de toute trace de RNases et DNases.

2.1 *Extraction des ARN totaux*

2.1.1 **A partir de sang total**

L'instabilité de l'ARN constitue un problème lors du prélèvement du sang humain. La société PreAnalytiX™ a développé un système permettant de prélever, stabiliser, conserver et transporter du sang total humain sans risque de dégradation. Les tubes PAXgene® Blood RNA (PreAnalytiX™, Franklin Lakes, USA) contiennent des réactifs spécifiques protégeant les molécules d'ARN de la dégradation par les RNases et minimisant l'induction de l'expression de gènes. Les tubes PAXgene® Blood RNA ont été développés pour le prélèvement de 2,5 ml de sang humain et pour la stabilisation d'ARN jusqu'à 3 jours à une température entre 18 et 25 °C ou jusqu'à 5 jours entre 2 et 8 °C. Des données récentes démontrent une stabilisation de l'ARN d'au moins 6 mois quand le sang est conservé à – 20°C ou – 80°C. Ainsi, le prélèvement sanguin des patients peut être effectué 24 heures sur 24 et 7 jours sur 7.

Le kit PAXgene® Blood RNA (Qiagen) a été développé pour la purification d'ARN total à partir de sang humain prélevé dans le tube PAXgene® Blood RNA. La purification commence par une étape de centrifugation pour sédimenter les acides nucléiques. Le culot est lavé et remis en suspension, puis incubé dans un tampon contenant de la protéinase K pour digérer les protéines. Une étape de centrifugation additionnelle à travers les colonnes PAXgene® Shredder est réalisée pour homogénéiser le lysat cellulaire. Le surnageant est mélangé à de l'éthanol et déposé sur une colonne PAXgene® RNA. Au cours d'une courte étape de centrifugation, l'ARN est adsorbé à la membrane à base de gel de silice, alors que les contaminants résiduels sont éliminés au cours d'étapes de lavage. La membrane est traitée avec de la DNase I afin de supprimer toute trace d'ADN, et l'ARN est ensuite élué. L'ARN

obtenu est purifié et concentré au moyen du kit RNeasy MinElute[®] (Qiagen) se basant sur le principe de la chromatographie d'adsorption.

La quantité et la qualité de l'ARN ainsi extrait sont évaluées par spectrophotométrie UV-visible, grâce au Nanodrop[®] ND-1000 (NanoDrop Technologies, Rockland, USA). Le contrôle de l'intégrité des échantillons est réalisé grâce au Bioanalyzer[®]. Le principe du Bioanalyzer[®] d'Agilent Technologies (Belgique) est la microphorèse capillaire sur puce d'un échantillon dans un gel contenant un fluorochrome. Les différents ARN présents dans chaque échantillon sont séparés selon leur taille, et l'intensité de leur fluorescence est comparée à un marqueur standard.

2.1.2 A partir des cellules cultivées *in vitro*

Les ARN totaux des cellules sont extraits à l'aide du TriReagent[™] et du kit RNeasy mini (Qiagen), avec digestion à la DNase I (Qiagen) sur colonne de silice, selon les recommandations du fournisseur. Leur quantification se fait avec un spectrophotomètre UV/Visible : le NanoDrop[®] ND-1000. La vérification de leur intégrité se fait sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium.

Au temps optimal de chaque expérimentation, les cellules sont lysées dans 1 mL de TriReagent[™] (préserve les ARN des dégradations par les RNases) et stockées à -80 °C jusqu'à extraction de l'ARN. Les échantillons sont décongelés sur glace, puis placés 5 min à température ambiante. Ils sont vortexés vigoureusement pendant 15 sec après ajout de 200 µL de chloroforme par mL de TriReagent[™]. Ils sont incubés pendant 10 min à température ambiante, puis centrifugés à 15 000 x g 15 minutes, à 4 °C. La phase aqueuse est récupérée et un volume équivalent d'éthanol 70 % (Merck, Overijse, Belgique) est additionné. Le mélange est inversé plusieurs fois, puis déposé sur une colonne RNeasy placée dans un tube collecteur de 2 mL. Les ARN fixés sur la colonne sont lavés successivement par 700µL de tampon RW1, riche en sels, puis par du tampon RPE, afin d'éliminer au mieux les sels, protéines et les éventuels contaminants d'après les instructions du fournisseur. Après élution dans 30 µl d'eau dépourvue de RNase et DNase (Invitrogen), les ARN totaux sont dénaturés à 65 °C pendant 5

minutes, puis placés rapidement sur la glace pour éviter leur renaturation. Les ARN extraits sont congelés aliquotés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation.

Afin de contrôler leur pureté et de les quantifier, chaque échantillon a été dosé à l'aide du NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer. Trois densités optiques (DO) sont mesurées : 230 nm, 260 nm et 280 nm. La DO_{260} informe de la concentration en ARN de l'échantillon. La concentration en ARN est donnée par la formule suivante :

$$[\text{ARN}] = A_{260} \times 40 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}, \text{ où } 40 \text{ est le coefficient d'extinction molaire de l'ARN}$$

Le ratio DO_{260}/DO_{230} informe sur le contenu en sels de l'échantillon ; il est considéré comme correct s'il se situe entre 1,8 et 2. S'il est inférieur à 1,8 cela peut indiquer une contamination par la guanidine thiocyanate contenue dans les tampons d'extraction des ARN totaux. Le ratio DO_{260}/DO_{280} établit la pureté de l'extraction ; elle sera considérée comme correcte si ce ratio se situe entre 1,8 et 2. S'il est inférieur à 1,8 cela peut indiquer une contamination par des protéines.

La qualité des ARN est vérifiée par migration électrophorétique sur un gel d'agarose à 1 % (0,3 g pour 30 mL de tampon Tris-base 90 mM, Borate 90 mM et EDTA 2,5 mM pH 8, Sigma), où 400 ng d'échantillons associés à un tampon de charge contenant du bromure d'éthidium et du bleu de bromophénol (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivement) sont déposés afin d'évaluer leur dégradation (absence de traînées ou « smear ») et l'homogénéité de leur dilution (même intensité des bandes des ARN ribosomiaux entre tous les échantillons et intensité double de l'ARN ribosomique 28 S par rapport au 18 S pour un même échantillon). Le gel est plongé dans du tampon Tris-Borate-EDTA à l'intérieur d'une cuve, où est appliqué le champ électrique. Toutes les molécules d'acides nucléiques (ADN, ARN) se comportent comme des anions migrant vers la cathode. Le gel d'agarose agit comme un tamis qui ralentit les molécules les plus grosses. La vitesse de migration des molécules est donc inversement proportionnelle à la taille des molécules. La migration se fait pendant 40 minutes à 80 Volts. La révélation des fragments après migration est possible grâce au bromure d'éthidium qui s'intercale entre les molécules et émet une fluorescence visible sous éclairage ultraviolet à 305 nm. Les ARN sont visualisés en plaçant le gel sous rayonnement ultraviolet dans une station d'imagerie Kodak Gel Logic 2200 (Kodak, La Hulpe, Belgique).

2.2 Rétrotranscription des ARN totaux

L'étape de rétrotranscription ou transcription inverse des ARN totaux permet d'obtenir un ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'ARN, grâce à une enzyme, la transcriptase inverse. L'ADNc correspond, dans le cas d'ARNm rétrotranscrits, aux séquences codant pour les protéines.

Pour ce faire, 1 µg d'ARN est préparé dans un volume de 8 µL d'eau dépourvue de RNase et DNase puis 11 µL d'un mélange réactionnel comprenant 4 µL de tampon RT 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, Invitrogen, Belgique), 4 µL du mélange des 4 dNTPs (Invitrogen) à 2,5 mM, 1µL d'héxamères aléatoires à 0,2 µg/µL (Invitrogen) et 2 µL de DTT à 0,1 M (Invitrogen) sont ajoutés. Cette préparation est incubée 2 minutes à 42 °C puis 1 µl de rétrotranscriptase Superscript II (Invitrogen) à 200 U/µl est ajoutée pour un volume final de 20 µL. Le programme de rétrotranscription est effectué dans un thermocycleur (Biorad, Nazareth, Belgique) selon les cycles suivants : 1 cycle à 42 °C pendant 50 minutes (rétrotranscription des ARN totaux en ADNc), puis 1 cycle à 70 °C pendant 15 minutes afin de désactiver l'enzyme. Les ADNc obtenus sont placés à -20 °C jusqu'à utilisation en PCR quantitative.

2.3 PCR quantitative en temps réel

2.3.1 Choix des amorces

Chaque échantillon d'ADNc (issus des ARNm) est utilisé pour une expérience de PCR avec des amorces spécifiques du transcrit à analyser. Ces amorces sont dessinées à l'aide du logiciel Beacon Designer (PREMIER Biosoft, Palo Alto, USA). Les critères de sélection sont multiples. La taille de l'oligonucléotide doit être comprise entre 18 et 22 pb. La distance entre les deux amorces (5' et 3') choisie pour amplifier une zone codante doit être comprise entre 75 et 150 pb. Il faut également s'assurer qu'il n'y ait pas d'hybridation possible avec d'autres séquences (vérification sur Basic Local Alignment Search Tool, BLAST). Dans la mesure du possible, les couples d'amorces sont choisis de part et d'autre d'un intron afin d'éviter une

éventuelle amplification par de l'ADN génomique contaminant. Le rendement de l'extraction d'ARN et la qualité de la rétrotranscription pouvant varier d'un échantillon à l'autre, nous analysons les résultats par rapport à un gène de référence dont l'expression est constitutive et relativement stable pour les expériences menées au laboratoire.

2.3.2 Principe de la réaction de PCR quantitative

L'appareil permettant de réaliser cette technique est l'iCycler™ (BioRad). Au cours d'une PCR conventionnelle, le produit amplifié ou amplicon est détecté lors d'une analyse terminale (dépôt sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium), c'est-à-dire une fois la réaction terminée. En revanche, la PCR quantitative en temps réel (qPCR) permet la détection des amplicons au fur et à mesure de la réaction. Cette technologie est basée sur la détection des produits d'amplification rendue possible grâce à l'incorporation d'une molécule fluorescente dans le mélange réactionnel : la quantification de l'émission de ce rapporteur fluorescent (ici le SYBR® Green, un agent intercalant de l'ADN double brin) est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Le SYBR® Green est fluorescent tant qu'il est lié à l'ADN double brin.

La valeur Ct est définie comme le nombre de cycles auquel la courbe d'amplification atteint le seuil de fluorescence, situé dans la portion exponentielle de la courbe d'amplification. Ainsi, le Ct est d'autant plus faible que le transcrit est fortement exprimé. Les thermocycleurs utilisés sont équipés d'un dispositif de détection de fluorescence, lequel est contrôlé par un programme informatique qui quantifie et convertit le signal fluorescent en quantité d'amplicons. Cette technique peut également être utilisée pour mettre au point des amorces (détermination de la température optimale d'hybridation par gradient de température, réalisation de gamme de dilution).

Le rendement de l'extraction des ARN et la qualité de la rétrotranscription pouvant varier d'un échantillon à l'autre, ces derniers sont aussi analysés pour un gène de référence (à expression constitutive stable) tel que les gènes codant pour la β -actine ou la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), permettant de normaliser les taux d'ARN. Chaque produit d'ADN double brin est synthétisé à une température de fusion (T_m) spécifique,

définie comme étant la température à partir de laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin. Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95 °C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée à la température de 55 °C ce qui provoque la reformation d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95 °C. La fluorescence est lue en continu pendant cette remontée : quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, ce qui entraîne la libération du SYBR Green dans le milieu et une diminution progressive de la fluorescence. Lorsque 50 % de l'ADN double brin sont dissociés, la fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que correspond la température de fusion du produit synthétisé. La température de fusion est obtenue en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température : elle correspond au maximum de la courbe. Ceci nous permet de vérifier la spécificité de l'amplification lors de la qPCR (un pic correspond à un gène amplifié sans produit aspécifique).

Les réactions de PCR quantitative en temps réel sont réalisées en microplaques 96 puits, dans un volume réactionnel de 20 µL, en duplicats. Chaque mélange réactionnel est composé de 4 µL d'ADNc dilué au 1/10ème dans de l'eau dépourvue de RNase et DNase, 16 µL d'un mélange contenant 300 nM d'amorces sens et antisens, et du SYBR[®] Green PCR MasterMix (Biorad[™]) de l'iTaq polymérase, des dNTPs, du SYBR[®] Green fluorescéine, KCl, Tris-HCl pH 8.4, et du MgCl₂. Les échantillons sont incubés 3 minutes à 95 °C (Hot Start de l'iTaq Polymérase, nécessaire à son activation), puis 40 cycles de PCR sont effectués : une dénaturation de 30 secondes à 95 °C suivie d'une étape d'hybridation-élongation de 1 minute à la température spécifique du jeu d'amorces employé.

Les séquences des amorces utilisées, ainsi que la température d'hybridation utilisée et leur efficacité de PCR, sont présentées dans le **Tableau 3**.

L'exploitation des résultats de qPCR est réalisée avec la macro Excel Genex fournie par BioRad[™]. La β-actine est utilisée comme gène de référence. Les résultats sont normalisés par rapport à un échantillon contrôle ou à la quantité relative de β-actine.

Gène	Numéro d'Accession Genbank	Température d'hybridation (°C)	Efficacité de PCR	Séquences
MMP-9	NM_004994	62 °C	106,6 %	Sens 5'-AAC TAC GAC ACC GAC GAC-3' Antisens 5'-CAG GCG GAG TAG GAT TGG-3'
CCR2	NM_000648	62 °C	108,3 %	Sens 5'-CGA GAA GAA GAG GCA TAG G-3' Antisens 5'-GCA GCA GTG AGT CAT CC-3'
A1AR	NM_000674	58 °C	106,9 %	Sens 5'-GAC CTA CTT CCA CAC CTG-3' Antisens 5'-TCA CCA CCA TCT TGT ACC-3'
A2bAR	NM_000676	60 °C	102,7 %	Sens 5'-CTC CAT CTT CAG CCT TCT GG -3' Antisens 5'-ACA AGG CAG CAG CTT TCA TT-3'
A2aAR	NM_000675	64 °C	103,1 %	Sens 5'-TCT TCA GTC TCC TGG CCA TC-3' Antisens 5'-GGG ACC ACA TCC TCA AAG AG-3'
A3AR	NM_000677	62 °C	100,5 %	Sens 5'-TCA TCT GCG TGG TCA AGC-3' Antisens 5'-CTG TAG AAG TGG ATT GTG ATG C-3'
TLR-4	NM_138554	60 °C	114,5 %	Sens 5'-ATC CAG GTG TGA AAT CCA GAC-3' Antisens 5'-AGG CTC CCA GGG CTA AAC-3'
CD14	NM_000591	56 °C	99,7 %	Sens 5'-TAA AGC ACT TCC AGA G-3' Antisens 5'-AAT CTT CAT CGT CCA G-3'
MD-2 (LY-96)	NM_015364	60 °C	97 %	Sens 5'-TGC CGA GGA TCT GAT GAC-3' Antisens 5'-ATT AGG TTG GTG TAG GAT GAC-3'
β-actine	NM_001101	60 °C	102,6 %	Sens 5'-AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC-3' Antisens 5'-GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA-3'
RECK	NM_021111	58 °C	108,4 %	Sens 5'-GCC GTG ATG TAT GTG AAC-3' Antisens 5'-GCA GCC TAA GCC AAC C-3'

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées en PCR quantitative.

3 Biochimie des protéines

3.1 *Zymographie*

Le principe de cette analyse consiste en une séparation électrophorétique en conditions dénaturantes des MMPs dans un gel de polyacrylamide imprégné de gélatine. Les gélatinases MMP-2 et MMP-9 sont mises en évidence par leur capacité à dégrader leur substrat respectif : la gélatine A et la gélatine B, ce qui se traduit, après coloration de la gélatine par le bleu de coomassie puis décoloration, par des bandes blanches sur fond bleu ⁵¹⁹.

Les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide-sodium dodécyl sulfate (SDS) 8 % contenant 0,2 % de gélatines A et B, après avoir été dilués dans du tampon échantillon 2X (1/100^{ème}). Le SDS confèrent 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 100 V pendant 2 heures, le gel est 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 sont ensuite incubés 24 heures à 37 °C dans un tampon Tris 0,5M, Brij 35 0,2 %, NaCl 2M, CaCl₂ 50 mM à pH 7.6, permettant la récupération de l'activité gélatinolytique des MMPs et la digestion des substrats. Les gels sont 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 sont 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 sont conservés dans une solution contrastante (5 % glycérol (Merck), 10 % d'acide acétique) à 4 °C jusqu'à leur séchage.

Chaque gel est scanné par la station d'imagerie Kodak Gel Logic 2200 et les bandes caractéristiques de l'activité gélatinolytique sont quantifiées par densitométrie à l'aide du

logiciel de traitement d'images Kodak Gel Logic 2200 (Kodak). Les résultats sont normalisés par rapport à l'échantillon contrôle.

3.2 Dosage immuno-enzymatique de TIMP-1 et MMP-9

Les protéines MMP-9 et TIMP-1 (sous forme active et zymogène) sont dosées dans les surnageants cellulaires par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) à l'aide des kits Quantikine[®] Human total MMP-9 et TIMP-1 (R&D Systems[™], USA) selon les instructions du fournisseur. Les dosages sont réalisés à partir de 200 µl de surnageant dilué au 1/20^{ème} pour TIMP-1 et au 1/100^{ème} pour la MMP-9 avec des anticorps spécifiques anti-TIMP-1 et anti-MMP-9 monoclonaux qui tapissent les puits de la microplaque ELISA, et des secondaires polyclonaux couplés à la peroxydase de Raifort. La coloration finale est lue à 450 nm sur lecteur POLARstar Optima (BMG LABTECH) après addition d'un mélange de tétraméthylbenzidine et de peroxyde d'hydrogène utilisé comme substrat chromogène. La limite de détection est de 80 pg/ml pour TIMP-1 et 156 pg /ml pour la MMP-9. Aucune réactivité croisée ou interférence significatives n'ont été observées pour ces kits.

Les résultats sont normalisés par rapport à l'échantillon contrôle. Les valeurs d'absorbance obtenues sont comparées à celles de la gamme étalon préparée par dilutions en cascade de formes recombinantes de TIMP-1 et de MMP-9 humaines fournies dans le kit.

4 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux consiste à enregistrer et analyser les signaux optiques émis par une cellule interagissant avec le faisceau lumineux d'un laser. L'analyse des faisceaux diffractés donne des informations sur les propriétés physiques intrinsèques des cellules (taille et granularité), ainsi que des informations relatives à la fluorescence induite par des marquages spécifiques de structures cellulaires. L'ordinateur analyse les données et représente sous forme d'histogramme ou de nuages de points la population cellulaire dont les propriétés sont évaluées. Toutes les expériences sont réalisées à l'aide du cytomètre BDFACScanto™ (BD Biosciences). Les données obtenues sont traitées et analysées à l'aide du logiciel Diva (BD Biosciences) ou ModFit pour le cycle cellulaire (BD Biosciences).

Ces manipulations ont été effectuées en étroite collaboration avec la plate-forme de cytométrie en flux du CRP-Santé (R. Brons et W. Ammerlaan).

4.1 *Marquage immunofluorescent*

La cytométrie permet de révéler la présence ou non d'antigène sur la surface cellulaire, grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques couplés à des fluorochromes. Cette technique permet de mettre en évidence la variation d'expression de récepteur membranaire. Des marquages de protéines intracellulaires, cytokines ou autre, peuvent également être réalisés après perméabilisation de la membrane cellulaire. Les résultats obtenus sont exprimés soit en pourcentage de cellules exprimant le marqueur recherché, soit en intensité moyenne de fluorescence représentative du nombre de récepteurs par cellule.

4.1.1 **Mesure de l'expression des récepteurs TLR4 et CD14**

Les THP-1 différenciés en macrophages, mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA, puis activés ou non avec 100 ng/ml de LPS sont récupérés dans un tampon permettant de les détacher de la surface des boîtes de culture (Cell dissociation solution), selon les recommandations du fournisseur.

Les cellules sont lavées deux fois pendant 10 minutes à 1000 rpm dans du PBS avec Ca^{2+} et Mg^{2+} , supplémenté avec 1 % de BSA. Un million de cellules par condition sont marquées avec 5 μl d'anticorps dans 50 μl de PBS-1 % BSA pendant 30 minutes à l'obscurité et sont ensuite lavées. Des anticorps monoclonaux de souris anti-TLR4 couplés à la fluorescéine isothiocyanate (FITC, clone HTA125, Abcam) et anti-CD14 couplés à l'allophycocyanine-cyanine 7 (APC-Cy7, clone M ϕ P9, BD Biosciences) sont utilisés, avec les contrôles isotypiques appropriés. 10 000 évènements par condition sont analysés par le cytomètre BD FACSCanto™.

4.1.2 Mesure de l'expression des récepteurs CCR2

Des monocytes primaires humains sont mis en présence ou non de 10 μM d'Ado/EHNA pendant 6 heures. En parallèle, des monocytes primaires humains différenciés en macrophages et traités plus ou moins 10 μM d'Ado/EHNA pendant 6 heures sont récupérés dans un tampon permettant de les détacher de la surface des boîtes de culture (Cell dissociation solution), selon les recommandations du fournisseur.

Les cellules sont marquées dans les mêmes conditions que précédemment (4.1.1), cependant toutes les manipulations s'effectuent à 4 °C. Des anticorps monoclonaux de souris anti-CCR2 couplés à l'Alexa Fluor 647 (clone 48607, BD Biosciences) sont utilisés, avec les contrôles isotypiques appropriés. Les cellules subissent ensuite une étape de fixation, où elles sont vortexées 30 secondes dans de la FACS lysing solution 1X (BD Biosciences) et incubées 30 minutes à température ambiante dans l'obscurité, puis lavées. Les cellules sont conservées à 4 °C dans le noir jusqu'à acquisition. 10 000 évènements par condition sont analysés par le cytomètre BD FACSCanto™.

4.2 Détection de l'apoptose

Les méthodes les plus simples pour détecter et vérifier le phénomène d'apoptose sur cellules cultivées *in vitro* sont des techniques de cytométrie en flux. Chacune méthode

employée au laboratoire a été mise au point et est opérationnelle dans les conditions de cultures souhaitées.

Les études en cours sont réalisées sur des monocytes primaires humains issus du sang total de patients souffrant d'hémochromatose mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 4 ou 24 heures dans du milieu sans sérum. La durée de privation en sérum est encore en cours d'évaluation. Les cellules THP-1 n'ont pas été choisies comme modèle d'étude car ce sont des lignées cancéreuses : les résultats auraient pu être biaisés puisque les cellules cancéreuses résistent à l'apoptose.

Le phénomène d'apoptose change la morphologie cellulaire : la cellule se rétracte, sa membrane, bien que toujours imperméable, présente des ondulations et des zones de retournement avec exposition vers l'extérieur de phosphatidylsérines qui sont d'ordinaire sur la face intracellulaire. La chromatine se condense et le noyau se fragmente. Les organelles présentent peu de changements, cependant le réticulum endoplasmique se dilate et des corps apoptotiques se forment et sortent de la cellule. Les corps apoptotiques et les débris cellulaires peuvent être phagocytés.

4.2.1 Externalisation des phosphatidylsérines

Lors de la formation des corps apoptotiques, les phosphatidylsérines sont exposées à la surface membranaire par translocation. Il est possible de détecter leur externalisation par un marquage des cellules à l'annexine V, qui en présence de Ca^{2+} reconnaît et fixe spécifiquement les phosphatidylsérines. L'annexine V, couplée à une sonde fluorescente, permet la détection des cellules apoptotiques par cytométrie en flux. Ce marquage est couplé avec de l'iodure de propidium (PI), qui est un agent fluorescent intercalant de l'ADN, afin de différencier deux types de morts cellulaires : la nécrose et l'apoptose. La nécrose est un type de mort cellulaire entraînant la rupture de la membrane plasmique et autorisant ainsi le PI à pénétrer jusqu'au noyau cellulaire et à se fixer sur l'ADN. Les cellules marquées annexine V négatives - PI négatives sont considérées comme vivantes, celles annexine V positives - PI négatives comme étant en apoptose et celles annexine V négatives - PI positives en nécrose. Les opinions concernant le marquage intermédiaire annexine V positif - PI positif sont encore

mal définies : certains considèrent qu'il caractérise les cellules en apoptose tardive, d'autres que ce sont des cellules en « apoptose - nécrose » et que le type de mort est impossible à distinguer. Cette technique est très efficace, cependant les membranes cellulaires peuvent être fragilisées en fonction des conditions de culture ou de récolte des cellules donnant lieu à des faux-positifs. Il faut donc confirmer les résultats obtenus par d'autres approches.

En nous basant sur les données de la littérature⁵²⁰, chaque étape de la manipulation s'effectue à 4 °C et un contrôle du marquage à l'annexine V est effectué avec un tube dont les lavages et les resuspensions cellulaires sont effectués avec du tampon PBS dépourvu de calcium et de magnésium. Les monocytes primaires humains sont lavés une fois pendant 10 minutes à 1000 rpm dans du PBS avec calcium et magnésium, supplémenté avec 1 % de BSA. Un million de cellules par condition est marqué avec 5 µl de PI à 50 µg/ml et/ou de solution d'annexine V dans 50 µl de PBS-1 % BSA pendant 10 minutes à l'obscurité et est ensuite lavé puis lu immédiatement au cytomètre. L'annexine V en solution est couplé à l'allophycocyanine (APC, BD Pharmigen, Hollande). 10 000 évènements par condition sont analysés par le cytomètre BD FACSCanto™.

4.2.2 Cycle cellulaire et isolation de la phase sub-G1

Un marquage à l'iodure de propidium (PI) après fixation des cellules permet une étude du cycle cellulaire des monocytes/macrophages primaires par mesure de l'ADN total des cellules. D'ordinaire, l'étude de la ploïdie permet d'observer en cytométrie des pics caractéristiques des phases G0/G1, S et G2/M du cycle cellulaire, cependant les monocytes/macrophages sont des cellules qui ne prolifèrent plus et seule la phase G1 est présente. Lors du processus apoptotique, l'ADN se fragmente et les cellules apoptotiques contiennent une quantité d'ADN inférieure à 2n. Cette hypodiploïdie correspond à un pic ou un épaulement précédant le pic de la phase G1 : c'est la phase sub-G1 caractéristique des dommages causés sur l'ADN cellulaire.

Chaque étape de la manipulation s'effectue à 4 °C. Un million de cellules est lavé avec du PBS sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ pendant pendant 5 minutes à 200 x g. Les cellules sont suspendues

dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} , puis de l'éthanol absolu est ajouté goutte à goutte, en vortexant, à la suspension cellulaire préalablement homogénéisée. Les cellules sont fixées pendant au moins 1 heure à 4 °C puis passées à - 20 °C au minimum 5 minutes. A ce stade, les cellules peuvent être stockées un mois à - 20 °C. Les cellules sont ensuite centrifugées à 300 x g pendant 10 minutes puis suspendues dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} contenant 0,5 mM d'EDTA. Elles sont réhydratées 15 minutes à température ambiante puis centrifugées 10 minutes à 200 x g. Le culot cellulaire est repris dans 200 µl d'une solution de marquage contenant de l'iodure de propidium (0,1 % de Triton X-100, 0,1 mM EDTA, 50 µg/ml RNase A (Qiagen) et 50 µg/ml PI). La suspension cellulaire est incubée 40 minutes à température ambiante puis lue au cytomètre. Après exclusion des débris cellulaires, 20 000 évènements par condition sont analysés par le cytomètre BD FACSCanto™.

5 Analyse statistique

Les résultats sont exprimés par la moyenne des valeurs de plusieurs expériences \pm SEM pour les manipulations concernant les neutrophiles, et \pm SD pour celles sur monocytes-macrophages. Les comparaisons entre les échantillons ont été réalisées par l'analyse de la variance, suivie pour les données avec distribution gaussienne d'un test *t* de Student, et pour les données avec distribution non gaussienne d'un test de Mann-Whitney (données non appariées) ou d'un test de Wilcoxon (données appariées). Une valeur de *p* inférieure à 0,05 indique que les différences observées entre les divers traitements sont significatives.

RESULTATS

CHAPITRE I :

ETUDE DES EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LA PRODUCTION DE MMP-9 PAR LES NEUTROPHILES

L'expression et l'activation des métalloprotéinases matricielles (MMPs), en particulier la MMP-9²⁶⁶, augmentent dans le cœur après un infarctus du myocarde^{163, 164, 521}. Les neutrophiles constituent la première vague cellulaire à infiltrer la zone infarctée, où ce sont les principales cellules sécrétrices de MMP-9⁵²². Nous avons poursuivi des travaux déjà en cours au laboratoire sur l'étude de l'effet de l'adénosine (connue pour ses propriétés cardioprotectrices⁴⁰⁹) et de ses analogues sur la production de MMP-9 par les neutrophiles primaires humains purifiés à partir du sang total de volontaires sains.

1 Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les neutrophiles

Nous avons utilisé des neutrophiles primaires purifiés à partir du sang total de volontaires sains afin d'étudier l'effet de l'adénosine sur la sécrétion de MMP-9.

1.1 Effet de la concentration d'adénosine sur les neutrophiles

Les neutrophiles sont prétraités avec des concentrations d'adénosine de 0,01 à 25 μM pendant 5 minutes avant d'être stimulés 15 minutes par 10^{-7} M de fMLP. La quantité de MMP-9 sécrétée dans les surnageants de milieux de culture par les neutrophiles est mesurée par zymographie.

Un gel de zymographie montre que le surnageant des neutrophiles contient trois formes de MMP-9 : la forme homodimérique de haut poids moléculaire, la forme complexée à la lipocaline et la forme zymogène (pro-MMP-9) de 92 kDa (**Figure 14, A**). La quantification est effectuée uniquement sur la bande pro-MMP9, cependant les résultats obtenus sont identiques à ceux acquis lors de la quantification des 3 bandes. L'analyse densitométrique de

l'intensité des bandes pro-MMP-9 indique que l'adénosine inhibe de façon concentration-dépendante la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles primaires humains activés par la fMLP (**Figure 14, B**). L'intensité des bandes diminue de près de 30 % pour les concentrations d'adénosine supérieures ou égales à 0,1 μM . Les résultats sont exprimés en pourcentage de MMP-9 sécrétée par rapport aux cellules traitées par la fMLP seule (condition fixée à 100 % de production de MMP-9). Ce mode de présentation des résultats sera utilisé pour toutes les études concernant les neutrophiles (Chapitre I).

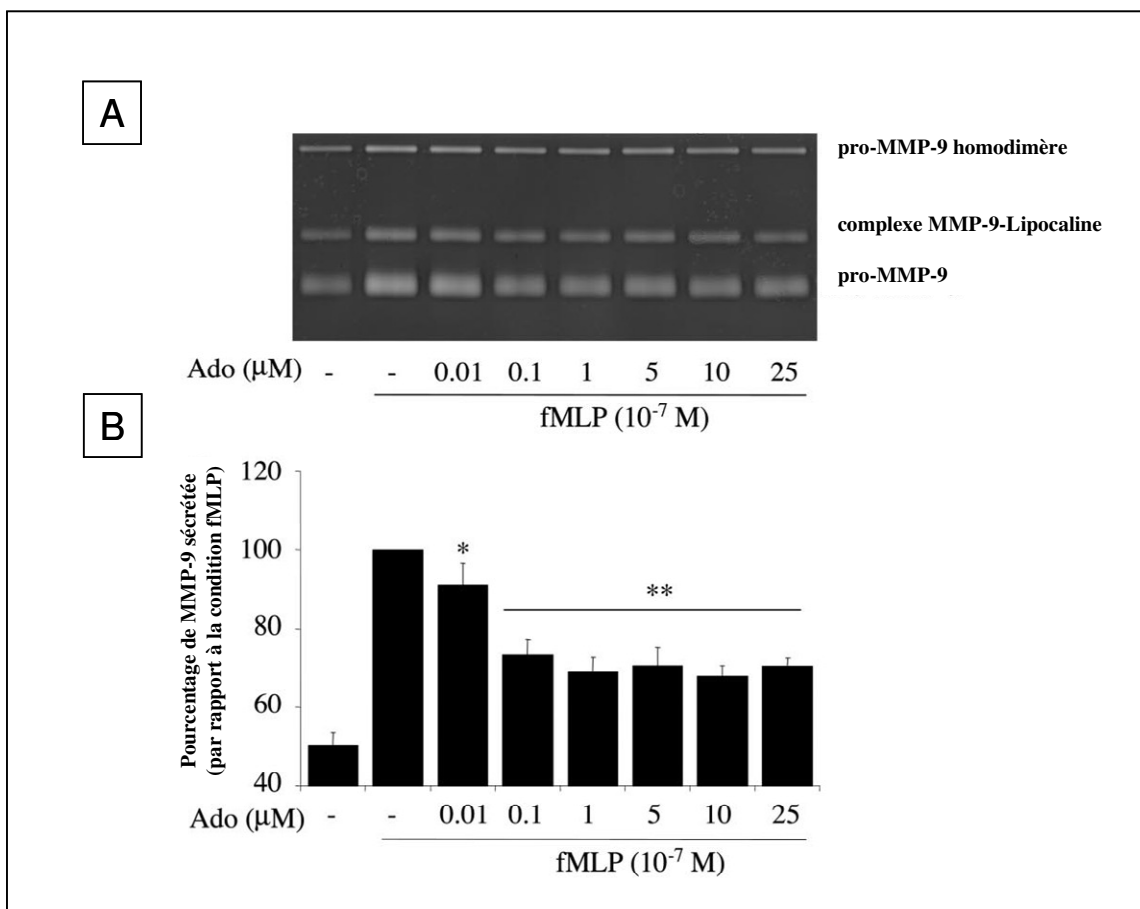


Figure 14 : L'adénosine diminue la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles stimulés par la fMLP.

Des neutrophiles sont prétraités 5 minutes par des concentrations croissantes d'adénosine (0,01 à 25 μM), puis stimulés par ajout de fMLP (10^{-7} M) pendant 15 minutes. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie et l'intensité des bandes obtenues est quantifiée par analyse densitométrique. A, Gel de zymographie représentatif montrant l'existence de trois bandes. B, Quantification montrant que l'adénosine diminue la production de MMP-9. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 8$). * $p < 0,05$ versus fMLP et ** $p < 0,001$ versus fMLP.

Cet effet est aussi valable pour d'autres types de stimuli. Ainsi un prétraitement de 5 minutes par 1 μM d'adénosine est capable d'inhiber la production de MMP-9 induite par un traitement de 2 heures avec 10 ng/ml de LPS ou de 15 minutes avec 10 mM de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (**Figure 15**).

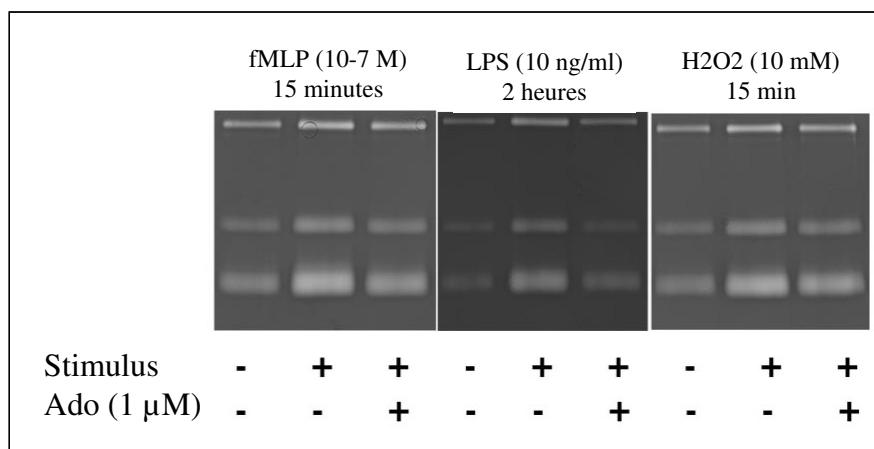


Figure 15 : L'adénosine diminue la production de MMP-9 par les neutrophiles traités par différents stimuli.

Des neutrophiles sont prétraités 5 minutes avec ou sans 1 μM d'adénosine, puis stimulés par de la fMLP (10^{-7} M) ou de l' H_2O_2 (10 mM) pendant 15 minutes, ou encore du LPS (10 ng/ml) pendant 2 heures. Des gels de zymographie représentatifs montrent que l'adénosine diminue la production de MMP-9 suite à divers stimuli.

1.2 Effet de l'adénosine endogène sur la production de MMP-9

Afin de caractériser respectivement la contribution de l'adénosine exogène et endogène sur la production de MMP-9, nous avons traité les neutrophiles avec des agents qui modulent sa concentration : l'inhibiteur des transporteurs membranaires de l'adénosine dipyridamole (DIP, 100 μM) et l'inhibiteur de l'adénosine kinase iodotubéricidine (ITU, 100 μM). Nous avons aussi employé l'agoniste non spécifique des récepteurs à l'adénosine NECA

(100 nM) (**Tableau 2** page 100), afin de vérifier si l'effet de l'adénosine passe par ses récepteurs.

Les neutrophiles sont prétraités 5 minutes avec les molécules citées précédemment, puis stimulés 15 minutes avec la fMLP (10^{-7} M). La quantité de MMP-9 sécrétée dans les surnageants de culture des neutrophiles est mesurée par zymographie.

Un traitement avec des agents modulateurs de l'adénosine, induisant une augmentation de la concentration d'adénosine, ainsi qu'avec l'agoniste NECA résulte aussi en la diminution de la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles (**Figure 16**).

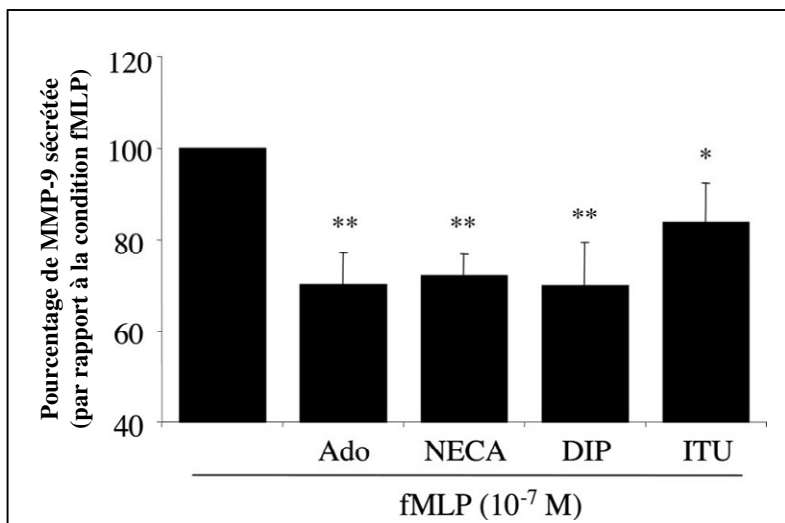


Figure 16 : Les modulateurs du métabolisme et du transport de l'adénosine, ainsi que l'agoniste NECA, diminuent la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles stimulés par la fMLP.

*Des neutrophiles sont prétraités 5 minutes avec de l'adénosine ($1 \mu\text{M}$), des modulateurs de l'adénosine (ITU, DIP ; $100 \mu\text{M}$) ou l'agoniste non spécifique NECA (100 nM), puis stimulés par de la fMLP (10^{-7} M) pendant 15 minutes. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie. Les modulateurs de l'adénosine DIP et ITU, ainsi que l'agoniste NECA, miment les effets de l'adénosine et diminuent la production de MMP-9. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0,01$ versus fMLP et ** $p < 0,001$ versus fMLP.*

1.3 Conclusion

Les résultats obtenus montrent que l'adénosine exogène, aussi bien que l'adénosine endogène, est capable d'inhiber de façon reproductible la production de MMP-9 par les neutrophiles primaires humains et que cette inhibition passe par les récepteurs à l'adénosine.

2 Implication des récepteurs à l'adénosine dans la modulation de la sécrétion de la MMP-9

Le but de ces travaux a été de caractériser le(s) récepteur(s) à l'adénosine impliqué(s) dans la diminution de la production de MMP-9 par les neutrophiles, grâce à l'utilisation de l'adénosine et de ses analogues, ainsi que des outils de l'ingénierie moléculaire.

2.1 Approche pharmacologique

Nous disposons d'agonistes et d'antagonistes spécifiques des quatre récepteurs à l'adénosine, à l'exception de l'agoniste du récepteur A2b (**Tableau 2** page 100).

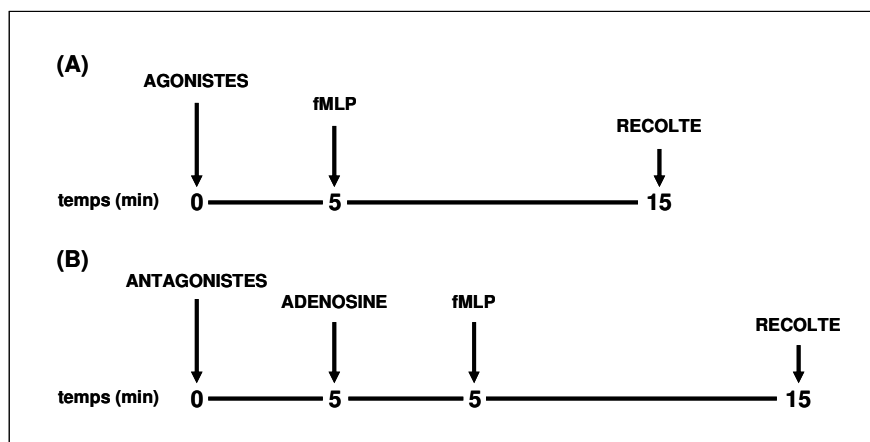


Figure 17 : Protocole des traitements avec agonistes (A) et antagonistes (B) sur les neutrophiles stimulés par la fMLP.

Les agonistes ont été employés en prétraitement 5 minutes avant stimulation des neutrophiles par 10^{-7} M de fMLP, à des concentrations de 0,1 à 100 nM (**Figure 17, A**). Les antagonistes ont été appliqués à des concentrations de 1 à 100 nM, 5 minutes avant un prétraitement de 5 minutes à l'adénosine (1 μ M) précédant la stimulation (**Figure 17, B**). La quantité de MMP-9 sécrétée dans les surnageants de milieux de culture par les neutrophiles est mesurée par zymographie.

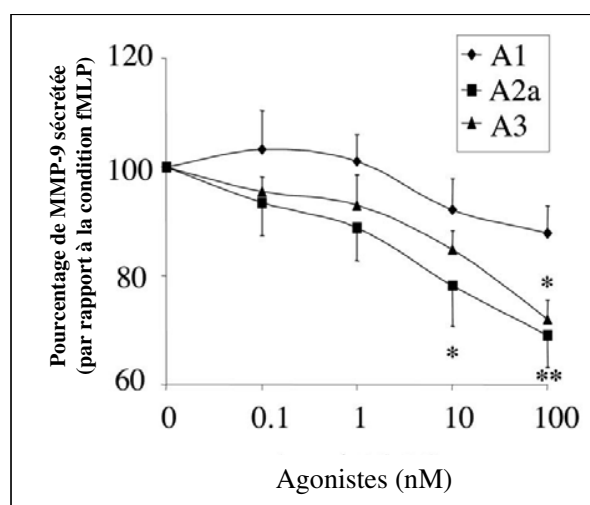


Figure 18 : L'agoniste du récepteur à l'adénosine A2a diminue la production de MMP-9 par les neutrophiles stimulés par la fMLP.

*Des neutrophiles sont prétraités 5 minutes par des concentrations croissantes (0,01 à 100 nM) d'agonistes spécifiques des récepteurs à l'adénosine (A1-spécifique C8031, A2a-spécifique CGS 2160 et A3-spécifique IB-MECA), puis stimulés par ajout de fMLP (10^{-7} M) pendant 15 minutes. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie. L'agoniste du récepteur à l'adénosine A2a diminue significativement et de façon dose-dépendante la production de MMP-9. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n = 6). * $p < 0,05$ versus fMLP et ** $p < 0,005$ versus fMLP.*

L'utilisation de l'agoniste spécifique du récepteur A2a (CGS 2160) diminue le plus fortement la production de MMP-9 comparé aux autres agonistes des récepteurs à l'adénosine. L'agoniste spécifique du récepteur A3 (IB-MECA) montre un effet seulement à de fortes concentrations, alors que l'agoniste A1 (C8031) est quasiment sans effet (**Figure 18**).

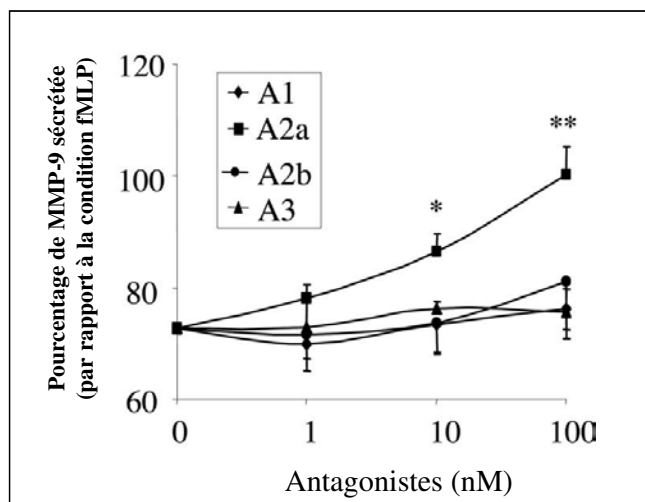


Figure 19 : L'antagoniste du récepteur à l'adénosine A2a augmente la production de MMP-9 par les neutrophiles stimulés par la fMLP.

*Des neutrophiles sont prétraités 5 minutes par des concentrations croissantes (1 à 100 nM) d'antagonistes spécifiques des récepteurs à l'adénosine (A1-spécifique CPX, A2a-spécifique SCH 58261, A2b-spécifique MRS1754 et A3-spécifique PSB 10), puis mis en présence d'1 μ M d'Ado pendant 5 minutes avant stimulation par la fMLP (10^{-7} M) pendant 15 minutes. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie. L'antagoniste du récepteur à l'adénosine A2a augmente significativement et de façon dose-dépendante la production de MMP-9. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (n = 4). * $p < 0,05$ versus (fMLP + 1 μ M d'Ado) et ** $p < 0,005$ versus (fMLP + 1 μ M d'Ado).*

L'adénosine inhibe de 30 % la production de MMP-9 induite par la fMLP (condition sans antagonistes). Le blocage du récepteur A2a par son antagoniste spécifique (SCH 58261) annule totalement (pour la concentration 100 nM) l'effet inhibiteur de l'adénosine sur la

sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles activés, alors que les autres antagonistes sont sans effet (**Figure 19**).

Suite à cette approche pharmacologique avec utilisation d'agonistes et d'antagonistes spécifiques chez l'humain des récepteurs à l'adénosine (**Tableau 2** page 100), nos résultats établis par analyse zymographique suggèrent que la diminution de la production de MMP-9 suite à un traitement à l'adénosine passe majoritairement par la voie du récepteur à l'adénosine A2a.

2.2 Approche moléculaire

Les agonistes et antagonistes des récepteurs à l'adénosine utilisés précédemment ayant une spécificité limitée pour chaque sous-type de récepteur, et de fortes concentrations de l'une ou l'autre de ces molécules pouvant activer ou bloquer plusieurs types de récepteurs, nous avons décidé d'utiliser une autre approche afin de vérifier l'implication du récepteur A2a dans l'augmentation de la production de MMP-9 par l'adénosine. Cette approche moléculaire cette fois-ci, est basée sur l'utilisation des ARN interférants ou siARN. Nous avons choisi des siARN spécifiques de chaque type de récepteurs.

Nous avons transfecté par Nucléofection[®] des neutrophiles primaires humains avec des siARNs ciblant spécifiquement l'expression des récepteurs à l'adénosine A2a ou A3. L'expression des récepteurs à l'adénosine a été analysée en PCR quantitative et c'est 48 heures après transfection que l'action des siARN est la plus efficace avec une forte diminution de l'expression des ARNm codant pour le récepteur à l'adénosine ciblé (données non présentées).

Après avoir vérifié l'efficacité des siARN utilisés, nous avons étudié l'effet d'un traitement à l'adénosine sur des neutrophiles primaires transfectés par les siARN spécifiques des récepteurs A2a ou A3. 48 heures après transfection, les neutrophiles sont prétraités 5 minutes avec ou sans adénosine 1 μ M, avant stimulation à la fMLP à une concentration de 10^{-7} M. Des analyses en zymographie sont effectuées à partir des surnageants de culture pour évaluer la production de la MMP-9.

Une analyse par zymographie montre que seul le siARN A2a permet de bloquer, tout du moins partiellement, la diminution de la production de MMP-9 induite par l'adénosine (**Figure 20**).

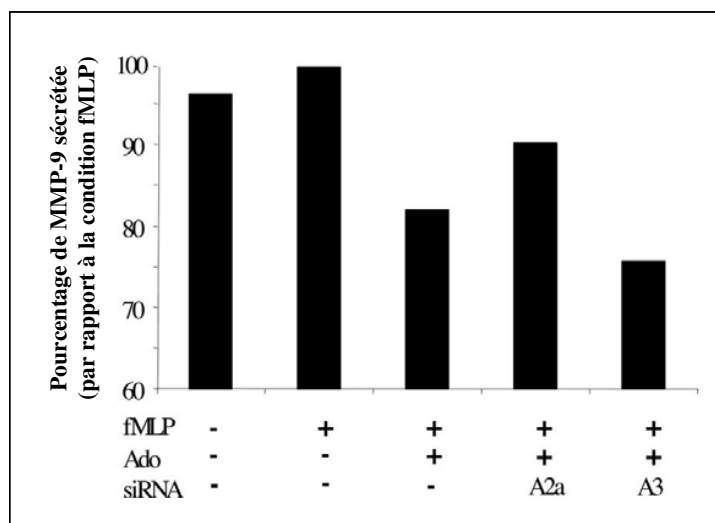


Figure 20 : Le siARN A2a diminue l'augmentation de la production de MMP-9 induite par l'adénosine chez les neutrophiles.

Des neutrophiles sont transfectés avec des siARNs spécifiques des récepteurs à l'adénosine A2a ou A3. 48 heures après transfection, les cellules sont mises en présence ou non d'1 μ M d'Ado pendant 5 minutes, puis stimulés par la fMLP (10^{-7} M) pendant 15 minutes. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie. Seul le siARN spécifique du récepteur A2a entraîne une réduction de la diminution de la production de MMP-9 par l'adénosine. Ces résultats sont issus d'une expérience représentative.

2.3 Conclusion

Grâce à deux approches, l'une pharmacologique et l'autre moléculaire, nous avons montré que la diminution de la production de MMP-9 par l'adénosine implique le récepteur A2a chez les neutrophiles primaires humains.

Une étude mécanistique a permis de mettre en évidence l'implication de la voie cAMP/PKA/Ca²⁺ dans les effets de l'adénosine sur la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles primaires humains.

CHAPITRE II :

ETUDE DES EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LA PRODUCTION DE MMP-9 PAR LES MACROPHAGES

Nous avons montré que l'adénosine diminue la production de MMP-9 par les neutrophiles, première vague cellulaire à infiltrer la zone lésée du cœur après infarctus. Nous avons poursuivi nos recherches en étudiant l'effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages, deuxième vague cellulaire à coloniser la zone infarctée du cœur après les neutrophiles.

1 Effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages de la lignée cellulaire THP-1

Nous avons employé la lignée cellulaire monocyttaire humaine THP-1 afin d'étudier l'effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages. Les monocytes ont été différenciés en macrophages à l'aide d'un traitement par le PMA à la concentration de 150 nM pendant 48 heures.

1.1 Effet de la concentration d'adénosine sur les macrophages THP-1

Les cellules THP-1 sous forme monocyttaire ont été traitées avec des concentrations d'adénosine allant de 0,01 à 100 μ M, toujours couplées à de l'EHNA 10 μ M, 15 minutes avant leur différenciation en macrophages par le PMA. L'EHNA ralentit la dégradation de l'adénosine en inhibant l'activité de l'adénosine déaminase et augmente ainsi sa demi-vie. Cette molécule est donc associée pour chaque traitement où l'adénosine est employée.

La quantité de MMP-9 sécrétée dans les surnageants de culture des THP-1 différenciés en macrophages est mesurée par zymographie. Le surnageant des macrophages THP-1 contient deux formes de pro-MMP-9 : la forme homodimérique de haut poids moléculaire et la forme

de 92 kDa (**Figure 21, A**). En revanche, la MMP-2 (gélatinase A) n'est pas détectée. Ce profil est en accord avec les profils de production de MMP-9 par les macrophages rapportés dans la littérature³⁰⁶.

La quantification des bandes correspondant aux différentes formes de MMP-9 montre que l'adénosine entraîne une augmentation significative de la production de MMP-9 par rapport au contrôle dès l'ajout de 0,01 μM d'Ado (**Figure 21, B**). Cette augmentation a la même intensité pour les concentrations de 0,01 à 1 μM . La sécrétion de MMP-9 dépasse ce plateau à partir de 10 μM d'adénosine, elle augmente jusqu'à 3 fois lorsque les cellules sont traitées par 100 μM d'adénosine. La concentration de l'adénosine plasmatique peut atteindre 10 μM dans des conditions d'ischémie³⁵⁵ ou d'infection⁵²³, nos études à cette concentration peuvent donc représenter un effet physiologique de l'adénosine. Suite à nos résultats, les traitements à l'adénosine sont réalisés à la concentration de 10 μM dans les expériences suivantes, concentration jugée optimale pour induire une importante production de MMP-9, ainsi qu'en limitant tout effet cytotoxique.

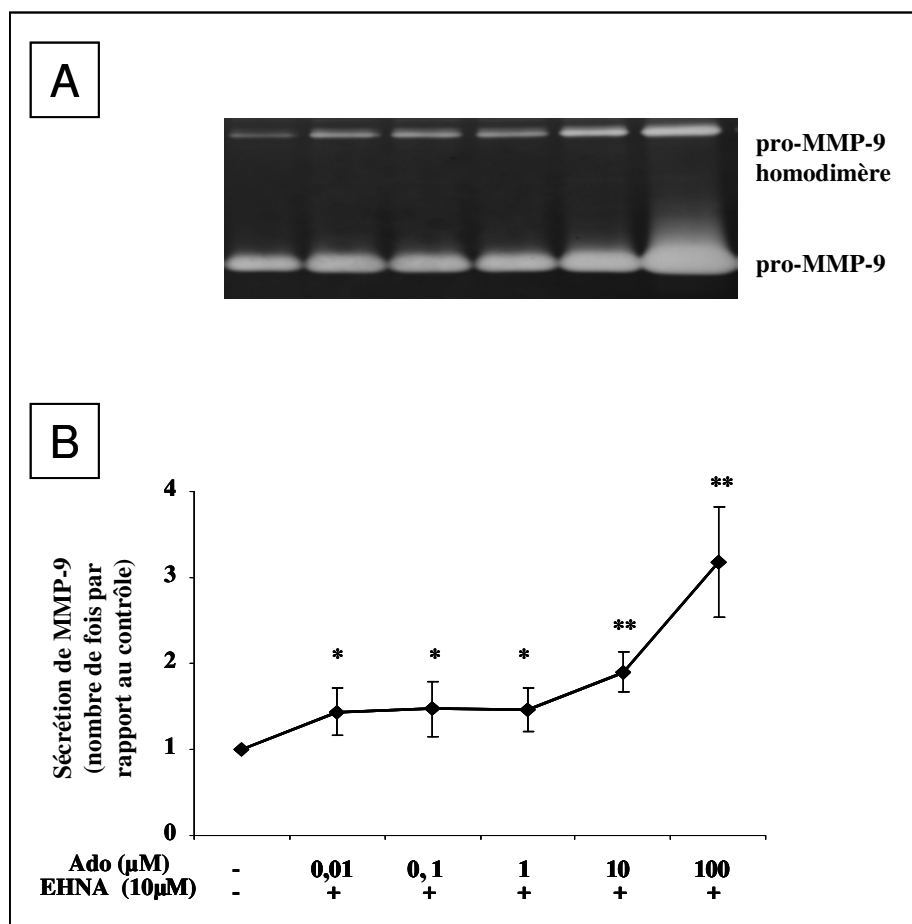


Figure 21 : L'adénosine augmente de façon concentration-dépendante la production de MMP-9 par les macrophages THP-1.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont prétraités 15 minutes par des concentrations croissantes d'Ado (0,01 à 100 µM) couplée à de l'EHNA (10 µM), puis différenciés en macrophages par ajout de PMA (150 nM) pendant 48 heures. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie et l'intensité des bandes obtenues est quantifiée par analyse densitométrique. A, Gel de zymographie représentatif montrant l'existence de deux bandes. B, Quantification montrant que l'adénosine augmente de façon dose-dépendante la production de MMP-9. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 4). * p < 0,05 versus contrôle et ** p < 0,01 versus contrôle.*

1.2 Effet de l'adénosine endogène sur la production de MMP-9

Afin de caractériser respectivement la contribution de l'adénosine exogène et endogène sur la production de MMP-9, nous avons traité les monocytes THP-1 avec uniquement de l'EHNA ou de l'Ado 10 μ M, 15 minutes avant leur différenciation en macrophages. De plus, nous avons inhibé les transporteurs membranaires de l'adénosine par un traitement au dipyridamole (DIP) 10 μ M, ce qui entraîne une augmentation de la présence de l'adénosine au niveau extracellulaire.

La production de MMP-9 a été étudiée par zymographie (**Figure 22**). Utilisés seuls, l'adénosine (apport exogène), l'EHNA ou le DIP (tous deux favorisant la contribution de l'adénosine endogène) entraînent une augmentation de la production de MMP-9 par rapport au contrôle. De plus, leurs effets sont cumulés lorsque l'adénosine est combinée avec le DIP ou l'EHNA, ce qui implique une augmentation de la sécrétion de MMP-9 due à une contribution des deux sources d'adénosine, endogène et exogène.

Nos résultats montrent que l'adénosine endogène et l'adénosine exogène sont toutes deux responsables de l'augmentation de la sécrétion de MMP-9 par les macrophages THP-1 et que leurs effets sont cumulables. Ainsi, des traitements 10 μ M d'adénosine, associés à 10 μ M d'EHNA sont utilisés pour nos prochaines expériences afin de conserver une augmentation optimale de la production de MMP-9 en utilisant les contributions de l'adénosine à la fois exogène et endogène.

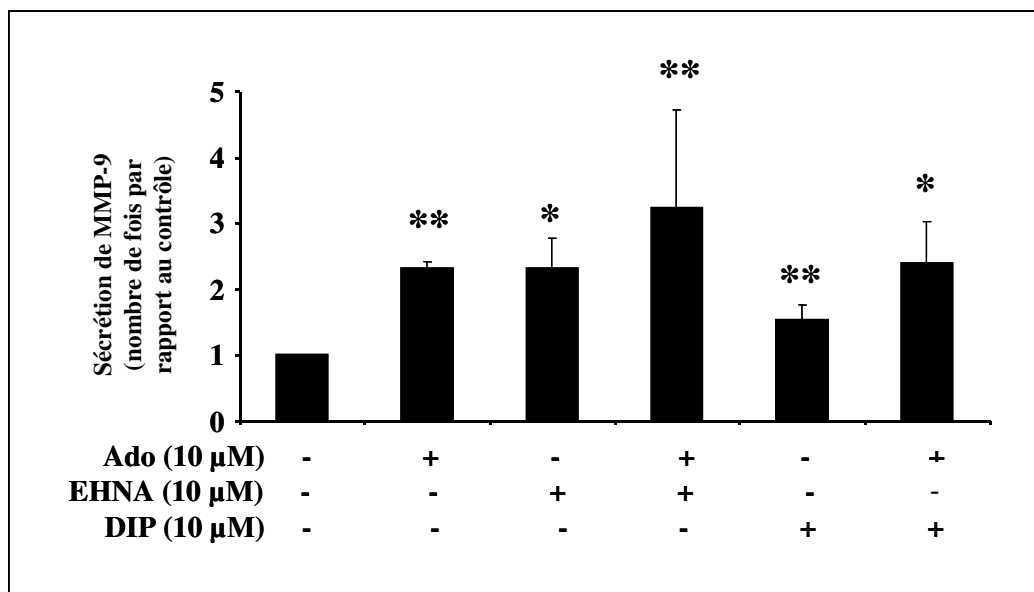


Figure 22 : La production de MMP-9 par les macrophages THP-1 est augmentée par l'adénosine exogène aussi bien qu'endogène.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont prétraités 15 minutes avec de l'Ado (10 μ M), de l'EHNA (10 μ M) et/ou du DIP (10 μ M), puis différenciés en macrophages par ajout de PMA (150 nM) pendant 48 heures. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie et l'intensité des bandes obtenues est quantifiée par analyse densitométrique. La quantification des bandes montre que l'Ado, l'EHNA ou le DIP utilisés seuls augmentent la production de MMP-9 et que leur effet est additif. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD ($n = 4$). * $p < 0,05$ versus contrôle et ** $p < 0,01$ versus contrôle.*

1.3 Production de MMP-9 au cours de la différenciation

Nous avons étudié la production de la MMP-9 par les THP-1 en cours de différenciation ou différenciés en macrophages.

Dans un premier temps, nous avons traité les cellules THP-1 en présence ou non de 10 μM d'Ado/EHNA, 15 minutes avant leur différenciation. Après avoir ajouté l'agent de différenciation PMA, nous avons récupéré les surnageants de culture à différents temps entre 1 heure et 24 heures (**Figure 23**). La production de MMP-9 dans les surnageants de milieu de culture a été évaluée par zymographie.

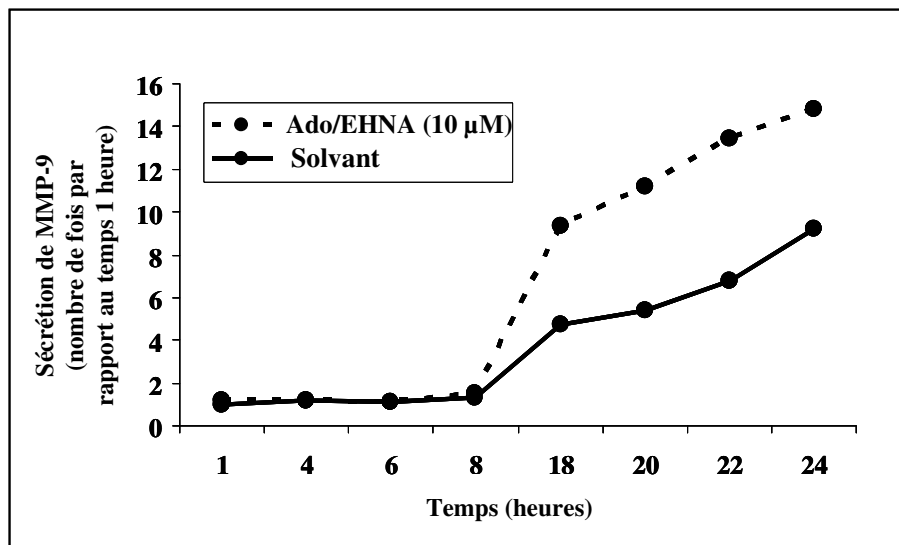


Figure 23 : L'adénosine augmente la sécrétion de MMP-9 par les THP-1 en cours de différenciation en macrophages.

Des monocytes de la lignée THP-1 sont prétraités 15 minutes avec ou sans Ado/EHNA (10 μM), puis mis en présence de l'agent de différenciation PMA (150 nM) de 1 à 24 heures. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie et l'intensité des bandes obtenues est quantifiée par analyse densitométrique. La quantification des bandes montre que le traitement Ado/EHNA entraîne une augmentation de la production de MMP-9 remarquable dès 18 heures de différenciation. Ces résultats sont issus d'une cinétique représentative.

Près de 18 heures de différenciation sont nécessaires pour obtenir une concentration de MMP-9 détectable et pour observer un effet stimulateur de l'adénosine. Cette étude suggère

que l'effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 requiert une synthèse de protéines *de novo*.

A partir des ARN totaux extraits, nous avons mesuré l'expression de l'ARNm codant pour la MMP-9 par PCR quantitative pour ces mêmes temps et nous avons observé une augmentation de cette expression dès 6 heures pour les traitements Ado/EHNA 10 μ M par rapport à la condition contrôle (**Figure 24**). Ce résultat montre que l'effet de l'adénosine entraîne une augmentation du nombre de transcrits codant pour la MMP-9 et suggère l'existence d'un mécanisme transcriptionnel.

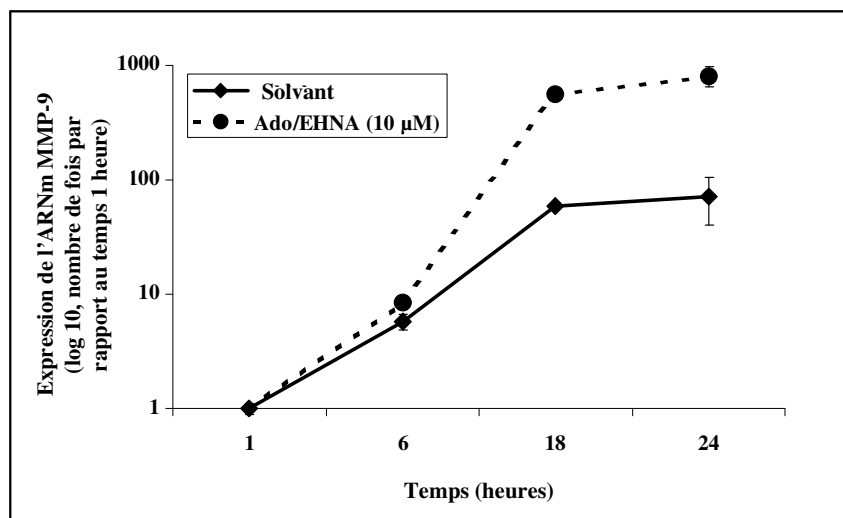


Figure 24 : L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm MMP-9 par les THP-1 en cours de différenciation en macrophages.

Des monocytes de la lignée THP-1 sont prétraités 15 minutes avec ou sans Ado/EHNA (10 μ M), puis mis en présence de l'agent de différenciation PMA (150 nM) de 1 à 24 heures. L'expression de l'ARNm MMP-9 est mesurée par PCR quantitative (qPCR). Le traitement Ado/EHNA entraîne une augmentation de l'expression des ARNm MMP-9 dès 6 heures de différenciation. Ces résultats sont issus d'une cinétique représentative. Les barres d'erreur correspondent aux duplicats de qPCR.

1.4 Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 lors d'une différenciation des monocytes et macrophages de 48 heures

Afin d'établir nos conditions expérimentales permettant d'étudier plus en détails les effets de l'adénosine sur la sécrétion de MMP-9 chez les macrophages, nous avons choisi de traiter les monocytes pendant 15 min par l'adénosine avant leur différenciation pendant 48 heures par le PMA. Nous avons comparé les effets d'un traitement Ado/EHNA sur la quantité d'ARNm ainsi que la sécrétion de la protéine MMP-9, mesurée ici par ELISA. Il est à noter qu'une très bonne corrélation entre les résultats de zymographie et d'ELISA a été démontrée au sein de notre laboratoire ⁵¹⁷.

Dans ces conditions expérimentales, nous observons que l'adénosine accroît de deux fois l'expression de l'ARNm MMP-9 et de trois fois la sécrétion de la MMP-9 dans les milieux de culture (**Figure 25**).

Ces résultats impliquent que l'augmentation de la sécrétion de la protéine MMP-9 est proportionnelle à l'avancée de la différenciation des THP-1 en macrophages. De plus, ils suggèrent un rôle de l'adénosine dans l'augmentation de la MMP-9 *via* un mécanisme transcriptionnel par les THP-1 au cours de leur différenciation en macrophages.

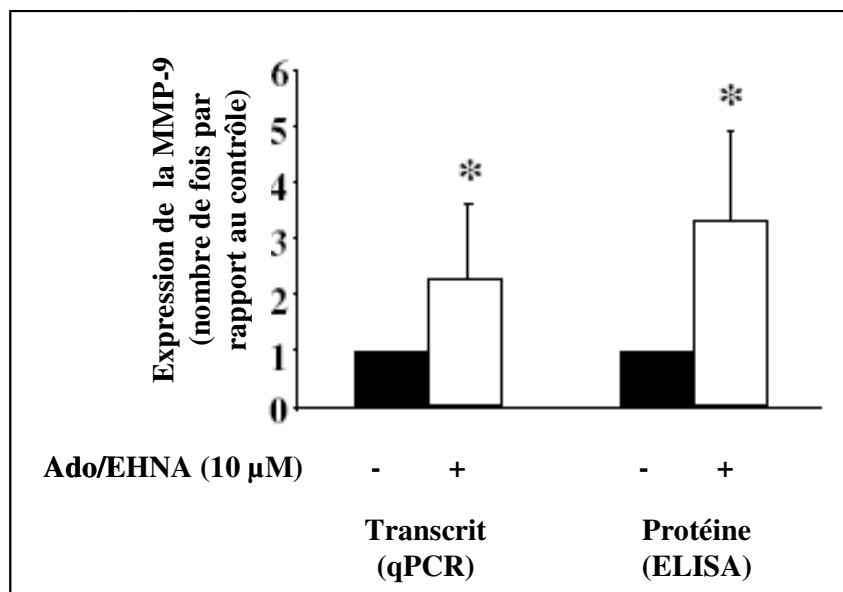


Figure 25 : L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm et de la protéine MMP-9 par les macrophages THP-1.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont prétraités 15 minutes avec ou sans Ado/EHNA (10 μM), puis mis en présence de l'agent de différenciation PMA (150 nM) pendant 48 heures. Les transcrits MMP-9 sont mesurés par qPCR. La production de MMP-9 est dosée par ELISA à partir des milieux de culture. Le traitement Ado/EHNA entraîne une augmentation de l'ARNm et de la sécrétion de MMP-9 après 48 heures de différenciation. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=6). * $p < 0,05$ versus contrôle.*

1.5 Effet l'adénosine sur certains inhibiteurs de la MMP-9

Le renouvellement de la matrice extracellulaire est contrôlé par un équilibre entre les MMPs et leurs inhibiteurs, en particulier les TIMPs.

TIMP-1 étant considéré comme le principal inhibiteur endogène de la MMP-9, nous avons mesuré sa production par ELISA dans les surnageants de THP-1 mis en présence ou

non de 10 μM d'Ado/EHNA pendant 15 minutes avant 48 heures de différenciation en macrophages par le PMA (150 nM).

L'adénosine augmente faiblement mais significativement la production de l'inhibiteur de métalloprotéases TIMP-1, ce qui suggère la mise en place d'un rétrocontrôle négatif pour compenser l'augmentation de la sécrétion de MMP-9 (**Figure 26**). Cependant, la fixation de TIMP-1 pour les formes pro-MMP-9 et pro-MMP-9 homodimère, dans des conditions stœchiométriques, a respectivement pour ratio moléculaire 1:1 et 2:1 ⁵²⁴. L'augmentation de TIMP-1 (40 %) est alors très probablement insuffisante pour compenser l'augmentation de la sécrétion de MMP-9 (trois fois par rapport au contrôle) (**Figure 25**).

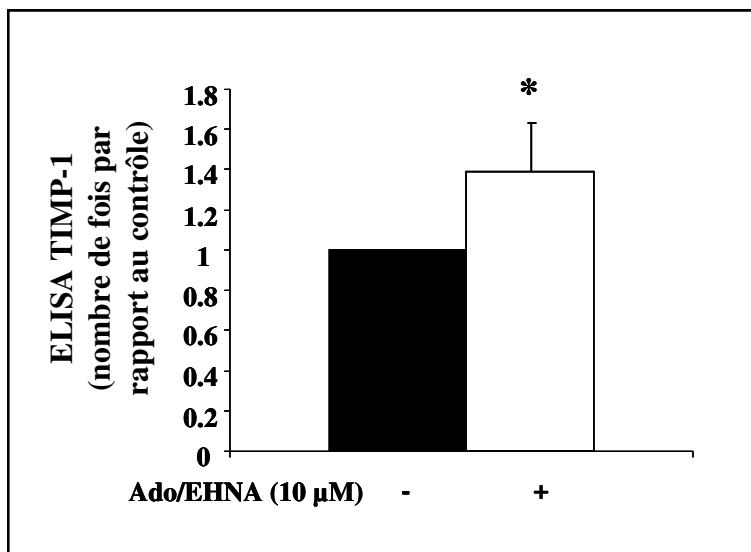


Figure 26 : L'adénosine augmente la production de TIMP-1 par les macrophages THP-1.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont prétraités 15 minutes avec ou sans Ado/EHNA (10 μM), puis mis en présence de l'agent de différenciation PMA (150 nM) pendant 48 heures. La production de MMP-9 est dosée par ELISA à partir des milieux de culture. Le traitement Ado/EHNA entraîne une augmentation de la production de TIMP-1. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n = 6). * p < 0,05 versus contrôle.*

Nous nous sommes ensuite intéressés à un autre type d'inhibiteurs de la MMP-9 : l'inhibiteur membranaire RECK, dont le promoteur est réprimé par la protéine Ras. Ras favorise l'activation transcriptionnelle de MMP-9⁵²⁵ et fait partie des voies de signalisation qui peuvent être activées par le récepteur à l'adénosine A2a⁵²⁶.

L'expression de l'ARNm RECK par les THP-1 différenciés en macrophages a été mesurée par PCR quantitative. Un traitement avec ou sans Ado/EHNA ne modifie pas significativement la quantité de transcrits codant pour RECK par rapport à la condition contrôle (**Figure 27**).

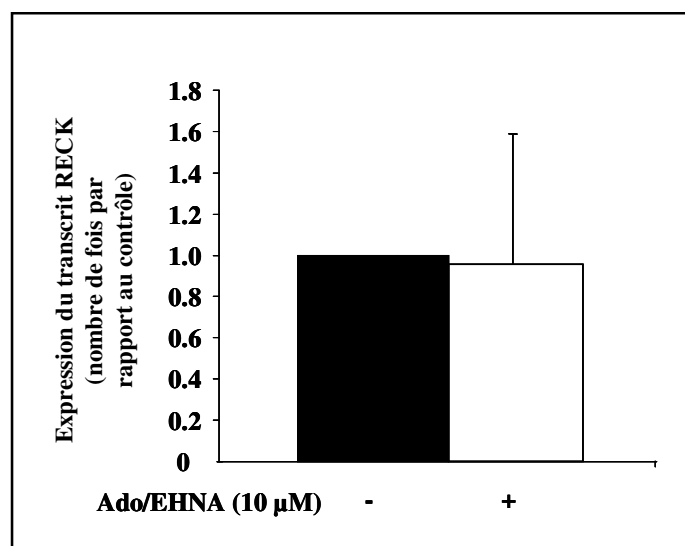


Figure 27 : L'adénosine ne modifie pas la quantité de transcrits RECK par les macrophages THP-1.

Des monocytes de la lignée THP-1 sont prétraités 15 minutes avec ou sans Ado/EHNA (10 µM), puis mis en présence de l'agent de différenciation PMA (150 nM) pendant 48 heures. Les transcrits RECK sont mesurés par qPCR. Le traitement Ado/EHNA est sans effet sur la quantité de transcrits RECK. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6).

1.6 Conclusion

Nous avons démontré que l'adénosine accroît la production de MMP-9 par les macrophages de façon significative et reproductible, tant au niveau de l'ARNm que de la protéine MMP-9. Cet effet semble impliquer un mécanisme transcriptionnel et ne paraît pas être compensé par une régulation des inhibiteurs TIMP-1 et RECK.

2 Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages primaires humains

Les données précédemment présentées étaient issues d'une lignée cellulaire, nous avons souhaité valider nos observations sur des cellules primaires humaines. Pour ce faire, nous avons mis en culture des monocytes primaires humains purifiés à partir de sang total et différenciés en macrophages avec 50 ng/ml de M-CSF pendant 7 jours.

2.1 Production basale de MMP-9 par les cellules du sang total

Nous avons tout d'abord vérifié que les volontaires sains ainsi que les patients ayant subi un infarctus du myocarde expriment le transcrite codant pour la MMP-9. Le sang des volontaires sains et les patients atteints d'infarctus du myocarde est prélevé à l'aide de tubes PAXgene® Blood RNA développés pour prévenir la dégradation de l'ARN.

L'ARNm MMP-9 a été mesuré par PCR quantitative à partir des ARN totaux extraits des cellules du sang total prélevé chez des volontaires sains ou des patients atteints d'infarctus du myocarde.

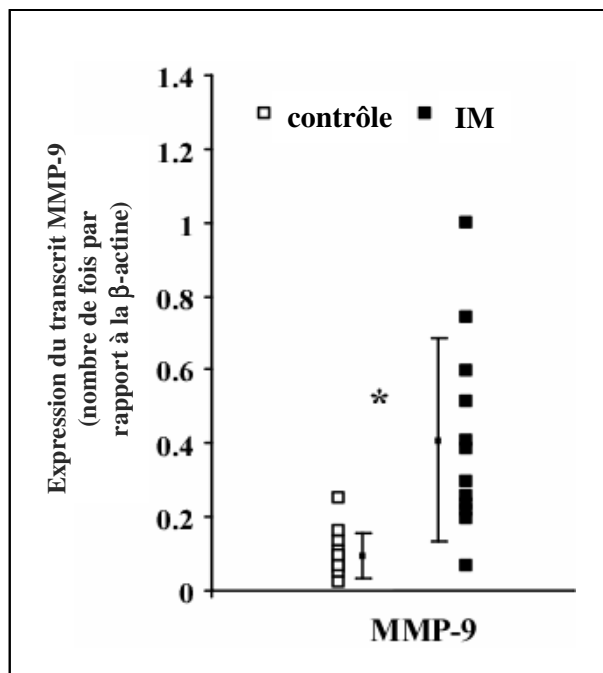


Figure 28 : L'ARNm MMP-9 est plus fortement exprimé chez les patients atteints d'infarctus du myocarde que chez les volontaires sains.

*Des prélèvements sanguins sont effectués chez des volontaires sains et des patients atteints d'infarctus du myocarde à l'aide du système PAXgene® Blood RNA. La quantité d'ARNm MMP-9 est mesurée par qPCR à partir des ARN totaux du sang total. Chaque carré représente un individu. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de référence, la β -actine, et sont exprimés par la moyenne des individus de chaque groupe \pm SD ($n = 12$). * $p < 0,05$ versus contrôle.*

Nos résultats montrent tout d'abord que l'ARNm MMP-9 est détectable dans les cellules sanguines aussi bien chez les volontaires sains que chez les patients souffrant d'infarctus du myocarde. De plus, la quantité de transcrits MMP-9 est nettement et significativement plus élevée chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde par rapport aux volontaires sains (**Figure 28**). Ces résultats corroborent des études précédemment réalisées par plusieurs équipes dont celle de Spinale ¹⁶⁵.

2.2 Effet de l'adénosine sur monocytes primaires humains différenciés en macrophages

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages issus de volontaires sains et de patients ayant subi un infarctus du myocarde.

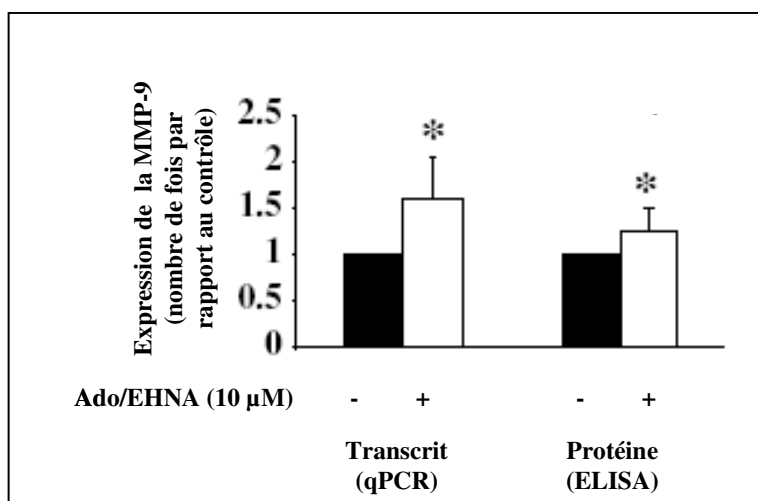


Figure 29 : L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm et de la protéine MMP-9 par les macrophages primaires humains issus de volontaires sains.

*Des monocytes primaires humains purifiés à partir de sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages, puis mis en présence ou non de 10 μM d'Ado/EHNA pendant 24 heures. La quantité d'ARNm MMP-9 est mesurée par qPCR à partir des ARN totaux du sang total. La sécrétion de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par ELISA. Le traitement Ado/EHNA entraîne une augmentation de l'expression de l'ARNm et de la sécrétion de MMP-9 par les macrophages primaires humains. Les résultats sont exprimés par la moyenne des séries ± SD (n = 8), avec * p < 0,05 versus contrôle.*

Des monocytes isolés du sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages par du M-CSF (50 ng/ml) pendant 7 jours, puis mis en présence ou non de 10 μM

d'Ado/EHNA pendant 24 heures. Les mesures de l'expression de la protéine et du transcrit MMP-9 sont effectuées par ELISA et par qPCR, respectivement, à partir des surnageants de culture et des ARN totaux. En utilisant ces deux techniques, une augmentation significative du transcrit (70 %) et de la protéine MMP-9 (20 %) est détectée suite à un traitement par Ado/EHNA (**Figure 29**).

Les mêmes tendances sont obtenues chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde, où la mesure de la sécrétion de la MMP-9 en zymographie augmente de 20 % suite à un traitement de 10 μ M d'Ado/EHNA par rapport à la condition contrôle (**Figure 30**).

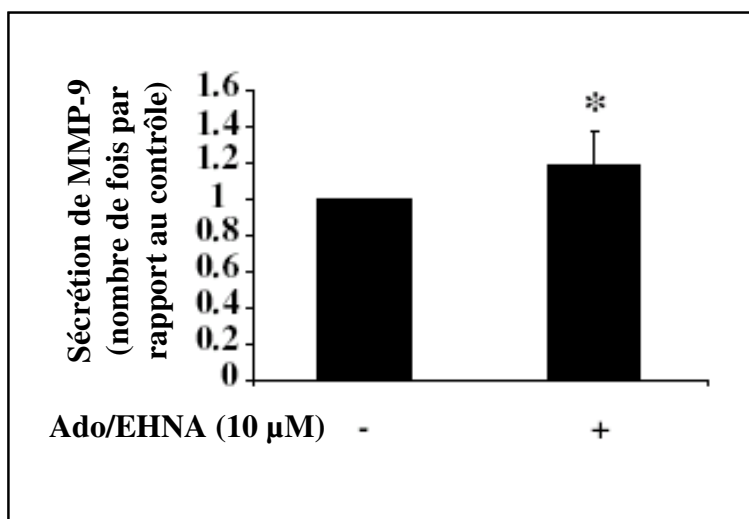


Figure 30 : L'adénosine augmente la sécrétion de la MMP-9 par les macrophages primaires humains issus de patients atteints d'infarctus du myocarde.

*Des monocytes primaires humains purifiés à partir de sang de patients atteints d'infarctus du myocarde sont différenciés en macrophages, puis mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 24 heures. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie et l'intensité des bandes obtenues est quantifiée par analyse densitométrique. La quantification des bandes montre que le traitement Ado/EHNA entraîne une augmentation de la sécrétion de MMP-9 par les monocytes primaires humains différenciés en macrophages. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n = 4). * p < 0,05 versus contrôle.*

2.3 Conclusion

Ces résultats montrent un effet positif de l'adénosine sur de la production de MMP-9 par les macrophages primaires humains. Cet effet est présent aussi bien chez les volontaires sains que chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde, bien que de plus faible amplitude que l'effet mesuré chez les macrophages dérivés de la lignée cellulaire THP-1.

CHAPITRE III :

ETUDE DES EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LA PRODUCTION DE MMP-9 PAR LES MACROPHAGES STIMULES

Nous avons démontré que l'adénosine augmente la production de MMP-9 par les macrophages, deuxième vague cellulaire à coloniser la zone infarctée après les neutrophiles. Etant donné le niveau d'activation des macrophages recrutés dans le cœur suite à un infarctus, nous avons étudié les effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 par des macrophages stimulés. Différents stimuli ont été utilisés, tout d'abord le LPS, activateur du TLR4 dont l'activation a été démontrée lors d'un infarctus³²⁸. Mais comme le ligand du TLR4, le LPS, n'est pas présent dans le cœur après infarctus, nous avons utilisé d'autres ligands endogènes du TLR4, tels que des composants de la matrice extracellulaire³³⁷.

1 Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages stimulés par le LPS

Un traitement par le LPS entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires se trouvant dans le cœur consécutivement à un infarctus du myocarde, nous avons donc utilisé ce modèle d'étude dans un traitement *in vitro* pour mimer les conditions post-infarctus.

1.1 Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages THP-1 stimulés par le LPS

Les monocytes de la lignée cellulaire THP-1 sont mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 15 minutes, puis différenciés en macrophages par 150 nM de PMA pendant 48 heures. La stimulation des macrophages est effectuée 24 heures avant la fin de la phase de différenciation par des concentrations croissantes de LPS allant de 1 à 1000 ng/ml.

L'ARNm ainsi que la protéine MMP-9 ont été quantifiés par qPCR et par zymographie, à partir des ARN totaux et des surnageant de culture.

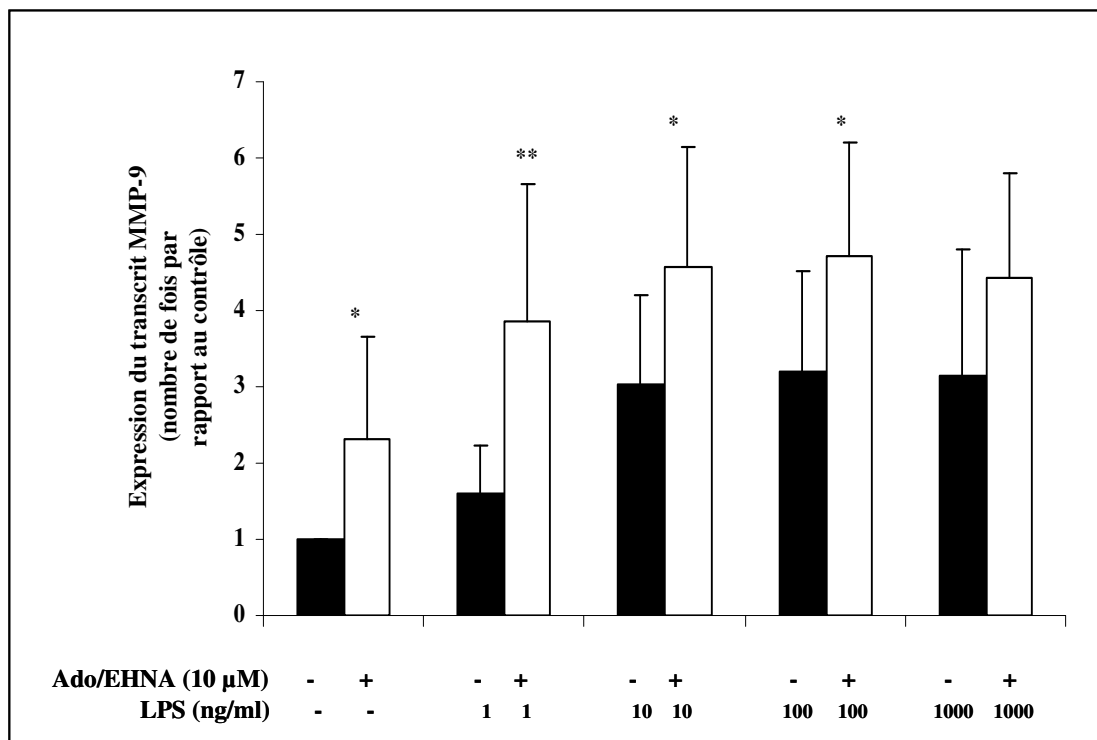


Figure 31 : Le LPS et l'adénosine augmentent l'expression de l'ARNm MMP-9 par les macrophages THP-1.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont mis en présence ou non de 10 μM d'Ado/EHNA pendant 15 minutes avant 48 heures de différenciation en macrophages (PMA 150 nM). Les macrophages sont stimulés par des concentrations croissantes de LPS (1 à 1000 ng/ml) 24 heures avant la fin de la phase de différenciation. La quantité d'ARNm MMP-9 est mesurée par qPCR à partir des ARN totaux. Le LPS augmente la quantité d'ARNm MMP-9 de façon concentration-dépendante. Cet effet est additionné à celui de l'adénosine quand les deux traitements sont couplés. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * p < 0,05 versus condition sans adénosine et ** p < 0,01 versus condition sans adénosine.*

Le LPS seul augmente la quantité d'ARNm MMP-9 dans les macrophages THP-1, de façon concentration-dépendante en atteignant un plateau dès 10 ng/ml. Lorsque le LPS est associé à un traitement par Ado/EHNA (10 μ M), une augmentation de la quantité d'ARNm MMP-9 est observée par rapport à la condition LPS seul, de plus de 50 % pour un traitement LPS 1 ng/ml et de 25 à 30 % pour les autres concentrations. Il semble qu'un pallier soit atteint à 10 ng/mL de LPS (**Figure 31**).

Le même profil est obtenu en zymographie. L'analyse densitométrique montre que, comme pour la quantité d'ARNm MMP-9, le LPS induit une augmentation concentration-dépendante de la sécrétion de la protéine MMP-9. Egalement, l'adénosine induit une augmentation supplémentaire de la production de MMP-9 dans les macrophages THP-1 stimulés ou non par le LPS. Un plateau est observé dès 10 ng/ml de LPS avec ou sans traitement à l'adénosine (**Figure 32**).

Nous avons observé un effet additif des traitements Ado/EHNA et LPS dans l'augmentation de la MMP-9, tant au niveau du messager que de la protéine. Suite à ces résultats, nous avons choisi la concentration LPS 100 ng/ml pour nos expériences suivantes afin d'obtenir un effet maximal correspondant aux plateaux observés précédemment dans la production de la MMP-9. De plus, nous avons remarqué que l'adénosine conserve ses propriétés dans l'augmentation de la MMP-9 dans les macrophages THP-1, stimulés ou non par 100 ng/ml de LPS.

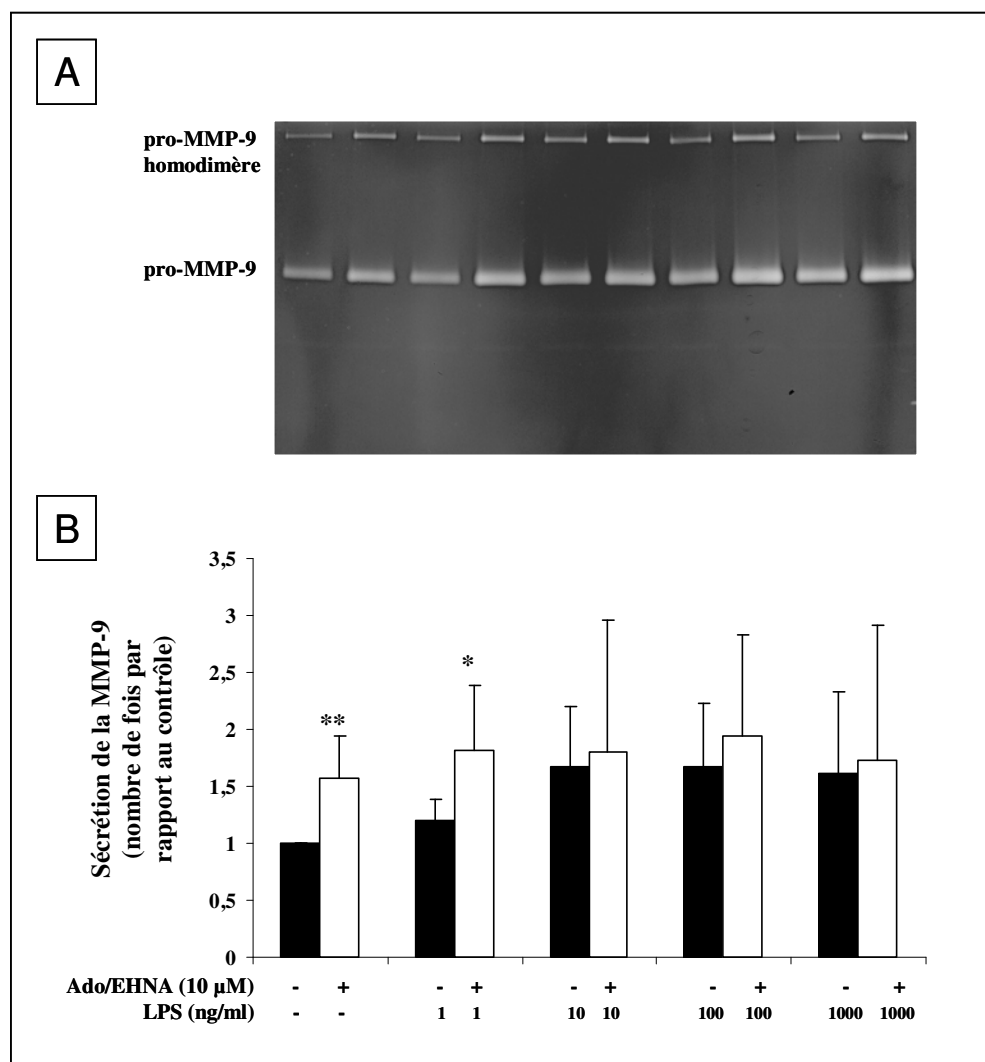


Figure 32 : Le LPS et l'adénosine augmentent la sécrétion de MMP-9 par les macrophages THP-1.

Des monocytes de la lignée THP-1 sont mis en présence ou non de 10 µM d'Ado/EHNA pendant 15 minutes avant leurs 48 heures de différenciation en macrophages (PMA 150 nM). Les macrophages sont stimulés par des concentrations croissantes de LPS (1 à 1000 ng/ml) 24 heures avant la fin de la phase de différenciation. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie et l'intensité des bandes obtenues est quantifiée par analyse densitométrique. A, Gel de zymographie représentatif montrant l'existence de deux bandes. B, Quantification montrant que le LPS augmente la sécrétion de MMP-9 de façon concentration-dépendante. Cet effet est additionné à celui de l'adénosine quand les deux traitements sont couplés. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD ($n = 6$). * $p < 0,05$ versus condition sans adénosine et ** $p < 0,01$ versus condition sans adénosine.

1.2 Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages primaires humains stimulés par le LPS

Afin de vérifier sur cellules primaires les résultats obtenus sur la lignée cellulaire THP-1, des monocytes ont été purifiés à partir de sang total issu de volontaires sains et ont été différenciés en macrophages avec 50 ng/ml de M-CSF pendant 7 jours, puis stimulés 24 heures avec 100 ng/ml de LPS. Des traitements Ado/EHNA 10 μ M ont été effectués 15 minutes avant la stimulation par le LPS. L'ARNm ainsi que la protéine MMP-9 ont été quantifiés par qPCR et par zymographie, à partir des ARN totaux et des surnageants de culture.

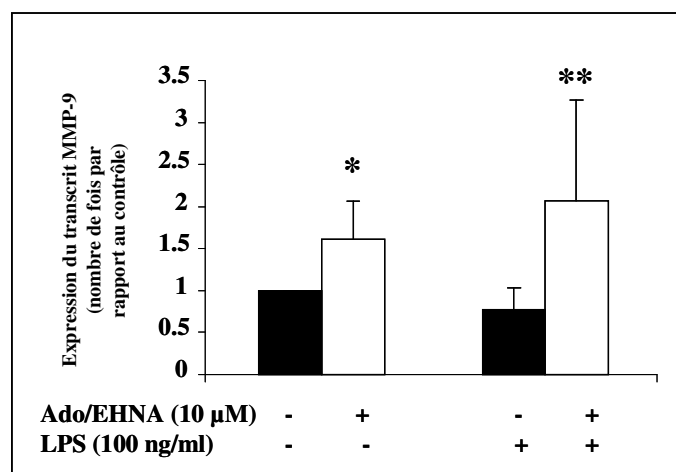


Figure 33 : L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm MMP-9 par les macrophages primaires humains stimulés ou non par le LPS.

Des monocytes primaires humains purifiés à partir de sang de volontaires sains sont différenciés en macrophages, puis mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 15 minutes avant d'être stimulés ou non par 100 ng/ml de LPS pendant 24 heures. La quantité d'ARNm MMP-9 est mesurée par qPCR à partir des ARN totaux. Son association avec l'adénosine entraîne une sécrétion de MMP-9 supérieure à celle de la condition adénosine seule. Les résultats sont exprimés par la moyenne des séries \pm SD ($n = 8$), avec * $p < 0,05$ versus condition sans adénosine et ** $p < 0,01$ versus condition sans adénosine.

Une analyse par PCR quantitative montre une augmentation significative de l'expression du transcrit MMP-9 lors d'un traitement à l'adénosine et ceci dans les conditions avec ou sans LPS. Le LPS seul est sans effet. Cependant, ajouté aux macrophages prétraités par l'adénosine, le LPS entraîne une augmentation de l'ARNm codant pour la MMP-9 supérieure au traitement par Ado/EHNA seul (**Figure 33**).

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec les macrophages THP-1 : l'effet de l'adénosine dans l'augmentation de la production de MMP-9 est conservé dans les monocytes primaires humains différenciés en macrophages, que les cellules soient stimulées ou non par le LPS. De plus, les effets de l'adénosine semblent amplifier l'utilisation d'un agent stimulant comme le LPS, comparés à l'utilisation du LPS seul.

1.3 Modulation du système de reconnaissance du LPS par l'adénosine

Les monocytes-macrophages possèdent un système de reconnaissance au LPS constitué de 3 éléments : le TLR4, le récepteur CD14 et la protéine accessoire MD-2. Nous avons montré que l'augmentation de la production de MMP-9 par le LPS chez les macrophages THP-1 est supérieure lorsque les cellules sont prétraitées par l'adénosine. Ces résultats nous ont conduits à émettre l'hypothèse que l'adénosine pourrait moduler certains des éléments du système de reconnaissance du LPS.

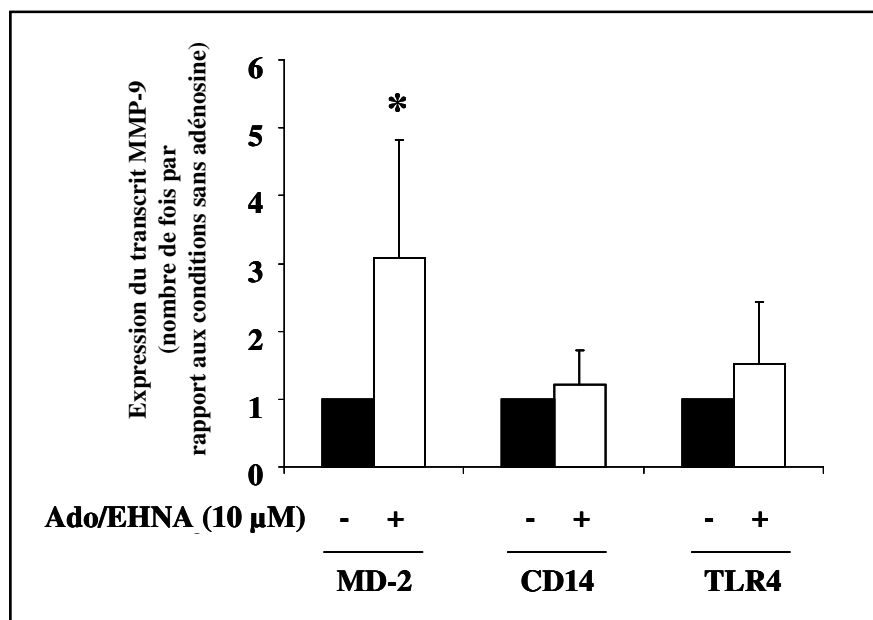


Figure 34 : L'adénosine augmente l'expression de l'ARNm MD-2 dans les macrophages THP-1.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont mis en présence ou non de 10 μM d'Ado/EHNA 15 minutes avant leurs 48 heures de différenciation en macrophages (PMA 150 nM). La quantité d'ARNm codant pour les gènes du système de reconnaissance du LPS est mesurée par qPCR à partir des ARN totaux. L'adénosine augmente significativement la quantité d'ARNm MD-2, alors que l'expression des transcrits CD14 et TLR4 reste inchangée. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 6). * p < 0,05 versus condition sans adénosine.*

Nous avons donc mesuré par PCR quantitative l'expression des ARNm codant pour MD-2, TLR4 et CD14 dans des cellules THP-1 prétraitées ou non pendant 15 minutes avec 10 μM d'Ado/EHNA avant leur différenciation en macrophages par 150 nM de PMA pendant 48 heures.

Les analyses par qPCR montrent que la quantité de transcrits codant pour MD-2 par les macrophages THP-1 augmente de près de 3 fois suite à l'ajout d'Ado/EHNA. Les ARNm TLR4 ET CD14 ne montrent pas de variation d'expression significative (**Figure 34**).

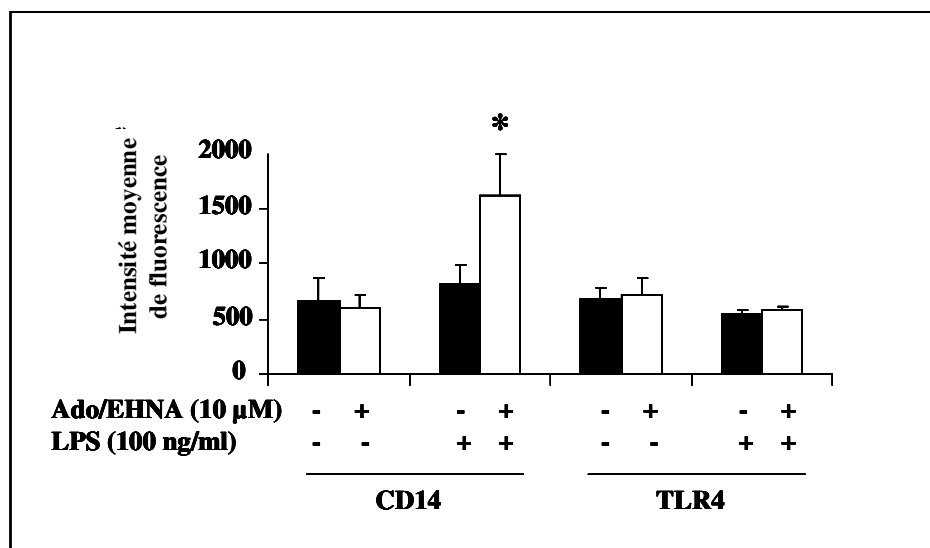


Figure 35 : L'adénosine augmente l'expression de la protéine CD14 membranaire par les macrophages THP-1 stimulés par le LPS.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA 15 minutes avant 48 heures de différenciation en macrophages (PMA 150 nM). Les cellules sont stimulées ou non par 100 ng/ml de LPS pendant 24 heures avant la fin de la phase de différenciation. L'expression des protéines CD14 et TLR4 est mesurée par cytométrie en flux. L'adénosine couplée au LPS augmente significativement l'expression de CD14, alors que l'expression de TLR4 reste inchangée quelque soient les traitements employés. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n = 3). * p < 0,05 versus condition sans adénosine.*

L'ARNm codant pour TLR4 ne varie pas sous l'action de l'adénosine dans nos expériences, cependant des récentes études montrent un recrutement de la protéine TLR4 au niveau de la membrane de macrophages stimulés par un stress oxydant⁵²⁷. Nous avons alors mesuré par cytométrie en flux l'expression des protéines membranaires CD14 et TLR4, sur

les macrophages THP-1 prétraités ou non avec 10 μ M d'Ado/EHNA, puis stimulés ou non pendant 24 heures par 100 ng/ml de LPS.

L'analyse en cytométrie en flux des protéines membranaires CD14 et TLR4 montre que le traitement Ado/EHNA seul n'entraîne pas de changement dans l'expression des protéines TLR4 et CD14 au niveau de la membrane extracellulaire. En revanche, couplé au LPS, l'adénosine augmente de près de 2 fois l'expression de CD14 (**Figure 35**).

En plus de son appartenance au système de reconnaissance du LPS, le récepteur CD14 est un marqueur de la différenciation des monocytes en macrophages, très exprimé chez ces derniers. Les résultats obtenus en cytométrie pour la protéine CD14 suggèrent un effet de l'adénosine sur la différenciation des THP-1 monocytes en macrophages. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences sur les THP-1 dans lesquelles le traitement Ado/EHNA 10 μ M a été ajouté 15 minutes avant la phase de stimulation par le LPS et non pas avant la phase de différenciation par le PMA. Nous avons obtenus des effets du même ordre que ceux obtenus dans les traitements où le couple Ado/EHNA était administré avant différenciation, cependant ils étaient moins marqués (données non présentées). Ces résultats laissent à penser que l'adénosine possède un effet sur la différenciation des monocytes. Une autre possibilité serait que le traitement Ado/EHNA après différenciation ne laisse pas le temps au mécanisme transcriptionnel de se mettre en place, d'où un effet de l'adénosine atténué.

Ces données suggèrent que l'adénosine induit un priming des THP-1 différenciés en macrophages pour faciliter leur réponse au LPS et permettent d'expliquer la remarquable augmentation de la MMP-9 quand le LPS est appliqué sur des cellules prétraitées par l'adénosine.

1.4 Conclusion

Nos résultats montrent que le LPS induit une augmentation concentration-dépendante de la production de MMP-9 par les macrophages et que cet effet est amplifié par un prétraitement par l'adénosine. Ceci pourrait s'expliquer par un effet de l'adénosine sur le système de reconnaissance du LPS.

2 Effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages stimulés par d'autres types de stimuli

2.1 *Autres méthodes de stimulation des macrophages THP-1*

Nous avons étudié l'effet d'un prétraitement à l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages THP-1 stimulés par d'autres agents que le LPS, tels que le fMLP ou un stress hypoxique.

La concentration de MMP-9 est dosée par ELISA dans les surnageant de culture. Les macrophages THP-1 prétraités ou non à l'adénosine sont stimulés pendant 24 heures avant la fin de leur différenciation par la fMLP (peptide synthétique mimant l'activité des peptides bactériens) et par une période d'hypoxie de 24 heures, modèle expérimentale mimant certains effets d'une ischémie. Ces traitements ont été réalisés conjointement avec une stimulation par le LPS.

Tous comme le LPS, la fMLP et l'hypoxie entraînent une augmentation de la production de MMP-9 supérieure au niveau basal observé dans les THP-1 différenciés en macrophages, bien que l'augmentation induite par la fMLP ne soit pas statistiquement significative. Un prétraitement des macrophages THP-1 à l'adénosine entraîne une augmentation supplémentaire de la production de MMP-9 par rapport au contrôle sans adénosine quelque soit le stimulus employé. De même, cet effet n'est pas significatif lorsque les macrophages sont stimulés par la fMLP. Le prétraitement par l'adénosine induit une plus forte sécrétion de MMP-9 par les macrophages stimulés en condition hypoxique que par ceux stimulés par le LPS (**Figure 36**).

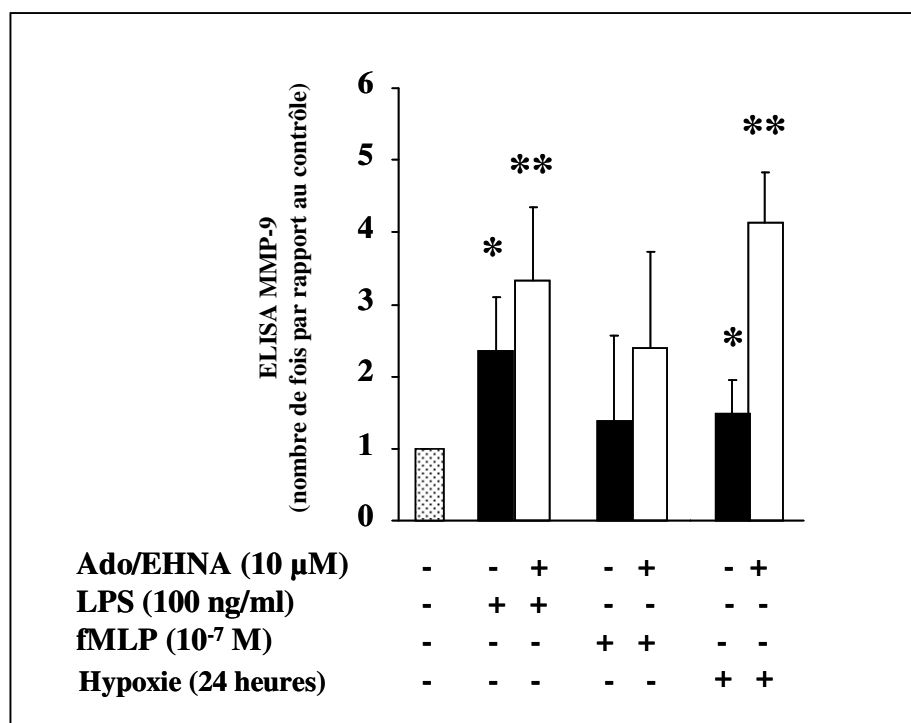


Figure 36 : L'adénosine augmente la production de MMP-9 par les macrophages THP-1 en hypoxie.

Des monocytes de la lignée THP-1 sont mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 15 minutes avant 48 heures de différenciation en macrophages (PMA 150 nM). Les cellules sont stimulées ou non par 100 ng/ml de LPS, 10⁻⁷ M de fMLP ou des conditions hypoxiques 24 heures avant la fin de la phase de différenciation. La concentration de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par ELISA. L'adénosine couplée au LPS ou à des conditions hypoxiques entraîne une augmentation supérieure de la sécrétion de MMP-9, comparée à l'emploi de LPS ou de conditions hypoxiques seuls. En revanche, l'utilisation de fMLP associée ou non à l'adénosine reste sans effet. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD ($n = 3$). * $p < 0,05$ versus contrôle et ** $p < 0,01$ versus contrôle.

Ces résultats suggèrent à nouveau que l'adénosine induit un priming des THP-1 sous forme monocyttaire, qui favoriserait leur réponse à une stimulation lorsqu'ils sont différenciés en macrophages.

2.2 Stimulation des macrophages THP-1 par divers ligands du TLR4

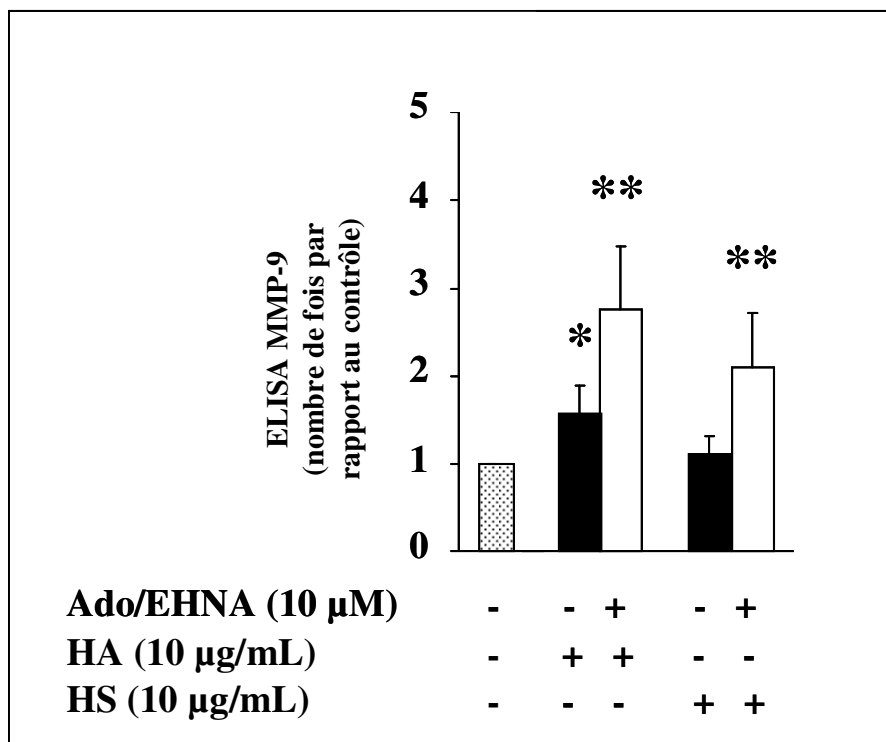


Figure 37 : L'adénosine associée à l'acide hyaluronique augmente la production de MMP-9 par les macrophages THP-1.

Des monocytes de la lignée THP-1 sont mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA 15 minutes avant leurs 48 heures de différenciation en macrophages (PMA 150 nM). Les cellules sont stimulées ou non par 10 μ g/ml d'acide hyaluronique (HA) ou d'héparane sulfate (HS) 24 heures avant la fin de la phase de différenciation. La concentration de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par ELISA. L'adénosine couplée à l'HA entraîne une augmentation supérieure de la sécrétion de MMP-9, comparée à l'emploi d'HA seul. L'utilisation d'HS seul reste sans effet, en revanche son association avec l'adénosine augmente la production de MMP-9. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD ($n = 3$). * $p < 0,05$ versus contrôle et ** $p < 0,01$ versus contrôle.

Nous avons précédemment utilisé le LPS pour stimuler les THP-1 différenciés en macrophages. Les résultats obtenus ont suggéré que l'adénosine pourrait moduler certains éléments du système de reconnaissance du LPS, tels que le TLR4 dont l'activation a été démontrée après infarctus du myocarde ³²⁸. Une littérature importante traite d'autres ligands potentiels du TLR4 ³³⁷, dont certains, endogènes, pourraient être présents dans le cœur après infarctus du myocarde et pourraient donc être responsable de l'activation du TLR4. C'est le cas de certains composants de la matrice extracellulaire dont la mobilisation a été démontrée après un période d'ischémie : l'acide hyaluronique (HA) ^{287, 336} et un mélange d'héparanes sulfate (HS) ³³⁷. Nous avons donc mesuré la concentration de MMP-9 par ELISA dans les surnageant de culture issus de macrophages prétraités par l'adénosine et stimulés par l'HA et l'HS.

L'HA seul entraîne une augmentation significative de la production de MMP-9 par rapport au niveau basal, alors que l'HS n'a pas d'effet. L'adénosine quant à elle induit une augmentation supplémentaire de la production de MMP-9 lorsque les macrophages sont stimulés par l'HA aussi bien que par l'HS (**Figure 37**). Les taux de MMP-9 obtenus pour la condition HA et la condition hypoxie sont du même ordre que ceux obtenus pour les traitements avec LPS (**Figure 36** et **Figure 37**).

2.3 Conclusion

Nous avons montré que l'adénosine est capable de stimuler la production de MMP-9 par des macrophages activés par divers stimuli. C'est en condition hypoxique mimant une période ischémique que la production de MMP-9 est maximale (4 fois par rapport au contrôle). Tous les ligands potentiels du TLR4 ne sont pas capables d'induire une production de MMP-9 de la même intensité, le LPS restant le ligand le plus puissant. Comme précédemment, l'adénosine semble induire un priming des THP-1 sous forme monocyttaire en favorisant leur réponse à un stimulus lorsqu'ils sont différenciés en macrophages.

CHAPITRE IV :

IMPLICATION DES RECEPTEURS A L'ADENOSINE DANS LA PRODUCTION DE LA MMP-9 PAR LES MACROPHAGES

L'adénosine diminue la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles *via* le récepteur à l'adénosine A2a. En revanche, elle augmente la production de MMP-9 par les macrophages, stimulés ou non. Afin d'expliquer ces effets opposés, nous avons émis l'hypothèse que l'adénosine pourrait activer des récepteurs différents à la surface des neutrophiles et des macrophages. Le but des travaux suivants a donc été de caractériser le(s) récepteur(s) à l'adénosine impliqué(s) dans l'effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages. Deux approches complémentaires ont été engagées, la première pharmacologique, reposant sur l'utilisation d'analogues de l'adénosine, et la seconde moléculaire, reposant sur la modification expérimentale de l'expression des récepteurs à l'adénosine.

1 Expression basale des récepteurs à adénosine

Nous avons tout d'abord souhaité caractériser l'expression relative des 4 récepteurs à l'adénosine chez les macrophages THP-1. L'absence d'anticorps spécifiques utilisables en western blot nous a conduits à effectuer cette mesure par qPCR.

Le transcrite codant pour le récepteur A2b est le plus exprimé dans les THP-1 sous forme monocytaire par rapport aux transcrits A2a & A3 qui le sont très faiblement (A1 n'étant pas détectable). Les expressions des transcrits A2b et A3 restent inchangées lorsque les cellules sont différenciées en macrophages, alors que l'expression du transcrite A2a augmente (données non présentées).

Puis nous avons déterminé par PCR quantitative, le taux d'expression des transcrits codant pour les récepteurs à l'adénosine : A1, A2a, A2b & A3, par les macrophages THP-1, prétraités ou non avec 10 μ M d'Ado/EHNA 15 minutes avant 48 heures de différenciation.

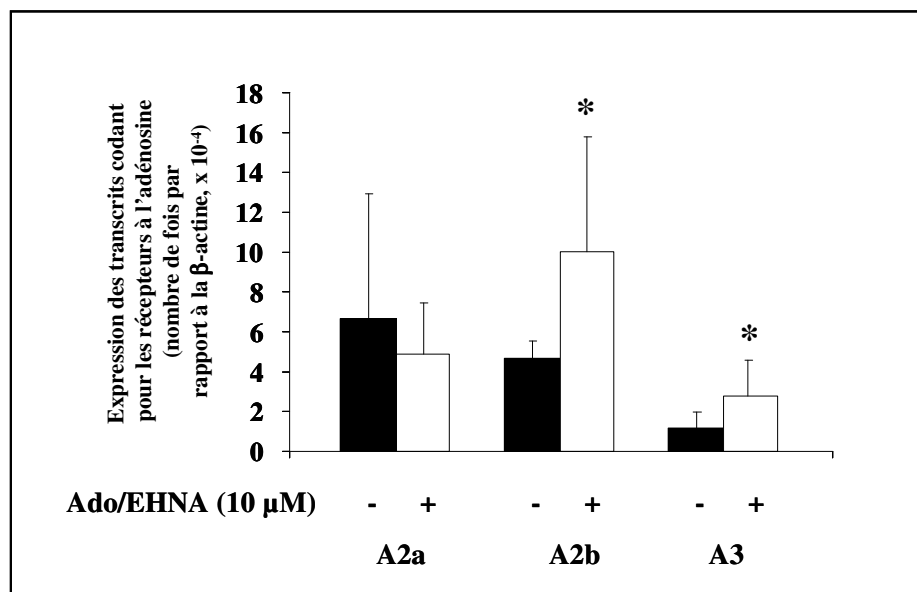


Figure 38 : L'adénosine augmente l'expression des ARNm codant pour les récepteurs à l'adénosine A2b et A3 par les macrophages THP-1.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont prétraités pendant 15 minutes avec ou sans Ado/EHNA (10 μM), puis mis en présence de l'agent de différenciation PMA (150 nM) pendant 48 heures. Les transcrits des récepteurs à l'adénosine sont mesurés par qPCR à partir des ARN totaux. Le traitement Ado/EHNA entraîne une augmentation de l'ARNm A2b et A3 après 48 heures de différenciation. Les résultats sont normalisés par rapport au gène de référence, la β-actine, et sont exprimés en moyenne ± SD (n=6). * p < 0,05 versus sans Ado/EHNA.*

Les transcrits codant pour les récepteurs à l'adénosine A2a et A2b sont 4 fois plus exprimés par les macrophages THP-1 que ceux codant pour le récepteur A3, à l'état basal. L'addition d'Ado/EHNA entraîne une augmentation de plus de 2 fois de l'expression des transcrits A2b et A3, alors que la quantité d'ARNm A2a ne varie pas (**Figure 38**).

Ces données suggèrent que l'augmentation de la production de MMP-9 par les macrophages THP-1 passe par l'activation des récepteurs A2b et A3. Afin de vérifier

l'implication de ces récepteurs dans la production de MMP-9 par les macrophages THP-1, des approches pharmacologiques et moléculaires ont été engagées.

2 Approche pharmacologique

Nous avons utilisé des agonistes et des antagonistes connus pour être les plus spécifiques chez l'Homme (**Tableau 2** page 100) afin d'activer de façon spécifique l'un ou l'autre des récepteurs à l'adénosine. Les agonistes sont employés en prétraitement 15 minutes avant la différenciation des THP-1 en macrophages, à des concentrations de 0,1 à 10 μ M et sans EHNA, afin de limiter l'incidence de l'adénosine endogène et de n'étudier que les effets propres des agonistes sur les récepteurs. Les antagonistes sont appliqués 15 minutes avant un prétraitement de 15 minutes par 10 μ M d'adénosine précédant la différenciation des THP-1 en macrophages. Comme pour les agonistes, le prétraitement à l'adénosine est effectué sans EHNA.

Une analyse par zymographie à partir des surnageants de milieux de culture est effectuée pour étudier la production de MMP-9 par les macrophages THP-1 en réponse aux différentes concentrations d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs à l'adénosine.

La quantification par zymographie révèle que seul l'IB-MECA (agoniste du récepteur à l'adénosine A3) augmente la production de MMP-9 par les macrophages THP-1 (**Figure 39**). L'absence d'agoniste spécifique du récepteur A2b ne nous permet pas de conclure à une éventuelle implication de ce récepteur. D'autres expériences ont montré qu'aucun des antagonistes des récepteurs à l'adénosine utilisés n'ont été capables de réduire de façon significative l'augmentation de la production de MMP-9 induite par l'adénosine (données non présentées).

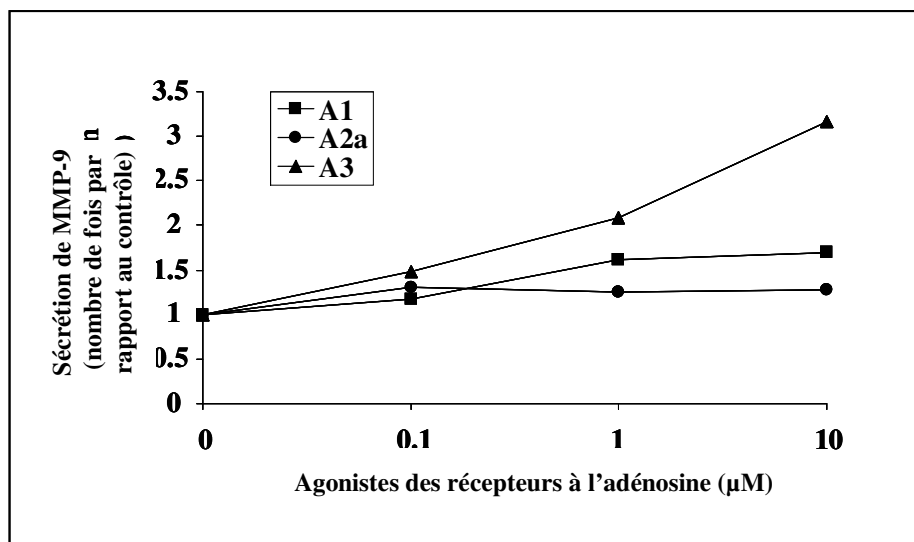


Figure 39 : L'agoniste du récepteur à l'adénosine A3 augmente la production de MMP-9 par les macrophages THP-1.

Des monocytes de la lignée THP-1 sont prétraités pendant 15 minutes par des concentrations croissantes (0,1 à 10 μM) d'agonistes spécifiques des récepteurs à l'adénosine (A1-spécifique C8031, A2a-spécifique CGS 2160 et A3-spécifique IB-MECA), puis mis en présence de PMA (150 nM) pendant 48 heures. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie et l'intensité des bandes obtenues est quantifiée par analyse densitométrique. L'agoniste du récepteur à l'adénosine A3 augmente de façon dose-dépendante la production de MMP-9 par les macrophages THP-1. Expérience représentative de deux manipulations indépendantes.

Analysés ensemble, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la sécrétion de MMP-9 par les THP-1 différenciés en macrophages prétraités avec de l'adénosine passe par la voie du récepteur A3.

3 Approche moléculaire

Bien que la spécificité des analogues de l'adénosine utilisés dans les expériences précédentes soit reconnue, il n'est pas exclu que certaines molécules activent d'autres récepteurs que leur récepteur cible lorsqu'elles sont utilisées à des concentrations élevées. Ceci pris en considération, avec l'absence d'agoniste spécifique du récepteur A2b et l'absence des effets des antagonistes, nous avons jugé nécessaire de vérifier les résultats obtenus précédemment par une autre approche, moléculaire cette fois-ci. Nous avons donc étudié les effets de l'adénosine sur la production de MMP-9 suite à une répression des récepteurs à l'adénosine.

L'expression des récepteurs à l'adénosine a été réprimée par l'emploi de siARN spécifiques de chacun des types de récepteurs.

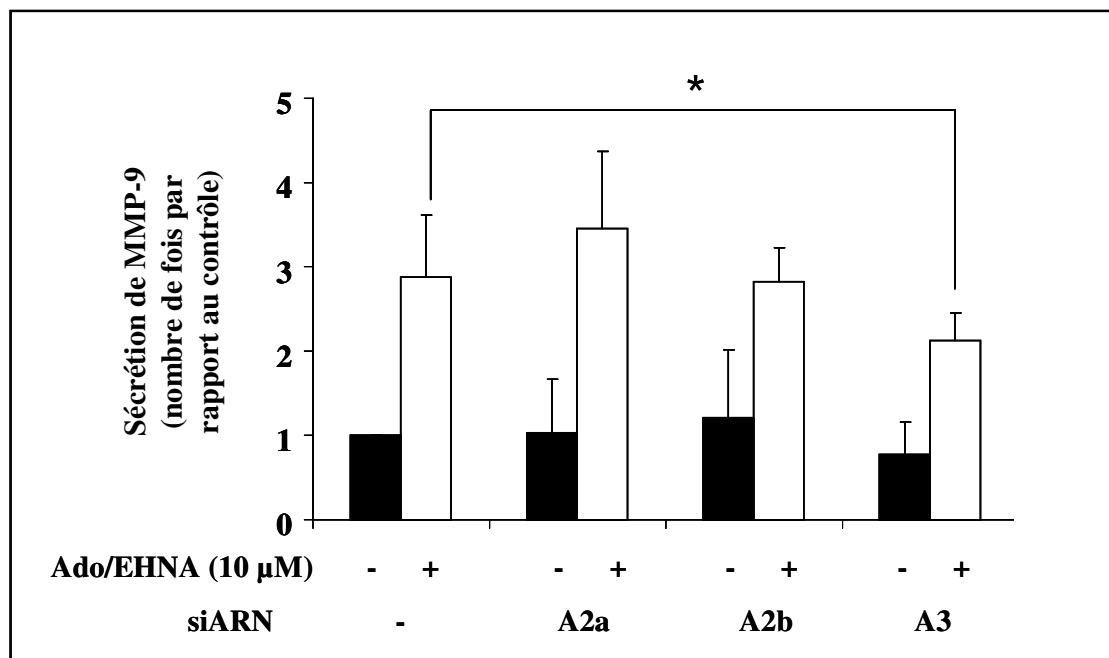


Figure 40 : Le siARN A3 inhibe l'effet de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages THP-1.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont transfectés avec des siRNA spécifiques des récepteurs à l'adénosine. 48 heures après transfection, les cellules sont prétraitées pendant 15 minutes avec ou sans Ado/EHNA (10 μM), puis mis en présence de l'agent de différenciation PMA (150 nM) pendant 48 heures. La production de MMP-9 est dosée dans les milieux de culture par zymographie. L'augmentation de la production de MMP-9 par l'adénosine est de moindre amplitude lorsque l'expression du récepteur A3 a été partiellement réprimée. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n=3. * p < 0,05 versus Ado/EHNA.*

Nous avons transfecté par Nucléofection® des THP-1 non différenciés (sous forme monocyttaire) avec des siARNs complémentaires des transcrits codant pour les récepteurs à l'adénosine A2a, A2b et A3. Les cellules et milieux de cultures ont été récupérés 48 heures après transfection et l'expression des récepteurs à l'adénosine a été analysée en PCR quantitative. En utilisant les siARNs correspondants, les transcrits codants pour le récepteur

A2a sont diminués de 70 %, ceux pour le récepteur A2b de 50 % et ceux pour le récepteur A3 de 80 % par rapport aux conditions contrôle (données non présentées).

Après avoir vérifié l'efficacité des siARN, nous avons étudié l'effet d'un traitement Ado/EHNA 10 μ M sur les macrophages THP-1 transfectés par les siARNs spécifiques des récepteurs A2a, A2b ou A3. 48 heures après transfection, les THP-1 sous forme monocyttaire sont traités avec ou sans 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 15 minutes avant différenciation. Des analyses en zymographie sont effectuées à partir des surnageants de culture pour évaluer la production de la MMP-9.

Nos résultats montrent que l'augmentation de la production de MMP-9 par l'adénosine est inhibée partiellement lorsque l'expression du récepteur A3 est réprimée. En revanche, cette augmentation reste inchangée lorsque les récepteurs A2a ou A2b sont réprimés (**Figure 40**).

4 Conclusion

Les études présentées dans ce chapitre ont montré que l'adénosine modifie l'expression de ses propres récepteurs, les récepteurs A2b et A3 étant augmentés. L'utilisation de drogues spécifiques des différents récepteurs ainsi qu'une approche moléculaire visant à réprimer l'expression de l'un ou l'autre des récepteurs ont permis de conclure que l'augmentation de la production de MMP-9 par l'adénosine chez les macrophages passe par une activation du récepteur A3. Cette observation permettrait d'expliquer les effets opposés de l'adénosine sur la production de MMP-9 par les neutrophiles et les macrophages. En effet, cette production est réprimée chez les neutrophiles montre l'activation du récepteur A2a, alors qu'elle est activée chez les macrophages suite à l'activation du récepteur A3.

CHAPITRE V :

MONOCYTES ET TISSU DE GRANULATION

Durant la phase de remodelage précoce post-IM, les cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages...) associées aux fibroblastes et aux cellules endothéliales forment un tissu de granulation qui remplace le tissu lésé. Ce tissu provisoire sécrète un gradient d'agents chimioattractants qui attirent les monocytes, en les faisant migrer dans la zone infarctée, où ils se différencient en macrophages. Puis ces macrophages entrent en apoptose après la phase aiguë de l'infarctus. L'inhibition de cette apoptose permettrait une amélioration du remodelage ventriculaire gauche¹⁹. Nous avons étudié l'effet de l'adénosine sur la migration et l'apoptose des monocytes-macrophages. Ces travaux ont été précédés par la mise au point d'un modèle de chambre de Boyden permettant d'évaluer la migration monocyttaire et d'un modèle d'apoptose des monocytes.

1 Effet de l'adénosine sur la migration monocyttaire

La migration des monocytes-macrophages dans le tissu cardiaque est caractéristique du remodelage ventriculaire après infarctus. L'infiltration cellulaire dans le tissu de granulation est facilitée par un gradient de molécules chimioattractantes et par la dégradation de la matrice extracellulaire grâce à la MMP-9.

1.1 Effet de l'adénosine sur le récepteur aux chimiokines CCR2

Les monocytes-macrophages possèdent des récepteurs membranaires aux chimiokines, dont le CCR2 sur lequel se lie la MCP-1, sécrétée en gradient croissant jusqu'au tissu de granulation situé au sein de l'infarctus. Nous avons étudié l'effet de l'adénosine sur l'expression du récepteur CCR2 chez les monocytes-macrophages.

Nous avons tout d'abord évalué l'expression de l'ARNm CCR2 par PCR quantitative dans les THP-1 à la fois sous forme monocyte et macrophage. Les monocytes THP-1 sont mis

en présence ou non de 10 μM d'Ado/EHNA pendant 24 heures et les macrophages THP-1 sont prétraités 24 heures avec ou sans Ado/EHNA 10 μM avant différenciation.

Le traitement Ado/EHNA augmente de 50 % l'expression du transcrite CCR2 dans les THP-1 monocytes, alors qu'il la diminue de 75 % dans les THP-1 différenciés en macrophages (**Figure 41**).

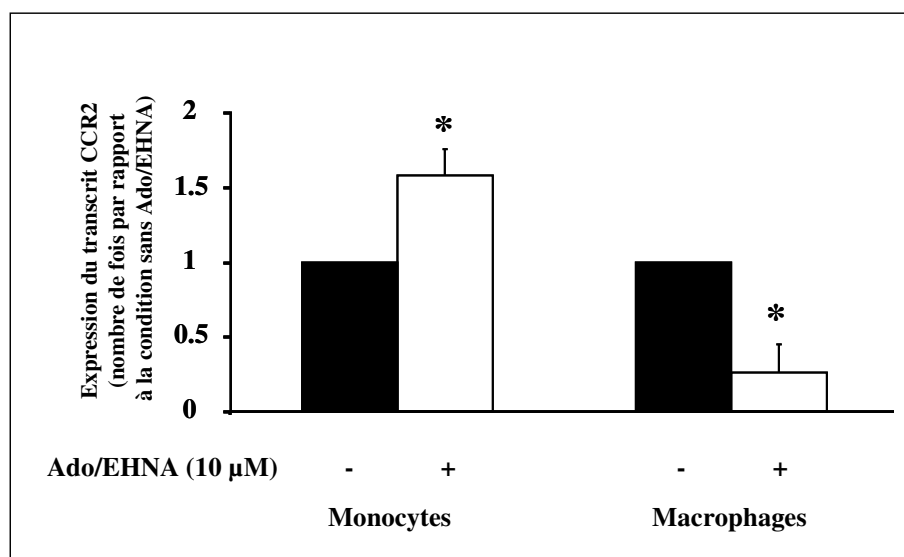


Figure 41 : L'adénosine augmente la quantité de transcrits codant pour CCR2 par les monocytes et diminue par les macrophages.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont mis en présence ou non de 10 μM d'Ado/EHNA pendant 24 heures. Des monocytes de la lignée THP-1 sont prétraités ou non avec 10 μM d'Ado/EHNA 24 heures avant leurs 48 heures de différenciation en macrophages (PMA 150 nM). La quantité d'ARNm codant pour le récepteur CCR2 est mesurée par qPCR. Le traitement Ado/EHNA augmente la quantité de transcrits codant pour le récepteur CCR2 par les monocytes, alors qu'il la diminue par les macrophages. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD ($n = 5$). * $p < 0,05$ versus sans Ado/EHNA.*

Nous avons poursuivi nos études en mesurant par cytométrie en flux l'expression membranaire de la protéine CCR2 sur des monocytes primaires humains purifiés à partir de sang total et différenciés en macrophages après un traitement par 50 ng/ml de M-CSF pendant 7 jours. Puis les macrophages sont traités pendant 6 heures avec 10 μ M d'Ado/EHNA.

Le traitement Ado/EHNA entraîne une diminution de la population exprimant le CCR2 de 60 % à 6 % et de l'intensité moyenne de fluorescence du marquage CCR2 qui passe de 800 à 500 (**Figure 42**).

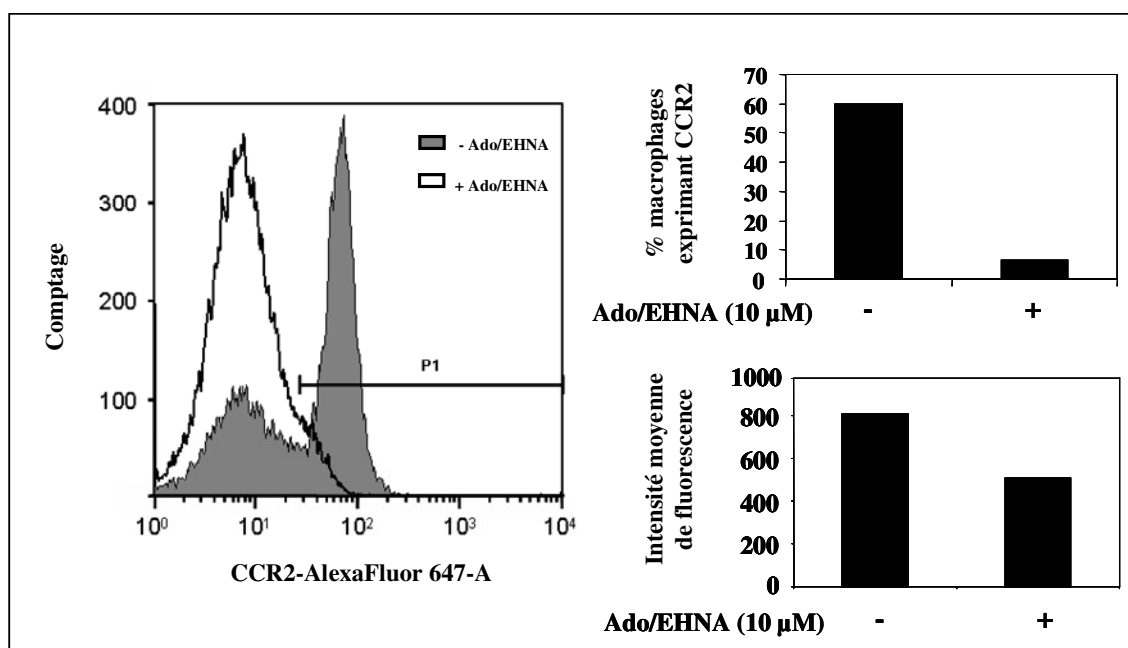


Figure 42 : L'adénosine diminue l'expression membranaire de CCR2 par les macrophages primaires humains.

Des monocytes primaires humains purifiés à partir de sang total sont différenciés en macrophages, puis mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 6 heures. L'expression des récepteurs membranaires CCR2 est mesurée par cytométrie en flux. Le traitement Ado/EHNA diminue l'expression membranaire du récepteur CCR2 par les monocytes primaires humains différenciés en macrophages. P1 représente la population de

cellules marquées positivement pour CCR2. Expérience représentative de trois manipulations indépendantes.

Nos résultats suggèrent la présence d'une amélioration de la capacité chimiotactique des monocytes grâce à un traitement à l'adénosine par augmentation du transcrit codant pour CCR2. En revanche, l'adénosine semble diminuer les propriétés de chimiotactisme des macrophages en engendrant une diminution importante de l'expression du CCR2, tant au niveau du transcrit que de la protéine.

1.2 Effet de l'adénosine sur la migration des monocytes

Nous avons utilisé le principe de la chambre de Boyden pour étudier l'effet de l'adénosine sur la migration des monocytes THP-1 à travers une membrane recouverte de gélatine B (substrat principal de la MMP-9) et suivant un gradient de MCP-1.

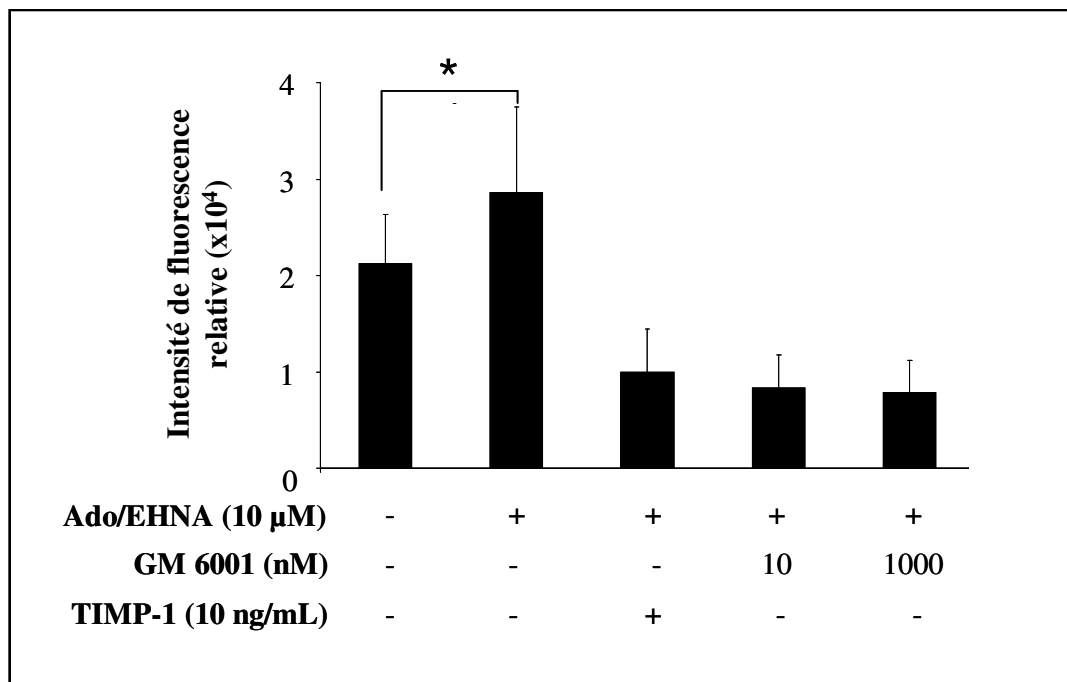


Figure 43 : L'adénosine augmente la capacité migratoire des monocytes THP-1.

*Des monocytes de la lignée THP-1 sont mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 24 heures, puis incubés pendant 30 minutes avec ou sans inhibiteurs de MMPs GM6001 (10 ou 1000 nM) ou TIMP-1 (10 ng/ml). La migration cellulaire est évaluée par une analyse de fluorescence. Le traitement Ado/EHNA favorise la migration cellulaire des monocytes THP-1 à travers la membrane et son action est inhibée par l'utilisation d'inhibiteurs de MMPs. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n = 5). * p < 0,05 versus contrôle.*

Les monocytes THP-1 sont traités pendant 24 heures avec ou sans 10 μ M d'Ado/EHNA, puis incubés pendant 30 minutes avec des inhibiteurs de MMPs avant d'être transférés dans une chambre de Boyden constitués d'une membrane recouverte de gélatine. Ces inhibiteurs sont le TIMP-1 (10 ng/ml), considéré comme l'inhibiteur endogène principal de la MMP-9, et le GM 6001 (10 et 1000 nM), qui est un inhibiteur de synthèse non spécifique des MMPs. Les cellules sont déposées au-dessus de la membrane, la MCP-1 est

placée dans le compartiment inférieur de la chambre, et la migration des cellules à travers la membrane est évaluée par la mesure de la fluorescence issue des cellules qui ont traversé la membrane et qui ont été colorées par un marqueur fluorescent.

Nous observons que l'adénosine favorise la migration des monocytes THP-1, et que l'utilisation d'inhibiteurs de MMPs, aussi bien le TIMP-1 que le GM 6001, réduit considérablement cette migration (**Figure 43**).

1.3 Conclusion

Ces résultats montrent que l'adénosine améliore la capacité migratoire des monocytes et suggèrent que cet effet est lié à une augmentation de l'activité de la MMP-9.

2 Effet de l'adénosine sur l'apoptose des monocytes primaires humains : études préliminaires

Nos travaux de fin de thèse se sont axés sur la mise au point de techniques utilisant les principes de la cytométrie en flux permettant la détection du phénomène d'apoptose de monocytes primaires humains. L'apoptose est induite par une privation de sérum dans le milieu de culture, une méthode permettant de mimer les conditions d'ischémie.

2.1 Marquage annexine V – iodure de propidium

En nous basant sur les données de la littérature⁵²⁰, nous avons mis en culture des monocytes primaires humains, purifiés à partir de sang total, prétraités avec ou sans 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 4 heures dans un milieu de culture sans sérum.

Nous avons effectué un marquage annexine V – iodure de propidium (PI) sur ces cellules afin de déterminer le pourcentage de cellules en nécrose et en apoptose suite à la privation en sérum.

Lors de l'apoptose, les phosphatidylsérines sont exposées à la surface membranaire sans rupture de la membrane plasmique. Leur externalisation est détectée par un marquage des cellules à l'annexine V qui les lie spécifiquement. L'annexine V, couplée à une sonde fluorescente, permet la détection des cellules apoptotiques par cytométrie en flux. Ce marquage est couplé au PI. Le PI est un agent fluorescent qui pénètre par les membranes cellulaires, devenues poreuses, des cellules nécrotiques et se fixe sur leur ADN. Ce double marquage permet ainsi de différencier les deux types de morts cellulaires : la nécrose et l'apoptose. En effet, la nécrose étant un événement très présent dans le cœur au cours de l'infarctus et du post-infarctus, il faut le distinguer de l'apoptose, afin d'être sûr que nos traitements induisent le phénomène de mort souhaité.

Les cellules marquées annexine V positives - PI négatives sont considérées comme étant en apoptose (**Figure 44**, fenêtre A) et celles annexine V négatives - PI positives en nécrose (**Figure 44**, fenêtre D). Le marquage intermédiaire annexine V positif - PI positif caractérise les cellules en apoptose tardive (**Figure 44**, fenêtre B). Les cellules saines sont marquées annexine V négatives - PI négatives (**Figure 44**, fenêtre C).

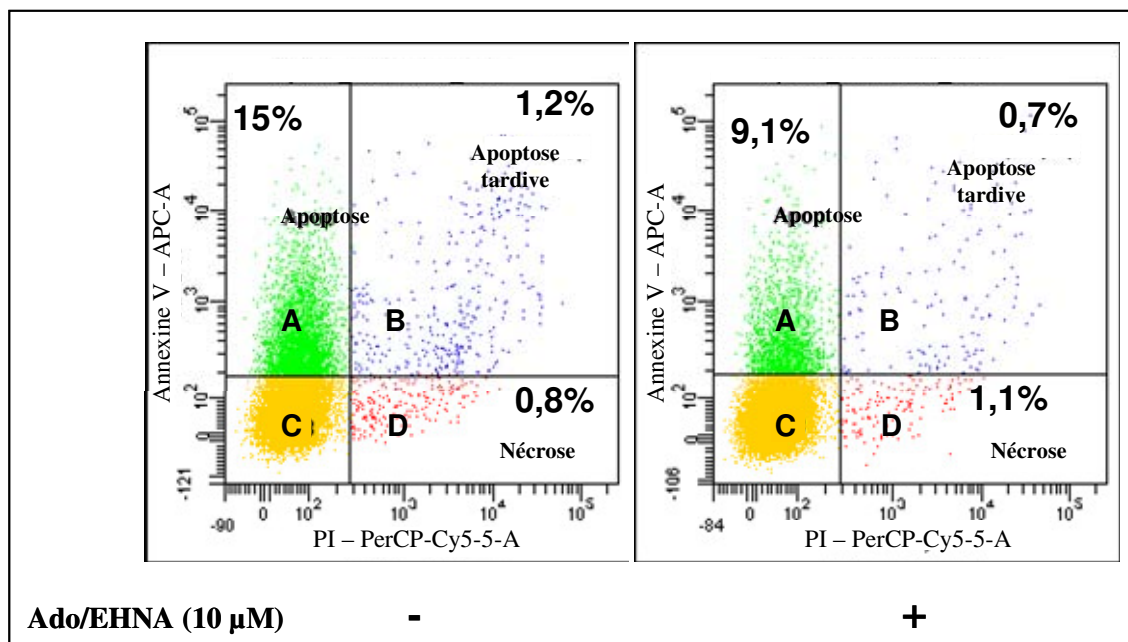


Figure 44 : L'adénosine diminue le phénomène d'apoptose sur les monocytes primaires.

Des monocytes primaires humains purifiés à partir de sang total sont privés de sérum puis mis en présence ou non de 10 μM d'Ado/EHNA pendant 4 heures. L'apoptose est évaluée par la mesure de l'externalisation des phosphatidylsérines membranaires par cytométrie en flux. L'adénosine diminue le phénomène d'apoptose sur les monocytes primaires humains privés de sérum pendant 4 heures. La portion A représente les cellules marquées annexine V positives - PI négatives en apoptose, la portion B celles annexine V positives - PI positives en apoptose tardive, la portion C les cellules vivantes non marquées et la portion D les cellules annexine V négatives - PI positives en nécrose. Expérience représentative d'une manipulation.

15 % des monocytes primaires humains privés de sérum pendant 4 heures sont en cours d'apoptose. Ce pourcentage diminue de plus de 5 % suite à un traitement Ado/EHNA (**Figure 44**, fenêtre A). Les pourcentages des cellules en apoptose tardive ou en nécrose ne semblent pas modifiés par l'adénosine (**Figure 44**, fenêtres B et D).

L'adénosine semble donc limiter l'entrée en apoptose des monocytes primaires humains privés de sérum pendant 4 heures.

2.2 Détection de la phase sub-G1 du cycle cellulaire

Un marquage au PI après fixation en cytométrie en flux permet une étude du cycle cellulaire des monocytes/macrophages primaires par mesure de l'ADN total des cellules. Lors d'une apoptose avancée, l'ADN se fragmente et un pic ou un épaulement précédant le pic de la phase G1 apparaît : c'est la phase sub-G1 caractéristique des dommages causés sur l'ADN cellulaire.

Nous avons effectué un marquage au PI sur des monocytes primaires humains, purifiés à partir du sang total, dans un milieu de culture privé de sérum avec ou sans 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 24 heures.

Nous avons obtenu un pic caractéristique de la phase G1 et une absence de phase G2, pour toutes nos conditions. Pour le traitement pro-apoptotique avec privation en sérum 24 heures, un pic caractéristique de la phase sub-G1 est observé. Suite à l'ajout de 10 μ M d'Ado/EHNA, ce pic a tendance à disparaître et ne former plus qu'un léger épaulement (**Figure 45**).

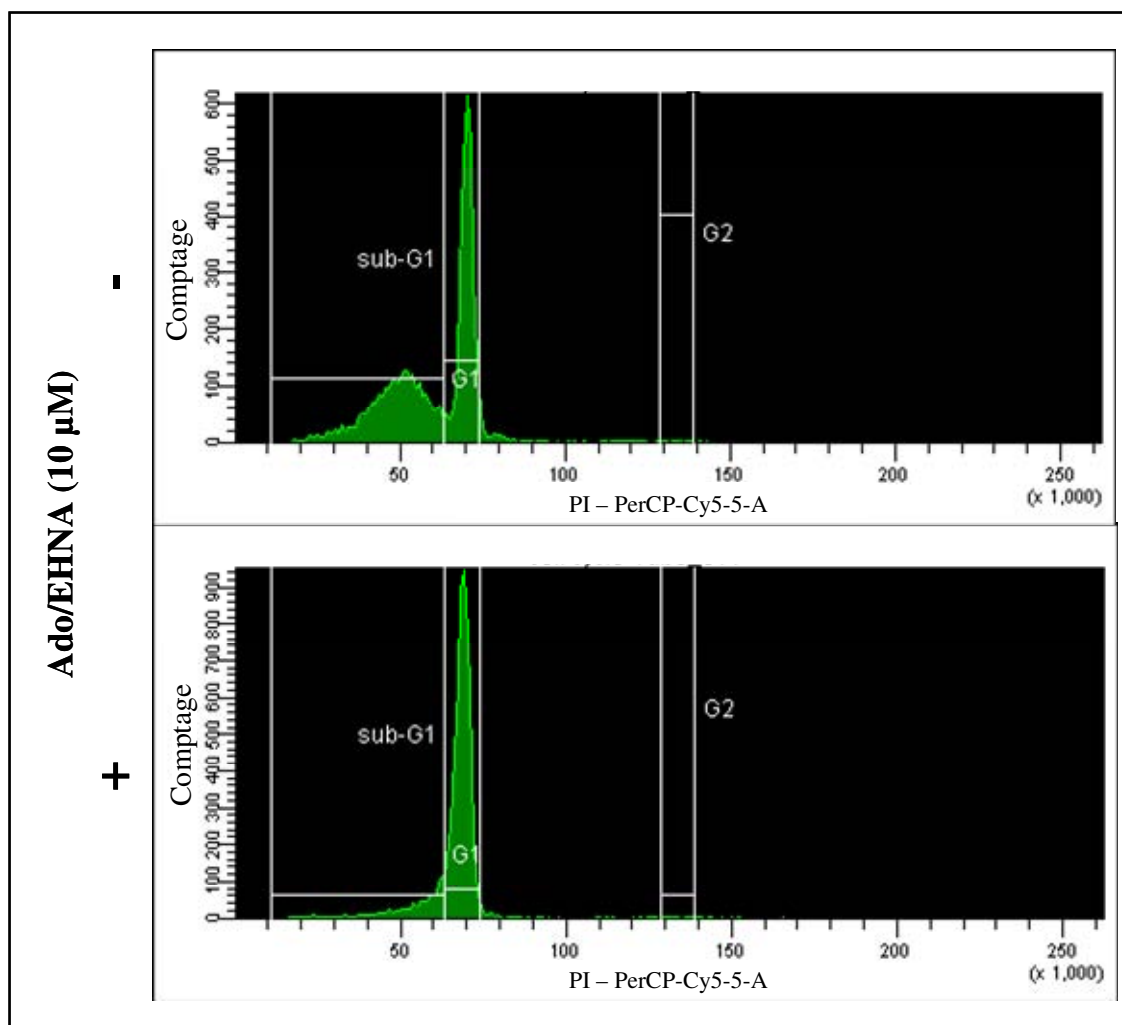


Figure 45 : L'adénosine empêche l'apparition du pic sub-G1 chez les monocytes primaires.

Des monocytes primaires humains purifiés à partir de sang total sont privés de sérum puis mis en présence ou non de 10 μ M d'Ado/EHNA pendant 24 heures. Le cycle cellulaire est évalué par cytométrie en flux après marquage des cellules par le PI. L'adénosine prévient l'apparition du pic sub-G1 caractéristique de l'apoptose sur les monocytes primaires humains privés de sérum pendant 24 heures. G1, G2 et sub-G1 représentent respectivement les phases G1, G2 et sub-G1 du cycle cellulaire. Expérience représentative d'une manipulation.

2.3 Conclusion

Des expériences préliminaires ont permis de penser que l'adénosine pourrait avoir un rôle dans la régulation de l'apoptose des monocytes primaires humains. En effet, l'adénosine réduit la proportion de cellules en apoptose ou présentant un ADN endommagé suite à une privation de sérum.

DISCUSSION

Un remodelage *maladaptif* du ventricule gauche est une des causes principales du développement d'une IC après un IM. Il est lié en partie à l'activité de la MMP-9. Bien que les propriétés cardioprotectrices de l'adénosine soient connues, son rôle dans le remodelage ventriculaire est encore mal défini. Nous avons émis l'hypothèse que l'adénosine pourrait moduler la production de la MMP-9. Suite à un infarctus, deux vagues de cellules inflammatoires s'infiltrèrent séquentiellement dans le cœur : les neutrophiles puis les monocytes/macrophages. En utilisant des neutrophiles isolés à partir du sang de volontaires sains, nous avons montré dans un premier temps que l'adénosine inhibe la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles activés. Cet effet passant par l'activation du récepteur à l'adénosine A2a implique une voie de signalisation intracellulaire faisant intervenir le cAMP, la PKA et la mobilisation du calcium. Dans un second temps, nous avons utilisé des monocytes primaires humains que nous avons différenciés en macrophages *in vitro*. Contrairement aux résultats obtenus avec les neutrophiles, nous avons montré que l'adénosine augmente la sécrétion de MMP-9 par les macrophages. Cette augmentation semble être véhiculée par le récepteur à l'adénosine A3. Nous avons également montré que l'adénosine améliore la capacité migratoire des monocytes et que cet effet semble provenir de la stimulation de l'activité MMP-9. Enfin, des expériences préliminaires semblent indiquer que l'adénosine aurait un effet anti-apoptotique sur les monocytes primaires humains. Ces travaux ont contribué à la caractérisation des effets de l'adénosine sur certains processus clefs du remodelage ventriculaire gauche, notamment la dégradation de la matrice extracellulaire et l'apoptose des cellules inflammatoires. Ils mettent en exergue la notion de fenêtre thérapeutique temporelle et pourraient avoir d'importantes implications lors de stratégies thérapeutiques utilisant l'adénosine et/ou ses récepteurs pour le traitement de l'IM et la prévention de l'IC.

EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LES NEUTROPHILES STIMULES

Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules de l'immunité recrutées dans la zone lésée après infarctus du myocarde, où elles libèrent par dégranulation divers médiateurs et enzymes, dont la MMP-9. L'activité incontrôlée de cette enzyme peut contribuer à une dégradation excessive de la matrice extracellulaire cardiaque et un remodelage myocardique inadapté. Nous avons montré dans un premier temps que l'adénosine diminue la production de MMP-9 par les neutrophiles primaires humains activés par la fMLP. L'activation des neutrophiles se fait dans un laps de temps très court (15 minutes de stimulation par la fMLP), lors duquel aucune synthèse de protéine *de novo* n'est donc

possible. Ceci implique que la production de MMP-9 par les neutrophiles activés est liée à un phénomène de dégranulation qui consiste en un relargage massif et rapide de grandes quantités d'enzymes stockées dans les granules.

Une double approche, à la fois pharmacologique (emploi d'agonistes et d'antagonistes spécifiques de l'adénosine) et moléculaire (utilisation de siARNs ciblant les récepteurs à l'adénosine), indique que l'inhibition de la sécrétion de MMP-9 par l'adénosine est véhiculée par le récepteur à l'adénosine A2a *via* la voie de signalisation cAMP/PKA/Ca²⁺ des neutrophiles activés. Les cascades de réactions qui en découlent ralentissent la dégranulation des neutrophiles *via* le récepteur A2a, ce qui limite ainsi un relargage en masse des MMPs dans le milieu extracellulaire.

D'autre part, l'utilisation d'IB-MECA, un agoniste du récepteur A3, semble également provoquer cette inhibition, une participation du récepteur A3 ne pouvant donc être exclue. Cependant, la spécificité de l'IB-MECA pour le récepteur A3 peut s'avérer ne pas être aussi exclusive que prévue. En effet, de récentes données suggèrent que l'IB-MECA peut aussi se fixer sur le récepteur A2a⁵²⁸, ce qui pourrait expliquer l'effet inhibiteur obtenu dans nos expériences lors de son utilisation.

Nos expériences effectuées par une approche moléculaire permettent néanmoins de confirmer l'implication du récepteur A2a au détriment du récepteur A3, puisque seul l'emploi du siARN A2a inhibe l'effet de l'adénosine, contrairement au siARN dirigé contre le récepteur A3.

Les résultats de notre étude sur les neutrophiles sont en accord avec ceux de la littérature montrant que le récepteur A2a participe à la suppression de la dégranulation et du processus proinflammatoire par les neutrophiles primaires humains activés^{529, 530}.

EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LES MACROPHAGES

Les monocytes représentent la deuxième vague cellulaire à coloniser la zone infarctée. Ils se différencient en macrophages lors de leur infiltration tissulaire et c'est sous cette forme qu'ils produisent de grandes quantités de MMPs.

L'approche utilisée dans l'étude des effets de l'adénosine sur les neutrophiles a aussi été employée sur des macrophages issus de la lignée promonocytaire THP-1 et des monocytes primaires humains différenciés en macrophages, et se révèle tout autre. En effet, l'adénosine entraîne une augmentation de la production de MMP-9 par les macrophages, avec un effet

identique sur les macrophages issus de THP-1, de volontaires sains ou de patients atteints d'un infarctus du myocarde. Cette augmentation est due à la fois à l'action de l'adénosine exogène et de l'adénosine endogène. L'adénosine entraîne une augmentation de la sécrétion de la protéine MMP-9, régulée *via* un mécanisme transcriptionnel, avec accroissement du nombre de copies d'ARNm codant pour la MMP-9 et un intervalle de temps nécessaire à la synthèse de protéine *de novo*. L'augmentation de la transcription de MMP-9 n'est pas immédiate et nécessite près de 6 heures avant l'observation d'une augmentation remarquable du transcrit et 18 heures pour la protéine, contrairement au processus de dégranulation des neutrophiles qui donne lieu à un relargage rapide et élevé des protéines MMP-9. De plus, l'augmentation de la sécrétion de MMP-9 due à l'adénosine passe par l'activation du récepteur à l'adénosine A3. L'utilisation d'un agoniste du récepteur A3 (IB-MECA) entraîne aussi une augmentation de la production de MMP-9, contrairement aux agonistes spécifiques des autres récepteurs. Les expériences effectuées par une approche moléculaire permettent de confirmer l'implication du récepteur A3, car seul l'emploi du siARN A3 inhibe l'effet de l'adénosine, contrairement aux siARNs A2a et A2b.

Nos résultats corroborent de récentes études montrant des effets variables de l'adénosine sur la production de MMP-9 en fonction du type cellulaire et du récepteur à l'adénosine impliqué. Ainsi, l'hypoxie inhibe l'expression de la MMP-9 dans les monocytes différenciés en cellules dendritiques *via* le récepteur A2b⁵³¹. Cependant, que ce soit pour les neutrophiles ou les macrophages, l'activité des autres récepteurs à l'adénosine associée à la production de MMP-9 suite à un traitement par l'adénosine ne peut être formellement exclue. En effet, les différences de puissance et de spécificité des ligands de ces récepteurs associées aux potentiels phénomènes de compensation et de désensibilisation peuvent influencer sur l'activité des récepteurs à l'adénosine et jouer un rôle dans la durabilité, l'intensité et la qualité de leur signal^{340, 424, 435}. Par exemple, l'internalisation du récepteur à l'adénosine A3 provoquée par un agoniste n'inhibe pas la transduction du signal et n'induit pas de désensibilisation. Par ailleurs, la séquestration du récepteur favorise son recyclage vers la membrane cellulaire et donc la restitution de la sensibilité⁵³².

Nous avons aussi observé une régulation différentielle des divers récepteurs à l'adénosine par l'adénosine elle-même, ce qui suggère que l'expression et l'activation de l'un ou l'autre des récepteurs à l'adénosine est finement régulée. Ces observations peuvent avoir une grande incidence sur la mise au point de nouvelles thérapies utilisant des molécules analogues à l'adénosine dans le traitement de l'infarctus du myocarde ou de l'insuffisance cardiaque.

EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LES MACROPHAGES STIMULES

Nous avons aussi mis en évidence une augmentation de la production de MMP-9 par un traitement à l'adénosine dans des macrophages activés. Les macrophages stimulés par le LPS sécrètent une forte quantité de MMP-9 et cet effet est amplifié par l'ajout d'adénosine. Ceci suggère une implication de l'adénosine dans le priming des monocytes-macrophages, qui favorise ainsi leur réponse à un stimulus comme le LPS. Afin d'expliquer ce phénomène, nous avons émis l'hypothèse que l'adénosine pourrait moduler certains éléments du système de reconnaissance du LPS. Les résultats obtenus sur des macrophages stimulés par le LPS montrent que l'adénosine induit une augmentation de l'expression de l'ARNm codant pour la protéine accessoire MD-2 et pour le récepteur CD14. Cependant, ce mécanisme de priming semble différent de celui induit par un stress oxydant sur des macrophages stimulés, entraînant un accroissement du recrutement à la surface cellulaire du récepteur TLR4 par exocytose⁵²⁷.

Malgré l'absence de variation de l'expression de TLR4, tant au niveau du transcrite que de la protéine par les macrophages THP-1 prétraités à l'adénosine et stimulés au LPS, il ne faut pas négliger les voies d'activation potentielles de ce récepteur. En effet, l'activation du récepteur TLR4 est décrite comme médiatrice de l'apparition d'un remodelage maladadaptatif après infarctus³³². De plus, bien que le ligand prototype de l'activation du TLR4 soit le LPS, lui ou ses dérivés de type lipide A, tels que le DLA ou le MLA, ont peu de probabilité de se trouver dans le myocarde après infarctus, car ils impliquent une infection. La stimulation du récepteur TLR4 post-IM s'effectue donc grâce à d'autres types de ligands. Les ligands endogènes potentiellement présents dans le cœur, pendant et après l'infarctus, sont induits par une réponse inflammatoire dans les tissus. Ils sont des composants de dégradation de la matrice extracellulaire ou des cytokines proinflammatoires, comme l'HA^{287, 336}, les HS³³⁷ et l'IL-1 β ³²⁸.

Parmi ces ligands, nous nous sommes intéressés à l'HA, qui induit des lésions rénales suite à une ischémie-reperfusion^{287, 336} et aux HS, qui sont impliqués dans le maintien de la barrière endothéliale (Brunn, Bungum et al. 2005). Nos résultats montrent une augmentation de la sécrétion de la MMP-9 par les macrophages stimulés avec de l'HA, alors que l'HS n'entraîne pas de variation de la production de MMP-9. Ceci témoigne de la variabilité d'effet de l'activation du TLR4 sur la production de MMP-9 en fonction du ligand endogène du TLR4 employé. Ainsi, les ligands de type HS pourraient limiter l'activation de la voie du

TLR4 et en conséquence prévenir un remodelage délétère ²⁹⁴. Cependant ceci n'exclut pas l'influence des HS dans l'initiation de la réponse immunitaire *via* TLR4. Parallèlement, d'autres types de stimulations, comme des conditions hypoxiques, augmentent également la production de MMP-9 par les THP-1 macrophages. Les niveaux de MMP-9 obtenus par traitements à l'HA ou en conditions hypoxiques sont du même ordre que ceux obtenus avec LPS. Toutefois un stimulus par la fMLP est inefficace.

Nos résultats montrent que la sécrétion de MMP-9 par les macrophages stimulés varie selon le type de stimulus utilisé. En revanche, quelque soit le type de stimulation, l'adénosine couplée à un stimulus induit une augmentation supplémentaire de la production de MMP-9 comparée au stimulus seul par les THP-1 différenciés en macrophages. Si le ligand est sans effet, son association avec l'adénosine entraîne une production de MMP-9 du même ordre qu'un traitement par l'adénosine seule. Si le ligand induit une production de MMP-9 supérieure au niveau basal, alors son couplage avec l'adénosine provoque une production accrue de MMP-9. L'effet dû à l'adénosine est toujours présent et il est additionnel à celui du ligand.

EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LA MIGRATION DES MONOCYTES-MACROPHAGES

La migration cellulaire et le chimiotactisme sont deux procédés distincts mais nécessaires à l'infiltration monocyttaire dans la zone infarctée. Les récepteurs membranaires aux chimiokines CCR2 présents à la surface des monocytes-macrophages se lient à la protéine chimioattractante MCP-1 sécrétée par les cellules présentes dans le tissu myocardique infarcté (cardiomyocytes, cellules endothéliales, fibroblastes...) en gradient croissant jusqu'à la zone lésée. Le rôle de cette protéine dans le remodelage ventriculaire gauche est controversé dans les modèles murins. En effet, il paraît être délétère, puisque l'inactivation de MCP-1 par thérapie génique dans un modèle murin d'infarctus par ligature coronaire réduit le développement d'un remodelage maladaptatif et d'une insuffisance cardiaque ⁵³³. Cependant, il semble également bénéfique, puisque la surexpression de MCP-1 dans le tissu cardiaque chez la souris transgénique prévient l'apparition de dysfonctions cardiaques et du remodelage après infarctus ³¹⁶. Il a aussi été démontré que MCP-1 peut promouvoir la résolution de la phase inflammatoire tout en favorisant le processus du remodelage myocardique ³¹⁵.

Conjointement à MCP-1, l'expression des récepteurs membranaires des monocytes semble également impliquée dans le remodelage myocardique. En effet, deux types de phénotypes monocytaires sont mis en exergue lors de la période post-infarctus. Le premier est qualifié de classique et représente près de 95 % des monocytes chez un individu sain. Les monocytes présentent un phénotype « CD14⁺ CD16⁻ », où CD14 appartient au système de reconnaissance du LPS et CD16 est un récepteur pour le domaine Fc des immunoglobulines IgGs (FCγRIII). Le second est qualifié de non-classique avec un phénotype « CD14^{faible} CD16⁺ ». De plus, ces deux populations monocytaires diffèrent au niveau de l'expression de leurs récepteurs aux chimiokines. Les monocytes classiques sont « CCR2⁺ CX3CR1^{faible} », où CX3CR1 est le récepteur à la fractalkine impliqué dans l'adhésion cellulaire et la formation de la plaque d'athérosclérose, alors que les monocytes non-classiques sont « CCR2⁻ CX3CR1^{élevé} ». Ces deux phénotypes monocytaires ont aussi été mis en évidence dans les modèles murins ⁵³⁴.

Une étude réalisée sur un modèle de ligature coronaire chez la souris montre que le tissu myocardique est infiltré séquentiellement par deux populations monocytaires après infarctus. Dans sa période de cicatrisation, les monocytes recrutés pendant la phase précoce post-IM sont plus mobiles et favorisent la dégradation tissulaire. Ils sont « CCR2⁺ CX3CR1^{faible} », ce qui correspond à un phénotype proinflammatoire avec augmentation des fonctions phagocytiques, protéolytiques et inflammatoires. En revanche, les monocytes impliqués durant la phase de remodelage sont « CCR2⁻ CX3CR1^{élevé} ». Ils participent à la résolution de l'inflammation et présentent un phénotype favorisant la réparation tissulaire, grâce à la synthèse de facteurs proangiogéniques comme le VEGF et à la déposition de collagènes nécessaires à la formation du tissu de granulation autorisant l'élaboration du tissu cicatriciel ³¹⁴.

Nos résultats montrent un effet opposé de l'adénosine sur l'expression de CCR2 par les monocytes et les macrophages. En effet, l'adénosine améliore les capacités à la fois chimiotactique et migratoire des monocytes, probablement suite à une augmentation de l'expression de CCR2 et une activation de la MMP-9. Toutefois, elle diminue la potentialité chimiotactique des macrophages et favorise la perte de leur phénotype inflammatoire en diminuant l'expression de CCR2. Bien que l'adénosine soit connue pour ses propriétés anti-inflammatoires ⁴⁵⁶, elle peut aussi prévenir la différenciation des monocytes en macrophages ⁵³⁵, ce qui peut interférer avec la résolution de l'inflammation en particulier dans des maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme ⁵³⁶. Nos résultats suggèrent une utilisation ciblée de l'adénosine en fonction du type cellulaire et impliquent une notion de fenêtre

temporelle afin de savoir à quel moment ajouter l'adénosine pour que le traitement puisse favoriser la résolution de l'inflammation et une réparation tissulaire optimale.

EFFET DE L'ADÉNOSINE : LES RECEPTEURS IMPLIQUES

L'adénosine comme cible thérapeutique potentielle a été testée dans des essais cliniques de traitements post-IM. L'adénosine améliore la fonction cardiaque des patients atteints d'infarctus du myocarde lorsqu'elle est combinée à la lidocaïne⁵³⁷ ou à une angioplastie^{402, 538}. L'effet de l'adénosine est bénéfique dans ces études, toutefois le nombre de patients traités est faible et ne permet pas d'établir des conclusions statistiquement fiables. En revanche, les études AMISTAD I et II, qui impliquent une plus grande population, montrent une diminution de la taille de la zone infarctée chez les patients traités après infarctus, où l'adénosine est associée à une thrombolyse ou une angioplastie^{403, 404}, ainsi qu'une diminution de la mortalité si l'adénosine est administrée sous trois heures post-IM⁴⁰⁵. L'efficacité réelle de l'adénosine sur la réduction des dommages dus à l'ischémie-reperfusion semble liée à ses récepteurs^{399, 400}. Une étude récente montre un lien entre le polymorphisme des séquences des récepteurs A1 et A3 avec la taille de la zone infarctée chez des patients souffrant d'une cardiomyopathie ischémique⁵³⁹ ? Néanmoins, de plus amples investigations devront être menées pour déterminer l'incidence de ces mutations sur les effets d'un traitement par l'adénosine dans le cadre de l'infarctus du myocarde.

L'utilisation de l'adénosine et de ses analogues à usage thérapeutique a déjà été étudiée dans des modèles animaux et dans des essais cliniques. Chaque sous-type de récepteurs à l'adénosine contribue à une réponse physiologique en fonction des dommages dus à l'ischémie-reperfusion. Les propriétés cardioprotectrices de l'adénosine sont mises en évidence dans trois cas de figure : en prétraitement avant une ischémie, pendant l'ischémie ou pendant la reperfusion. Les mécanismes de cardioprotection de l'adénosine semblent passer par : (1) le récepteur à l'adénosine A1 durant un prétraitement avant ischémie *via* une activation des canaux K⁺/ATP ; (2) les récepteurs A2 pendant la reperfusion en inhibant l'interaction neutrophiles-endothélium et limitant ainsi le phénomène d'inflammation, plus particulièrement le récepteur A2a, qui favorise le conditionnement post-ischémique et l'angiogénèse menant à un remodelage myocardique bénéfique ; (3) et le récepteur A3 répondant positivement aux deux types de conditionnements pré- et post-ischémiques¹⁵.

Nos résultats concernant les neutrophiles activés suggèrent que, dans des conditions post-IM, la protection due à l'adénosine passe par le récepteur A2a en inhibant la sécrétion massive de MMP-9 et en prévenant ainsi un remodelage délétère. De plus, ces résultats sont en accord avec ceux montrant que le récepteur A2a participe à la suppression de la dégranulation et du processus proinflammatoire par les neutrophiles activés^{529, 530}. De plus, un traitement par l'adénosine réduit la taille de l'infarctus et améliore la fonction ventriculaire en inhibant l'activation des neutrophiles, prévenant ainsi la formation de lésions endothéliales³⁹⁹. La plupart des études montrent un rôle du récepteur A3 dans la cardioprotection avant et après ischémie^{409, 540}, les effets protecteurs de ce récepteur semblent cependant être dose-dépendants. Ainsi, chez la souris transgénique surexprimant le récepteur A3 dans le cœur, une surexpression moyenne du récepteur protège partiellement contre les dommages dus à l'ischémie, alors qu'une forte surexpression provoque le développement d'une dilatation cardiaque⁴⁹⁵. Nos résultats suggèrent que cette différence d'effets est due à l'augmentation de la production de MMP-9 par les macrophages après activation du récepteur A3. D'après nos résultats, les effets de l'adénosine semblent bénéfiques sur les neutrophiles dans la phase précoce post-IM, en revanche ils seraient contrebalancés par l'activation de la production de MMP-9 et la migration des macrophages dans la phase tardive. Nos résultats renforcent la notion de fenêtre thérapeutique et temporelle avec modulation des récepteurs à l'adénosine et régulation de la synthèse de MMP-9, dans la phase inflammatoire immédiatement après infarctus, ou dans la phase ultérieure de remodelage.

EFFETS DE L'ADENOSINE SUR L'APOPTOSE MONOCYTAIRE

La reperfusion après une ischémie peut induire une augmentation des dommages myocardiques⁶¹. L'adénosine peut réduire ces dommages en prévenant la nécrose et l'apoptose des cardiomyocytes⁴⁰¹. Les cellules nécrosées après infarctus du myocarde sont éliminées par phagocytose des cellules immunitaires telles que les macrophages appartenant au tissu de granulation formé pendant la phase de remodelage précoce¹⁶. La résolution du phénomène inflammatoire après la phase aiguë de l'infarctus est ensuite permise par l'apoptose des cellules immunitaires¹⁷. De récentes études montrent que l'inhibition de l'apoptose du tissu de granulation, ou des cardiomyocytes permettrait une amélioration du remodelage ventriculaire gauche post-IM¹⁸⁻²⁰.

L'utilisation de l'adénosine dans la prévention de l'apoptose est une piste possible, cependant, elle reste à nuancer. Bien que l'adénosine puisse inhiber l'apoptose des neutrophiles induite suite à au processus d'ischémie-reperfusion myocardique par l'activation de son récepteur A2a chez le chien ^{454, 455}, l'activation de son récepteur A3 serait délétère et provoquerait l'apoptose des cardiomyocytes chez le rat conduisant ainsi à endommager le tissu cardiaque ^{498, 499}. En revanche, de façon surprenante, un traitement chez le chat par des agonistes du récepteur A3 protège contre l'apoptose et les dommages des tissus pulmonaires après reperfusion ⁵¹². De même, la stimulation du récepteur A3 demeure paradoxale dans les lignées cellulaires cancéreuses car elle induit ou atténue le phénomène d'apoptose ^{372, 373, 516}. Un traitement par l'adénosine ou un de ses analogues afin d'inhiber l'apoptose du tissu de granulation est donc à prendre avec précaution dans la prévention du remodelage myocardique, selon le récepteur activé. Une récente étude a mis en évidence un nouveau mécanisme de sécrétion de molécules adaptatrices impliqué dans la médiation du signal apoptotique. Le lien entre l'activation des récepteurs à l'adénosine et la sécrétion de ces molécules adaptatrices suggère la mise en place d'un mécanisme anti-apoptotique en cas de stress cellulaire tel qu'une hypoxie ⁵⁴¹.

D'après nos résultats préliminaires, l'adénosine semble limiter le phénomène d'apoptose sur les monocytes placés dans des conditions mimant l'ischémie. Si ces résultats sont confirmés, l'emploi de l'adénosine afin de prévenir l'apoptose du tissu de granulation est à envisager dans un traitement post-IM dans le but d'améliorer le remodelage myocardique. De plus, l'étude approfondie de ces mécanismes permettra de déterminer si l'apoptose est induite par la voie extrinsèque ou la voie intrinsèque au niveau des monocytes ¹⁷ et d'identifier le ou les modes d'action anti-apoptotiques observés avec l'adénosine dans notre type cellulaire.

EFFETS DE L'ADENOSINE SUR LES PATIENTS : MMP-9 ET NOTION DE FENETRE THERAPEUTIQUE

Nous avons précédemment montré ⁸, ainsi que d'autres équipes ⁵⁻⁷, que la MMP-9 est un biomarqueur de l'insuffisance cardiaque après infarctus du myocarde. Les données présentées ici suggèrent que l'adénosine, qui est massivement relarguée dans le cœur en cas d'ischémie, est un puissant régulateur de la production de MMP-9, et ont été confirmées par les résultats obtenus à partir de l'extraction de cellules de sang total chez les patients atteints

d'infarctus du myocarde, dont le taux de MMP-9 est supérieur à celui des volontaires sains. Ces résultats suggèrent que les macrophages sont à l'origine de cette augmentation, car ils subissent un priming par l'adénosine relarguée pendant l'infarctus dans le cœur ischémique. Toutefois, le mécanisme de ce priming reste à déterminer.

Des études réalisées chez la souris déficiente en MMP-9 montrent une diminution de la dilatation du ventricule gauche post-IM ²⁶⁶. Cette protéine s'avère donc être une cible thérapeutique potentielle dans la prévention du remodelage ventriculaire gauche après infarctus. La MMP-9 fait partie des premières MMPs exprimées lors de la phase aiguë de l'infarctus. Néanmoins, son activité diminue pendant la phase de granulation, bien qu'elle reste élevée par rapport à son niveau basal d'expression ²⁶⁵. De faibles quantités de MMP-9 favorisent l'angiogenèse et préviennent le développement d'une insuffisance cardiaque ²⁶⁷, alors que de fortes doses à long terme sont susceptibles d'induire une dégradation excessive de la matrice extracellulaire et un remodelage délétère.

Il existe trois types d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques des MMPs : des inhibiteurs pseudopeptidiques, des inhibiteurs non peptidiques comme le PG-116800 ou des dérivés des tétracyclines ⁴. Leur portée étant effective sur plusieurs types de MMPs à la fois, ils ont été qualifiés d'inhibiteurs de MMPs à large spectre. Néanmoins ils peuvent devenir plus sélectifs en fonction des concentrations auxquelles ils sont utilisés, par exemple, le PG-116800 inhibe les MMPs-2,-8,-9, et -13 à une concentration d'environ 20 ng/ml et agit sur les MMPs-1 et -7 à des concentrations supérieures à 1 mg/ml ⁴. Un modèle d'IM de rat traité avant ou immédiatement post-IM par de la doxycycline permet de réduire le remodelage délétère du ventricule gauche, toutefois ce type d'administration ne peut s'appliquer en clinique ⁵⁴². De plus, dans les modèles animaux en général, les traitements avec utilisation d'inhibiteurs synthétiques de MMPs s'effectuent cinq jours après IM, en particulier pour ne pas inhiber les enzymes nécessaires au processus de cicatrisation. Post-IM, ils permettent d'atténuer la dilatation ventriculaire gauche, de diminuer la taille de la zone infarctée et d'améliorer la composition et la structure de la MEC myocardique ²⁶¹. L'inhibition de tout l'assortiment des MMPs n'est pas forcément nécessaire pour permettre de réduire le remodelage ventriculaire dans les modèles animaux avec inhibition sélective. Ainsi des études plus sélectives dans des modèles porcins utilisant le PG-116800 à des concentrations autorisant l'activité des MMPs-1 et -7 montrent également une réduction de la dilatation ventriculaire post-IM en limitant le remodelage ventriculaire gauche post-IM ⁵⁴³.

Les études précédentes montrent que la modulation de l'activité des MMPs peut être une cible thérapeutique potentielle dans l'amélioration du remodelage myocardique. Par

ailleurs, l'utilisation de l'inhibiteur PG-116800 dans des modèles animaux s'est révélée particulièrement efficace²⁶⁰. Toutefois, son utilisation chez des patients atteints d'infarctus du myocarde dans l'essai clinique PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) n'améliore pas le remodelage ventriculaire gauche ou le suivi clinique post-IM²⁶⁴. Cependant cet inhibiteur n'est pas spécifique, par exemple uniquement pour la MMP-9, et le traitement des patients effectué 48 +/- 24 heures après infarctus et pendant 90 jours n'est peut-être pas la fenêtre temporelle adéquate pour interrompre l'activité des MMPs dans un traitement post-IM²⁶³. De plus, l'inhibition prolongée des MMPs peut entraîner des effets délétères pouvant causer la mort de l'animal²⁶³.

Les études précédentes soulignent l'existence d'une fenêtre thérapeutique temporelle dans le traitement de l'IM par l'inhibition des MMPs. Elles suggèrent que l'inhibition non sélective des MMPs en phase précoce post-IM est délétère car elle empêche la formation de tissu cicatriciel. Toutefois, l'inhibition sélective de MMP-9 en empêchant son relargage par les neutrophiles permettrait de limiter la progression d'un remodelage myocardique inadapté. De plus, nos résultats démontrent que l'adénosine limite ce relargage. Ils suggèrent l'utilisation d'un traitement avec des agonistes du récepteur à l'adénosine A2a dans la phase précoce après IM pour bloquer la dégranulation des neutrophiles. En revanche, lors de la phase de tardive post-IM, l'inhibition non sélective des MMPs à long terme peut être préjudiciable. De même, la présence de MMP-9 à de faibles concentrations permet de favoriser l'angiogenèse. La production de MMP-9 par les monocytes-macrophages est modérée par rapport aux neutrophiles. Nos résultats sur patients montrant un priming de l'adénosine et ceux sur monocytes-macrophages suggèrent que l'utilisation d'agonistes du récepteur à l'adénosine A3 permettrait de maintenir cette production de MMP-9 est ainsi améliorer l'angiogenèse et obtenir un remodelage myocardique bénéfique après un infarctus.

En dépit des résultats satisfaisants sur les animaux dans la prévention du remodelage myocardique délétère, les inhibiteurs pharmacologiques des MMPs sont encore en cours d'évaluation chez l'Homme, non seulement à cause de leur manque de sélectivité, mais aussi à cause de la fenêtre temporelle du traitement. Nos résultats impliquent l'utilisation de l'adénosine ou ses analogues, en vue d'un éventuel traitement pour moduler l'activité de la MMP-9. Plus particulièrement son inhibition serait potentiellement bénéfique pendant la phase précoce de l'infarctus, alors que son maintien à des concentrations peu élevées pendant la phase tardive serait favorable.

CONCLUSIONS

-

PERSPECTIVES

La MMP-9 est un facteur de risque cardiovasculaire et un biomarqueur du remodelage du ventricule gauche. Elle fait donc partie des cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement de l'insuffisance cardiaque après un remodelage myocardique inadapté.

Notre étude sur les neutrophiles primaires humains montre que l'adénosine inhibe la sécrétion de MMP-9 *via* le récepteur à l'adénosine A2a par limitation immédiate du phénomène de dégranulation. En revanche, les résultats présentés dans ce rapport indiquent que l'adénosine augmente la production de MMP-9 dans les macrophages *via* le récepteur à l'adénosine A3, après un laps de temps requis pour une synthèse de protéines *de novo*. Ceci démontre les effets variés, voir antinomiques, de l'adénosine sur les cellules de l'inflammation et met en exergue la notion de fenêtre thérapeutique avec une utilisation ciblée de l'adénosine en fonction de la période post-infarctus. En effet, de récentes études rapportent un effet bénéfique de l'inhibition de la MMP-9 dans la phase précoce post-infarctus, mais pas pendant la phase de remodelage ²⁶³. Le recrutement des neutrophiles dans la zone infarctée (inférieur à deux jours) entraîne un relargage en masse de MMP-9, ce qui contribue à une dégradation excessive de la matrice extracellulaire cardiaque et un remodelage myocardique inadapté. Nos résultats impliquent une limitation de ce relargage par utilisation de l'adénosine. Les monocytes-macrophages investissent ensuite la région lésée seulement un à deux jours après infarctus. Nos résultats suggèrent que l'adénosine favorise leur infiltration tissulaire en augmentant leur production de MMP-9, ainsi que leur priming. De plus, la production de MMP-9 par les macrophages est modérée par rapport aux neutrophiles, ce qui favorise la néoangiogenèse ²⁶⁷. En vue d'un éventuel traitement avec de l'adénosine ou un de ses analogues, une activation du récepteur A2a (A2aAR) dans les neutrophiles serait nécessaire immédiatement après infarctus, suivie d'une activation de récepteur à l'adénosine A3 (A3AR) dans les macrophages, afin d'obtenir un remodelage myocardique bénéfique après un infarctus.

La suite de nos travaux sera axée sur l'identification de nouveaux gènes responsables des effets cardioprotecteurs de l'adénosine et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de l'insuffisance cardiaque par la technologie des puces à ADN. Cela nous permettra d'évaluer à plus grande échelle les cibles spécifiques du récepteur A3 pouvant jouer un rôle dans le remodelage ventriculaire du cœur après infarctus et d'identifier de nouveaux biomarqueurs des maladies cardiovasculaires.

L'adénosine a un effet cardioprotecteur, cependant peu d'études portent sur son effet dans la modulation de l'apoptose au cours du remodelage myocardique post-infarctus. Nous avons montré que l'adénosine était capable de s'opposer à l'apoptose induite par une privation en sérum. Nous tenterons, à l'aide de techniques mises au point au laboratoire, de mettre en évidence un effet de l'adénosine sur le processus pro-apoptotique dans les monocytes primaires et d'en élucider les mécanismes de contrôle (voie intrinsèque/voie extrinsèque).

Nos perspectives de travail à long terme sont de poursuivre nos investigations sur les effets de l'adénosine sur la fonction cardiaque par des études *in vivo*, ceci à l'aide du modèle d'infarctus du myocarde chez le rat ayant subi une ligature coronaire. Nous pourrions alors tester dans le contexte de remodelage myocardique : (1) notre hypothèse de fenêtre thérapeutique avec un traitement post-infarctus par des agonistes d'A_{2a}AR, puis des agonistes d'A₃AR ; (2) les effets de l'adénosine ou de ses analogues dans l'apoptose post-infarctus du tissu myocardique.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Cleutjens JP, Creemers EE. Integration of concepts: cardiac extracellular matrix remodeling after myocardial infarction. *J Card Fail* 2002, 8: S344-348
- 2 Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet* 2006, 367: 356-367
- 3 Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circulation research* 2001, 89: 201-210
- 4 Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: influence on cardiac form and function. *Physiol Rev* 2007, 87: 1285-1342
- 5 Sundstrom J, Evans JC, Benjamin EJ, Levy D, Larson MG, Sawyer DB, Siwik DA, *et al.* Relations of plasma matrix metalloproteinase-9 to clinical cardiovascular risk factors and echocardiographic left ventricular measures: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2004, 109: 2850-2856
- 6 Wilson EM, Gunasinghe HR, Coker ML, Sprunger P, Lee-Jackson D, Bozkurt B, Deswal A, *et al.* Plasma matrix metalloproteinase and inhibitor profiles in patients with heart failure. *J Card Fail* 2002, 8: 390-398
- 7 Yan AT, Yan RT, Spinale FG, Afzal R, Gunasinghe HR, Arnold M, Demers C, *et al.* Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure. *J Card Fail* 2006, 12: 514-519
- 8 Wagner DR, Delagardelle C, Ernens I, Rouy D, Vaillant M, Beissel J. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *J Card Fail* 2006, 12: 66-72
- 9 Auchampach JA, Bolli R. Adenosine receptor subtypes in the heart: therapeutic opportunities and challenges. *Am J Physiol* 1999, 276: H1113-1116
- 10 Germack R, Dickenson JM. Characterization of ERK1/2 signalling pathways induced by adenosine receptor subtypes in newborn rat cardiomyocytes. *Br J Pharmacol* 2004, 141: 329-339
- 11 Thiele A, Kronstein R, Wetzel A, Gerth A, Nieber K, Hauschildt S. Regulation of adenosine receptor subtypes during cultivation of human monocytes: role of receptors in preventing lipopolysaccharide-triggered respiratory burst. *Infect Immun* 2004, 72: 1349-1357
- 12 Ely SW, Berne RM. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992, 85: 893-904
- 13 Mubagwa K, Flameng W. Adenosine, adenosine receptors and myocardial protection: an updated overview. *Cardiovasc Res* 2001, 52: 25-39
- 14 Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature reviews* 2006, 5: 247-264
- 15 Peart JN, Headrick JP. Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways. *Pharmacol Ther* 2007, 114: 208-221
- 16 Niu J, Azfer A, Kolattukudy PE. Monocyte-specific Bcl-2 expression attenuates inflammation and heart failure in monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2006, 71: 139-148
- 17 Green DR. Overview: apoptotic signaling pathways in the immune system. *Immunological reviews* 2003, 193: 5-9
- 18 Bialik S, Geenen DL, Sasson IE, Cheng R, Horner JW, Evans SM, Lord EM, *et al.* Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in the mouse localizes to hypoxic regions but occurs independently of p53. *J Clin Invest* 1997, 100: 1363-1372
- 19 Hayakawa K, Takemura G, Kanoh M, Li Y, Koda M, Kawase Y, Maruyama R, *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* 2003, 108: 104-109
- 20 Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2004, 104: 1-16
- 21 Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997, 349: 1498-1504
- 22 WHO publishes definitive atlas on global heart disease and stroke epidemic. *Indian journal of medical sciences* 2004, 58: 405-406
- 23 Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001, 104: 2746-2753
- 24 Pilote L, Dasgupta K, Guru V, Humphries KH, McGrath J, Norris C, Rabi D, *et al.* A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease. *Cmaj* 2007, 176: S1-44
- 25 Jackson G. Gender differences in cardiovascular disease prevention. *Menopause international* 2008, 14: 13-17
- 26 Lloyd-Jones DM, Larson MG, Beiser A, Levy D. Lifetime risk of developing coronary heart disease. *Lancet* 1999, 353: 89-92

- 27 Terry DF, Pencina MJ, Vasan RS, Murabito JM, Wolf PA, Hayes MK, Levy D, *et al.* Cardiovascular risk factors predictive for survival and morbidity-free survival in the oldest-old Framingham Heart Study participants. *Journal of the American Geriatrics Society* 2005, 53: 1944-1950
- 28 Andrawes WF, Bussy C, Belmin J. Prevention of cardiovascular events in elderly people. *Drugs & aging* 2005, 22: 859-876
- 29 Morales A, Cowan J, Dagua J, Hershberger RE. Family history: an essential tool for cardiovascular genetic medicine. *Congestive heart failure (Greenwich, Conn 2008, 14: 37-45*
- 30 Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2002, 39: 1890-1900
- 31 Jenkins KJ, Correa A, Feinstein JA, Botto L, Britt AE, Daniels SR, Elixson M, *et al.* Noninherited risk factors and congenital cardiovascular defects: current knowledge: a scientific statement from the American Heart Association Council on Cardiovascular Disease in the Young: endorsed by the American Academy of Pediatrics. *Circulation* 2007, 115: 2995-3014
- 32 Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, *et al.* Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004, 364: 937-952
- 33 Libby P. The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J Am Coll Cardiol* 2005, 46: 1225-1228
- 34 Lewis EF, Moye LA, Rouleau JL, Sacks FM, Arnold JM, Warnica JW, Flaker GC, *et al.* Predictors of late development of heart failure in stable survivors of myocardial infarction: the CARE study. *J Am Coll Cardiol* 2003, 42: 1446-1453
- 35 Greenland P, Knoll MD, Stamler J, Neaton JD, Dyer AR, Garside DB, Wilson PW. Major risk factors as antecedents of fatal and nonfatal coronary heart disease events. *Jama* 2003, 290: 891-897
- 36 Reddy KS, Yusuf S. Emerging epidemic of cardiovascular disease in developing countries. *Circulation* 1998, 97: 596-601
- 37 Mackman N. Triggers, targets and treatments for thrombosis. *Nature* 2008, 451: 914-918
- 38 Anand SS, Islam S, Rosengren A, Franzosi MG, Steyn K, Yusufali AH, Keltai M, *et al.* Risk factors for myocardial infarction in women and men: insights from the INTERHEART study. *Eur Heart J* 2008, 29: 932-940
- 39 Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, *et al.* Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007, 115: e69-171
- 40 Zannad F, Mebazaa A, Juilliere Y, Cohen-Solal A, Guize L, Alla F, Rouge P, *et al.* Clinical profile, contemporary management and one-year mortality in patients with severe acute heart failure syndromes: The EFICA study. *Eur J Heart Fail* 2006, 8: 697-705
- 41 McGinn AP, Rosamond WD, Goff DC, Jr., Taylor HA, Miles JS, Chambless L. Trends in prehospital delay time and use of emergency medical services for acute myocardial infarction: experience in 4 US communities from 1987-2000. *Am Heart J* 2005, 150: 392-400
- 42 Torabi A, Cleland JG, Khan NK, Loh PH, Clark AL, Alamgir F, Caplin JL, *et al.* The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008, 29: 859-870
- 43 Hellermann JP, Goraya TY, Jacobsen SJ, Weston SA, Reeder GS, Gersh BJ, Redfield MM, *et al.* Incidence of heart failure after myocardial infarction: is it changing over time? *Am J Epidemiol* 2003, 157: 1101-1107
- 44 Braunwald E. Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* 1997, 337: 1360-1369
- 45 Basile J. Hypertension in the elderly: a review of the importance of systolic blood pressure elevation. *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn 2002, 4: 108-112, 119*
- 46 Krumholz HM, Chen YT, Wang Y, Vaccarino V, Radford MJ, Horwitz RI. Predictors of readmission among elderly survivors of admission with heart failure. *Am Heart J* 2000, 139: 72-77
- 47 Stewart S, MacIntyre K, Hole DJ, Capewell S, McMurray JJ. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001, 3: 315-322
- 48 Mudd JO, Kass DA. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* 2008, 451: 919-928
- 49 Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature* 2008, 451: 904-913
- 50 Kawai C. Pathogenesis of acute myocardial infarction. Novel regulatory systems of bioactive substances in the vessel wall. *Circulation* 1994, 90: 1033-1043
- 51 Shiraiishi J, Kohno Y, Sawada T, Nishizawa S, Arihara M, Hadase M, Hyogo M, *et al.* Pathogenesis of acute myocardial infarction in young male adults with or without obesity. *J Cardiol* 2007, 49: 13-21

- 52 Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 1986, 111: 383-390
- 53 Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacological reviews* 2007, 59: 418-458
- 54 Grynberg A. [Role of membrane lipids in myocardial cytoprotection]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 2000, 93: 175-182
- 55 Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 282: C227-241
- 56 Rentrop KP. Thrombi in acute coronary syndromes : revisited and revised. *Circulation* 2000, 101: 1619-1626
- 57 Swynghedauw B. [Is adult cardiac myocyte still able to proliferate?]. *Med Sci (Paris)* 2004, 20: 710-714
- 58 Beltrami AP, Urbaneck K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, Nadal-Ginard B, *et al.* Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001, 344: 1750-1757
- 59 Ballard VL, Edelberg JM. Stem cells and the regeneration of the aging cardiovascular system. *Circulation research* 2007, 100: 1116-1127
- 60 Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002, 53: 31-47
- 61 Matsumura K, Jeremy RW, Schaper J, Becker LC. Progression of myocardial necrosis during reperfusion of ischemic myocardium. *Circulation* 1998, 97: 795-804
- 62 Dargie H. Heart failure post-myocardial infarction: a review of the issues. *Heart* 2005, 91 Suppl 2: ii3-6; discussion ii31, ii43-38
- 63 Meijer A, Verheugt FW, van Eenige MJ, Werter CJ. Left ventricular function at 3 months after successful thrombolysis. Impact of reocclusion without reinfarction on ejection fraction, regional function, and remodeling. *Circulation* 1994, 90: 1706-1714
- 64 Popovic AD, Neskovic AN, Babic R, Obradovic V, Bozinovic L, Marinkovic J, Lee JC, *et al.* Independent impact of thrombolytic therapy and vessel patency on left ventricular dilation after myocardial infarction. Serial echocardiographic follow-up. *Circulation* 1994, 90: 800-807
- 65 Gibson CM, Cannon CP, Murphy SA, Marble SJ, Barron HV, Braunwald E. Relationship of the TIMI myocardial perfusion grades, flow grades, frame count, and percutaneous coronary intervention to long-term outcomes after thrombolytic administration in acute myocardial infarction. *Circulation* 2002, 105: 1909-1913
- 66 Sheiban I, Fragasso G, Rosano GM, Dharmadhikari A, Tzifos V, Pagnotta P, Chierchia SL, *et al.* Time course and determinants of left ventricular function recovery after primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001, 38: 464-471
- 67 Cucherat M, Bonnefoy E, Tremeau G. WITHDRAWN: Primary angioplasty versus intravenous thrombolysis for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev* 2003: CD001560
- 68 Late Assessment of Thrombolytic Efficacy (LATE) study with alteplase 6-24 hours after onset of acute myocardial infarction. *Lancet* 1993, 342: 759-766
- 69 Centurion OA. The open artery hypothesis: beneficial effects and long-term prognostic importance of patency of the infarct-related coronary artery. *Angiology* 2007, 58: 34-44
- 70 Hochman JS, Choo H. Limitation of myocardial infarct expansion by reperfusion independent of myocardial salvage. *Circulation* 1987, 75: 299-306
- 71 Michael LH, Ballantyne CM, Zachariah JP, Gould KE, Pocius JS, Taffet GE, Hartley CJ, *et al.* Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol* 1999, 277: H660-668
- 72 Richard V, Murry CE, Reimer KA. Healing of myocardial infarcts in dogs. Effects of late reperfusion. *Circulation* 1995, 92: 1891-1901
- 73 Pizzetti G, Belotti G, Margonato A, Cappelletti A, Chierchia SL. Coronary recanalization by elective angioplasty prevents ventricular dilation after anterior myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1996, 28: 837-845
- 74 Gerber BL, Rochitte CE, Melin JA, McVeigh ER, Bluemke DA, Wu KC, Becker LC, *et al.* Microvascular obstruction and left ventricular remodeling early after acute myocardial infarction. *Circulation* 2000, 101: 2734-2741
- 75 Wu KC, Zerhouni EA, Judd RM, Lugo-Olivieri CH, Barouch LA, Schulman SP, Blumenthal RS, *et al.* Prognostic significance of microvascular obstruction by magnetic resonance imaging in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1998, 97: 765-772
- 76 Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Benigno M, La Canna G, Pepi P, Ferrari F, *et al.* Different outcomes of the reperfused myocardium: insights into the comments of stunning and hibernation. *International journal of cardiology* 1998, 65 Suppl 1: S7-16
- 77 Lalu MM, Pasini E, Schulze CJ, Ferrari-Vivaldi M, Ferrari-Vivaldi G, Bachetti T, Schulz R. Ischaemia-reperfusion injury activates matrix metalloproteinases in the human heart. *Eur Heart J* 2005, 26: 27-35

- 78 Elsassner A, Muller KD, Skwara W, Bode C, Kubler W, Vogt AM. Severe energy deprivation of human hibernating myocardium as possible common pathomechanism of contractile dysfunction, structural degeneration and cell death. *J Am Coll Cardiol* 2002, 39: 1189-1198
- 79 Braunwald E, Rutherford JD. Reversible ischemic left ventricular dysfunction: evidence for the "hibernating myocardium". *J Am Coll Cardiol* 1986, 8: 1467-1470
- 80 Samady H, Elefteriades JA, Abbott BG, Mattera JA, McPherson CA, Wackers FJ. Failure to improve left ventricular function after coronary revascularization for ischemic cardiomyopathy is not associated with worse outcome. *Circulation* 1999, 100: 1298-1304
- 81 Lee KS, Marwick TH, Cook SA, Go RT, Fix JS, James KB, Sapp SK, *et al.* Prognosis of patients with left ventricular dysfunction, with and without viable myocardium after myocardial infarction. Relative efficacy of medical therapy and revascularization. *Circulation* 1994, 90: 2687-2694
- 82 Burkett EL, Hershberger RE. Clinical and genetic issues in familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005, 45: 969-981
- 83 Feldman AM, Wagner DR, McNamara DM. AMPD1 gene mutation in congestive heart failure: new insights into the pathobiology of disease progression. *Circulation* 1999, 99: 1397-1399
- 84 Schocken DD, Benjamin EJ, Fonarow GC, Krumholz HM, Levy D, Mensah GA, Narula J, *et al.* Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 2008, 117: 2544-2565
- 85 Nieminen MS, Bohm M, Cowie MR, Drexler H, Filippatos GS, Jondeau G, Hasin Y, *et al.* Executive summary of the guidelines on the diagnosis and treatment of acute heart failure: the Task Force on Acute Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005, 26: 384-416
- 86 Denolin H, Kuhn H, Krayenbuehl HP, Loogen F, Reale A. The definition of heart failure. *Eur Heart J* 1983, 4: 445-448
- 87 Purcell IF, Poole-Wilson PA. Heart failure: why and how to define it? *Eur J Heart Fail* 1999, 1: 7-10
- 88 Wagner S, Cohn K. Heart failure. A proposed definition and classification. *Archives of internal medicine* 1977, 137: 675-678
- 89 Zannad F, Stough WG, Pitt B, Cleland JG, Adams KF, Geller NL, Torp-Pedersen C, *et al.* Heart failure as an endpoint in heart failure and non-heart failure cardiovascular clinical trials: the need for a consensus definition. *Eur Heart J* 2008, 29: 413-421
- 90 Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, *et al.* ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 2005, 112: e154-235
- 91 Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, *et al.* Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2002, 106: 3068-3072
- 92 Mosterd A, Hoes AW, de Bruyne MC, Deckers JW, Linker DT, Hofman A, Grobbee DE. Prevalence of heart failure and left ventricular dysfunction in the general population; The Rotterdam Study. *Eur Heart J* 1999, 20: 447-455
- 93 Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, Austin PC, Fang J, Haouzi A, Gong Y, *et al.* Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med* 2006, 355: 260-269
- 94 Donal E. [Heart failure with preserved ejection fraction.]. *La Revue de medecine interne / fondee* 2008,
- 95 Yusuf S, Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, Held P, McMurray JJ, Michelson EL, *et al.* Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM-Preserved Trial. *Lancet* 2003, 362: 777-781
- 96 Owan TE, Hodge DO, Herges RM, Jacobsen SJ, Roger VL, Redfield MM. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N Engl J Med* 2006, 355: 251-259
- 97 Tsuchihashi M, Tsutsui H, Kodama K, Kasagi F, Setoguchi S, Mohr M, Kubota T, *et al.* Medical and socioenvironmental predictors of hospital readmission in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 2001, 142: E7
- 98 Yancy CW, Lopatin M, Stevenson LW, De Marco T, Fonarow GC. Clinical presentation, management, and in-hospital outcomes of patients admitted with acute decompensated heart failure with preserved systolic function: a report from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry (ADHERE) Database. *J Am Coll Cardiol* 2006, 47: 76-84
- 99 Jong P, Demers C, McKelvie RS, Liu PP. Angiotensin receptor blockers in heart failure: meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol* 2002, 39: 463-470

- 100 Struthers A, Krum H, Williams GH. A comparison of the aldosterone-blocking agents eplerenone and spironolactone. *Clinical cardiology* 2008, 31: 153-158
- 101 Bouzamondo A, Hulot JS, Sanchez P, Lechat P. Beta-blocker benefit according to severity of heart failure. *Eur J Heart Fail* 2003, 5: 281-289
- 102 Lee CY, Burnett JC, Jr. Natriuretic peptides and therapeutic applications. *Heart failure reviews* 2007, 12: 131-142
- 103 Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. *Nature* 1988, 332: 78-81
- 104 Yancy CW. Treatment with B-type natriuretic peptide for chronic decompensated heart failure: insights learned from the follow-up serial infusion of nesiritide (FUSION) trial. *Heart failure reviews* 2004, 9: 209-216
- 105 Cleland JG, Daubert JC, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, Kappenberger L, Tavazzi L. The effect of cardiac resynchronization on morbidity and mortality in heart failure. *N Engl J Med* 2005, 352: 1539-1549
- 106 Cazeau SJ, Daubert JC, Tavazzi L, Frohlig G, Paul V. Responders to cardiac resynchronization therapy with narrow or intermediate QRS complexes identified by simple echocardiographic indices of dyssynchrony: the DESIRE study. *Eur J Heart Fail* 2008, 10: 273-280
- 107 Moss AJ, Zareba W, Hall WJ, Klein H, Wilber DJ, Cannom DS, Daubert JP, *et al.* Prophylactic implantation of a defibrillator in patients with myocardial infarction and reduced ejection fraction. *N Engl J Med* 2002, 346: 877-883
- 108 George RS, Yacoub MH, Bowles CT, Hipkin M, Rogers P, Hallas C, Banner NR, *et al.* Quality of life after removal of left ventricular assist device for myocardial recovery. *J Heart Lung Transplant* 2008, 27: 165-172
- 109 Goldenberg I, Moss AJ, Hall WJ, McNitt S, Zareba W, Andrews ML, Cannom DS. Causes and consequences of heart failure after prophylactic implantation of a defibrillator in the multicenter automatic defibrillator implantation trial II. *Circulation* 2006, 113: 2810-2817
- 110 Swedberg K, Cleland J, Dargie H, Drexler H, Follath F, Komajda M, Tavazzi L, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005, 26: 1115-1140
- 111 Gerszten RE, Wang TJ. The search for new cardiovascular biomarkers. *Nature* 2008, 451: 949-952
- 112 Koenig W. Cardiovascular biomarkers: added value with an integrated approach? *Circulation* 2007, 116: 3-5
- 113 Braunwald E. Biomarkers in heart failure. *N Engl J Med* 2008, 358: 2148-2159
- 114 Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl YY, *et al.* Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003, 107: 499-511
- 115 Lloyd-Jones DM, Liu K, Tian L, Greenland P. Narrative review: Assessment of C-reactive protein in risk prediction for cardiovascular disease. *Ann Intern Med* 2006, 145: 35-42
- 116 Nishikawa T, Hagihara K, Serada S, Isobe T, Matsumura A, Song J, Tanaka T, *et al.* Transcriptional complex formation of c-Fos, STAT3, and hepatocyte NF-1 alpha is essential for cytokine-driven C-reactive protein gene expression. *J Immunol* 2008, 180: 3492-3501
- 117 Bassuk SS, Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: clinical importance. *Current problems in cardiology* 2004, 29: 439-493
- 118 Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, Pfeffer MA, *et al.* C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N Engl J Med* 2005, 352: 20-28
- 119 Anand IS, Latini R, Florea VG, Kuskowski MA, Rector T, Masson S, Signorini S, *et al.* C-reactive protein in heart failure: prognostic value and the effect of valsartan. *Circulation* 2005, 112: 1428-1434
- 120 Vasani RS, Sullivan LM, Roubenoff R, Dinarello CA, Harris T, Benjamin EJ, Sawyer DB, *et al.* Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation* 2003, 107: 1486-1491
- 121 Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. *J Am Coll Cardiol* 2006, 48: 1-11
- 122 Horwich TB, Patel J, MacLellan WR, Fonarow GC. Cardiac troponin I is associated with impaired hemodynamics, progressive left ventricular dysfunction, and increased mortality rates in advanced heart failure. *Circulation* 2003, 108: 833-838
- 123 Adams JE, 3rd, Bodor GS, Davila-Roman VG, Delmez JA, Apple FS, Ladenson JH, Jaffe AS. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993, 88: 101-106
- 124 Alpert JS, Thygesen K, Antman E, Bassand JP. Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000, 36: 959-969

- 125 Antman EM, Tanasijevic MJ, Thompson B, Schactman M, McCabe CH, Cannon CP, Fischer GA, *et al.* Cardiac-specific troponin I levels to predict the risk of mortality in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1996, 335: 1342-1349
- 126 Galvani M, Ottani F, Ferrini D, Ladenson JH, Destro A, Baccos D, Rusticali F, *et al.* Prognostic influence of elevated values of cardiac troponin I in patients with unstable angina. *Circulation* 1997, 95: 2053-2059
- 127 Landesberg G, Shatz V, Akopnik I, Wolf YG, Mayer M, Berlatzky Y, Weissman C, *et al.* Association of cardiac troponin, CK-MB, and postoperative myocardial ischemia with long-term survival after major vascular surgery. *J Am Coll Cardiol* 2003, 42: 1547-1554
- 128 Peacock WF, De Marco T, Fonarow GC, Diercks D, Wynne J, Apple FS, Wu AH. Cardiac troponin and outcome in acute heart failure. *N Engl J Med* 2008, 358: 2117-2126
- 129 Latini R, Masson S, Anand IS, Missov E, Carlson M, Vago T, Angelici L, *et al.* Prognostic value of very low plasma concentrations of troponin T in patients with stable chronic heart failure. *Circulation* 2007, 116: 1242-1249
- 130 Alyanakian MA, Dehoux M, Chatel D, Seguret C, Desmonts JM, Durand G, Philip I. Cardiac troponin I in diagnosis of perioperative myocardial infarction after cardiac surgery. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 1998, 12: 288-294
- 131 D'Souza SP, Davis M, Baxter GF. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart. *Pharmacol Ther* 2004, 101: 113-129
- 132 Baxter GF. Natriuretic peptides and myocardial ischaemia. *Basic Res Cardiol* 2004, 99: 90-93
- 133 Rautureau Y, Baxter GF. Acute actions of natriuretic peptides in coronary vasculature and ischaemic myocardium. *Curr Pharm Des* 2004, 10: 2477-2482
- 134 Calderone A. Natriuretic peptides and the management of heart failure. *Minerva Endocrinol* 2004, 29: 113-127
- 135 Maisel A, Mueller C, Adams K, Jr., Anker SD, Aspromonte N, Cleland JG, Cohen-Solal A, *et al.* State of the art: using natriuretic peptide levels in clinical practice. *Eur J Heart Fail* 2008, 10: 824-839
- 136 Wu AH, Smith A, Wiecek S, Mather JF, Duncan B, White CM, McGill C, *et al.* Biological variation for N-terminal pro- and B-type natriuretic peptides and implications for therapeutic monitoring of patients with congestive heart failure. *Am J Cardiol* 2003, 92: 628-631
- 137 Mehra MR, Uber PA, Park MH, Scott RL, Ventura HO, Harris BC, Frohlich ED. Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2004, 43: 1590-1595
- 138 Levy WC, Mozaffarian D, Linker DT, Sutradhar SC, Anker SD, Cropp AB, Anand I, *et al.* The Seattle Heart Failure Model: prediction of survival in heart failure. *Circulation* 2006, 113: 1424-1433
- 139 Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C, Jacques PF, *et al.* Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2006, 355: 2631-2639
- 140 Pelouch V, Dixon IM, Golfman L, Beamish RE, Dhalla NS. Role of extracellular matrix proteins in heart function. *Mol Cell Biochem* 1993, 129: 101-120
- 141 Newby AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res* 2006, 69: 614-624
- 142 Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology* 2001, 17: 463-516
- 143 Ju H, Dixon IM. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. *The Canadian journal of cardiology* 1996, 12: 1259-1267
- 144 Peterson JT, Li H, Dillon L, Bryant JW. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. *Cardiovasc Res* 2000, 46: 307-315
- 145 Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1962, 48: 1014-1022
- 146 Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes & development* 2000, 14: 2123-2133
- 147 Barbolina MV, Stack MS. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis. *Seminars in cell & developmental biology* 2008, 19: 24-33
- 148 Shi J, Son MY, Yamada S, Szabova L, Kahan S, Chrysovergis K, Wolf L, *et al.* Membrane-type MMPs enable extracellular matrix permissiveness and mesenchymal cell proliferation during embryogenesis. *Developmental biology* 2008, 313: 196-209
- 149 Ra HJ, Parks WC. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* 2007, 26: 587-596
- 150 Lindsey ML, Escobar GP, Dobrucki LW, Goshorn DK, Bouges S, Mingoia JT, McClister DM, Jr., *et al.* Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, 290: H232-239

- 151 Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circulation research* 2003, 92: 827-839
- 152 Cho NH, Shim HS, Rha SY, Kang SH, Hong SH, Choi YD, Hong SJ, *et al.* Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *European urology* 2003, 44: 560-566
- 153 Murphy G, Nagase H. Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nature clinical practice* 2008, 4: 128-135
- 154 Molina JR, Reid JM, Erlichman C, Sloan JA, Furth A, Safgren SL, Lathia CD, *et al.* A phase I and pharmacokinetic study of the selective, non-peptidic inhibitor of matrix metalloproteinase BAY 12-9566 in combination with etoposide and carboplatin. *Anti-cancer drugs* 2005, 16: 997-1002
- 155 Fu X, Parks WC, Heinecke JW. Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Seminars in cell & developmental biology* 2008, 19: 2-13
- 156 Overall CM. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Molecular biotechnology* 2002, 22: 51-86
- 157 Webster NL, Crowe SM. Matrix metalloproteinases, their production by monocytes and macrophages and their potential role in HIV-related diseases. *J Leukoc Biol* 2006, 80: 1052-1066
- 158 Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 2006, 69: 562-573
- 159 Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biological chemistry* 1997, 378: 151-160
- 160 Murphy G, Willenbrock F, Crabbe T, O'Shea M, Ward R, Atkinson S, O'Connell J, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994, 732: 31-41
- 161 Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI. Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 1995, 270: 5331-5338
- 162 Suzuki K, Enghild JJ, Morodomi T, Salvesen G, Nagase H. Mechanisms of activation of tissue procollagenase by matrix metalloproteinase 3 (stromelysin). *Biochemistry* 1990, 29: 10261-10270
- 163 Spinale FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circulation research* 2002, 90: 520-530
- 164 Danielsen CC, Wiggers H, Andersen HR. Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1998, 30: 1431-1442
- 165 Webb CS, Bonnema DD, Ahmed SH, Leonardi AH, McClure CD, Clark LL, Stroud RE, *et al.* Specific temporal profile of matrix metalloproteinase release occurs in patients after myocardial infarction: relation to left ventricular remodeling. *Circulation* 2006, 114: 1020-1027
- 166 Cawston TE, Curry VA, Clark IM, Hazleman BL. Identification of a new metalloproteinase inhibitor that forms tight-binding complexes with collagenase. *The Biochemical journal* 1990, 269: 183-187
- 167 Bishop JE, Lindahl G. Regulation of cardiovascular collagen synthesis by mechanical load. *Cardiovasc Res* 1999, 42: 27-44
- 168 Benbow U, Brinckerhoff CE. The AP-1 site and MMP gene regulation: what is all the fuss about? *Matrix Biol* 1997, 15: 519-526
- 169 Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990, 6: 121-125
- 170 Hall MC, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR, Clark IM. The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem* 2003, 278: 10304-10313
- 171 Ogawa K, Chen F, Kuang C, Chen Y. Suppression of matrix metalloproteinase-9 transcription by transforming growth factor-beta is mediated by a nuclear factor-kappaB site. *The Biochemical journal* 2004, 381: 413-422
- 172 Vincenti MP. The matrix metalloproteinase (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) genes. Transcriptional and posttranscriptional regulation, signal transduction and cell-type-specific expression. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 2001, 151: 121-148
- 173 Beaudoux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med* 2004, 42: 121-131
- 174 Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect* 2002, 4: 903-914
- 175 Xie Z, Singh M, Singh K. Differential regulation of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression and activity in adult rat cardiac fibroblasts in response to interleukin-1beta. *The Journal of biological chemistry* 2004, 279: 39513-39519

- 176 Kida Y, Kobayashi M, Suzuki T, Takeshita A, Okamatsu Y, Hanazawa S, Yasui T, *et al.* Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine* 2005, 29: 159-168
- 177 Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Experimental cell research* 2003, 288: 208-217
- 178 Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, MacLellan WR, DeMayo FJ, Spinale FG, Mann DL. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation* 2001, 104: 826-831
- 179 Siwik DA, Chang DL, Colucci WS. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha decrease collagen synthesis and increase matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts in vitro. *Circulation research* 2000, 86: 1259-1265
- 180 Kaye DM, Lefkovits J, Jennings GL, Bergin P, Broughton A, Esler MD. Adverse consequences of high sympathetic nervous activity in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 1995, 26: 1257-1263
- 181 Sugden PH. An overview of endothelin signaling in the cardiac myocyte. *J Mol Cell Cardiol* 2003, 35: 871-886
- 182 Yamashita C, Hayashi T, Mori T, Tazawa N, Kwak CJ, Nakano D, Sohmiya K, *et al.* Angiotensin II receptor blocker reduces oxidative stress and attenuates hypoxia-induced left ventricular remodeling in apolipoprotein E-knockout mice. *Hypertens Res* 2007, 30: 1219-1230
- 183 Francis GS, Cohn JN, Johnson G, Rector TS, Goldman S, Simon A. Plasma norepinephrine, plasma renin activity, and congestive heart failure. Relations to survival and the effects of therapy in V-HeFT II. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation* 1993, 87: VI40-48
- 184 Briest W, Holzl A, Rassler B, Deten A, Baba HA, Zimmer HG. Significance of matrix metalloproteinases in norepinephrine-induced remodelling of rat hearts. *Cardiovascular research* 2003, 57: 379-387
- 185 Senzaki H, Paolucci N, Gluzband YA, Lindsey ML, Janicki JS, Crow MT, Kass DA. beta-blockade prevents sustained metalloproteinase activation and diastolic stiffening induced by angiotensin II combined with evolving cardiac dysfunction. *Circulation research* 2000, 86: 807-815
- 186 Browatzki M, Larsen D, Pfeiffer CA, Gehrke SG, Schmidt J, Kranzhofer A, Katus HA, *et al.* Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear factor-kappaB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner. *Journal of vascular research* 2005, 42: 415-423
- 187 Wang TL, Yang YH, Chang H, Hung CR. Angiotensin II signals mechanical stretch-induced cardiac matrix metalloproteinase expression via JAK-STAT pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2004, 37: 785-794
- 188 Rouet-Benzineb P, Gontero B, Dreyfus P, Lafuma C. Angiotensin II induces nuclear factor- kappa B activation in cultured neonatal rat cardiomyocytes through protein kinase C signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2000, 32: 1767-1778
- 189 Chen K, Mehta JL, Li D, Joseph L, Joseph J. Transforming growth factor beta receptor endoglin is expressed in cardiac fibroblasts and modulates profibrogenic actions of angiotensin II. *Circulation research* 2004, 95: 1167-1173
- 190 Naito S, Shimizu S, Matsuo M, Nakashima M, Nakayama T, Yamashita S, Sekine I. Ets-1 upregulates matrix metalloproteinase-1 expression through extracellular matrix adhesion in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 291: 130-138
- 191 Coker ML, Jolly JR, Joffs C, Etoh T, Holder JR, Bond BR, Spinale FG. Matrix metalloproteinase expression and activity in isolated myocytes after neurohormonal stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 281: H543-551
- 192 Podesser BK, Siwik DA, Eberli FR, Sam F, Ngoy S, Lambert J, Ngo K, *et al.* ET(A)-receptor blockade prevents matrix metalloproteinase activation late postmyocardial infarction in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 280: H984-991
- 193 Liberati NT, Datto MB, Frederick JP, Shen X, Wong C, Rougier-Chapman EM, Wang XF. Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96: 4844-4849
- 194 Rosenkranz S. TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res* 2004, 63: 423-432
- 195 Uria JA, Jimenez MG, Balbin M, Freije JM, Lopez-Otin C. Differential effects of transforming growth factor-beta on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 1998, 273: 9769-9777
- 196 Yuan W, Varga J. Transforming growth factor-beta repression of matrix metalloproteinase-1 in dermal fibroblasts involves Smad3. *J Biol Chem* 2001, 276: 38502-38510

- 197 Han YP, Tuan TL, Hughes M, Wu H, Garner WL. Transforming growth factor-beta - and tumor necrosis factor-alpha -mediated induction and proteolytic activation of MMP-9 in human skin. *J Biol Chem* 2001, 276: 22341-22350
- 198 Czuwara-Ladykowska J, Sementchenko VI, Watson DK, Trojanowska M. Ets1 is an effector of the transforming growth factor beta (TGF-beta) signaling pathway and an antagonist of the profibrotic effects of TGF-beta. *J Biol Chem* 2002, 277: 20399-20408
- 199 Schellings MW, Pinto YM, Heymans S. Matricellular proteins in the heart: possible role during stress and remodeling. *Cardiovasc Res* 2004, 64: 24-31
- 200 Collins AR, Schnee J, Wang W, Kim S, Fishbein MC, Bruemmer D, Law RE, *et al.* Osteopontin modulates angiotensin II-induced fibrosis in the intact murine heart. *J Am Coll Cardiol* 2004, 43: 1698-1705
- 201 Trueblood NA, Xie Z, Communal C, Sam F, Ngoy S, Liaw L, Jenkins AW, *et al.* Exaggerated left ventricular dilation and reduced collagen deposition after myocardial infarction in mice lacking osteopontin. *Circulation research* 2001, 88: 1080-1087
- 202 Schroen B, Heymans S, Sharma U, Blankesteyn WM, Pokharel S, Cleutjens JP, Porter JG, *et al.* Thrombospondin-2 is essential for myocardial matrix integrity: increased expression identifies failure-prone cardiac hypertrophy. *Circulation research* 2004, 95: 515-522
- 203 Das R, Mahabeleshwar GH, Kundu GC. Osteopontin stimulates cell motility and nuclear factor kappaB-mediated secretion of urokinase type plasminogen activator through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in breast cancer cells. *J Biol Chem* 2003, 278: 28593-28606
- 204 Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. JNK1 differentially regulates osteopontin-induced nuclear factor-inducing kinase/MEKK1-dependent activating protein-1-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem* 2005, 280: 19381-19392
- 205 Greenwood JA, Paller MA, Theibert AB, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin signaling of focal adhesion disassembly requires activation of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 1998, 273: 1755-1763
- 206 Brown EJ, Frazier WA. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands. *Trends in cell biology* 2001, 11: 130-135
- 207 Xie Z, Singh M, Siwik DA, Joyner WL, Singh K. Osteopontin inhibits interleukin-1beta-stimulated increases in matrix metalloproteinase activity in adult rat cardiac fibroblasts: role of protein kinase C-zeta. *J Biol Chem* 2003, 278: 48546-48552
- 208 Rangaswami H, Bulbule A, Kundu GC. Nuclear factor-inducing kinase plays a crucial role in osteopontin-induced MAPK/IkappaBalpha kinase-dependent nuclear factor kappaB-mediated promatrix metalloproteinase-9 activation. *J Biol Chem* 2004, 279: 38921-38935
- 209 Philip S, Kundu GC. Osteopontin induces nuclear factor kappa B-mediated promatrix metalloproteinase-2 activation through I kappa B alpha /IKK signaling pathways, and curcumin (diferuloylmethane) down-regulates these pathways. *J Biol Chem* 2003, 278: 14487-14497
- 210 Yang Z, Kyriakides TR, Bornstein P. Matricellular proteins as modulators of cell-matrix interactions: adhesive defect in thrombospondin 2-null fibroblasts is a consequence of increased levels of matrix metalloproteinase-2. *Molecular biology of the cell* 2000, 11: 3353-3364
- 211 Xie Z, Singh M, Singh K. Osteopontin modulates myocardial hypertrophy in response to chronic pressure overload in mice. *Hypertension* 2004, 44: 826-831
- 212 Matsui Y, Jia N, Okamoto H, Kon S, Onozuka H, Akino M, Liu L, *et al.* Role of osteopontin in cardiac fibrosis and remodeling in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension* 2004, 43: 1195-1201
- 213 Lin YH, Yang-Yen HF. The osteopontin-CD44 survival signal involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway. *J Biol Chem* 2001, 276: 46024-46030
- 214 Wang W, Sawicki G, Schulz R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is mediated through matrix metalloproteinase-2. *Cardiovasc Res* 2002, 53: 165-174
- 215 Yoon SO, Park SJ, Yoon SY, Yun CH, Chung AS. Sustained production of H(2)O(2) activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 2002, 277: 30271-30282
- 216 Zhang HJ, Zhao W, Venkataraman S, Robbins ME, Buettner GR, Kregel KC, Oberley LW. Activation of matrix metalloproteinase-2 by overexpression of manganese superoxide dismutase in human breast cancer MCF-7 cells involves reactive oxygen species. *J Biol Chem* 2002, 277: 20919-20926
- 217 Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrix metalloproteinase (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J Biol Chem* 2001, 276: 41279-41287
- 218 Liu W, Rosenberg GA, Shi H, Furuichi T, Timmins GS, Cunningham LA, Liu KJ. Xanthine oxidase activates pro-matrix metalloproteinase-2 in cultured rat vascular smooth muscle cells through non-free radical mechanisms. *Archives of biochemistry and biophysics* 2004, 426: 11-17
- 219 Osenkowski P, Toth M, Fridman R. Processing, shedding, and endocytosis of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Journal of cellular physiology* 2004, 200: 2-10

- 220 Pavlaki M, Cao J, Hymowitz M, Chen WT, Bahou W, Zucker S. A conserved sequence within the propeptide domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase is critical for function as an intramolecular chaperone. *J Biol Chem* 2002, 277: 2740-2749
- 221 Remacle AG, Rozanov DV, Baciuc PC, Chekanov AV, Golubkov VS, Strongin AY. The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Journal of cell science* 2005, 118: 4975-4984
- 222 Deschamps AM, Yarbrough WM, Squires CE, Allen RA, McClister DM, Dowdy KB, McLean JE, *et al.* Trafficking of the membrane type-1 matrix metalloproteinase in ischemia and reperfusion: relation to interstitial membrane type-1 matrix metalloproteinase activity. *Circulation* 2005, 111: 1166-1174
- 223 Stawowy P, Meyborg H, Stibenz D, Borges Pereira Stawowy N, Roser M, Thanabalasingam U, Veinot JP, *et al.* Furin-like proprotein convertases are central regulators of the membrane type matrix metalloproteinase-pro-matrix metalloproteinase-2 proteolytic cascade in atherosclerosis. *Circulation* 2005, 111: 2820-2827
- 224 Remacle AG, Chekanov AV, Golubkov VS, Savinov AY, Rozanov DV, Strongin AY. O-glycosylation regulates autolysis of cellular membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *J Biol Chem* 2006, 281: 16897-16905
- 225 Spinale FG, Coker ML, Bond BR, Zellner JL. Myocardial matrix degradation and metalloproteinase activation in the failing heart: a potential therapeutic target. *Cardiovasc Res* 2000, 46: 225-238
- 226 Liu YE, Wang M, Greene J, Su J, Ullrich S, Li H, Sheng S, *et al.* Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J Biol Chem* 1997, 272: 20479-20483
- 227 Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1477: 267-283
- 228 Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF, Jr. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 2000, 275: 31226-31232
- 229 Pavloff N, Staskus PW, Kishnani NS, Hawkes SP. A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family. *J Biol Chem* 1992, 267: 17321-17326
- 230 Yang TT, Hawkes SP. Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89: 10676-10680
- 231 De Clerck YA, Darville MI, Eeckhout Y, Rousseau GG. Characterization of the promoter of the gene encoding human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2). *Gene* 1994, 139: 185-191
- 232 Wick M, Haronen R, Mumberg D, Burger C, Olsen BR, Budarf ML, Apte SS, *et al.* Structure of the human TIMP-3 gene and its cell cycle-regulated promoter. *The Biochemical journal* 1995, 311 (Pt 2): 549-554
- 233 Greene J, Wang M, Liu YE, Raymond LA, Rosen C, Shi YE. Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4. *J Biol Chem* 1996, 271: 30375-30380
- 234 Yasuda T, Kondo S, Homma T, Harris RC. Regulation of extracellular matrix by mechanical stress in rat glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1996, 98: 1991-2000
- 235 Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 1999, 107: 38-44
- 236 Gomis-Ruth FX, Maskos K, Betz M, Bergner A, Huber R, Suzuki K, Yoshida N, *et al.* Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 1997, 389: 77-81
- 237 Bigg HF, Morrison CJ, Butler GS, Bogoyevitch MA, Wang Z, Soloway PD, Overall CM. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase. *Cancer research* 2001, 61: 3610-3618
- 238 Yamashita K, Suzuki M, Iwata H, Koike T, Hamaguchi M, Shinagawa A, Noguchi T, *et al.* Tyrosine phosphorylation is crucial for growth signaling by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *FEBS Lett* 1996, 396: 103-107
- 239 Tummalapalli CM, Heath BJ, Tyagi SC. Tissue inhibitor of metalloproteinase-4 instigates apoptosis in transformed cardiac fibroblasts. *Journal of cellular biochemistry* 2001, 80: 512-521
- 240 Bond M, Murphy G, Bennett MR, Newby AC, Baker AH. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 induces a Fas-associated death domain-dependent type II apoptotic pathway. *J Biol Chem* 2002, 277: 13787-13795
- 241 Guedez L, Courtemanch L, Stetler-Stevenson M. Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 induces differentiation and an antiapoptotic phenotype in germinal center B cells. *Blood* 1998, 92: 1342-1349
- 242 Lovelock JD, Baker AH, Gao F, Dong JF, Bergeron AL, McPheat W, Sivasubramanian N, *et al.* Heterogeneous effects of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases on cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 288: H461-468
- 243 Strickland DK, Ashcom JD, Williams S, Burgess WH, Migliorini M, Argraves WS. Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. *J Biol Chem* 1990, 265: 17401-17404

- 244 Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, *et al.* The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001, 107: 789-800
- 245 Higo S, Uematsu M, Yamagishi M, Ishibashi-Ueda H, Awata M, Morozumi T, Ohara T, *et al.* Elevation of plasma matrix metalloproteinase-9 in the culprit coronary artery in patients with acute myocardial infarction: clinical evidence from distal protection. *Circ J* 2005, 69: 1180-1185
- 246 Inokubo Y, Hanada H, Ishizaka H, Fukushi T, Kamada T, Okumura K. Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome. *Am Heart J*. 2001: 211-217
- 247 Rohde LE, Ducharme A, Arroyo LH, Aikawa M, Sukhova GH, Lopez-Anaya A, McClure KF, *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* 1999, 99: 3063-3070
- 248 Wilson EM, Moainie SL, Baskin JM, Lowry AS, Deschamps AM, Mukherjee R, Guy TS, *et al.* Region- and type-specific induction of matrix metalloproteinases in post-myocardial infarction remodeling. *Circulation* 2003, 107: 2857-2863
- 249 Beertsen W, Holmbeck K, Niehof A, Bianco P, Chrysovergis K, Birkedal-Hansen H, Everts V. On the role of MT1-MMP, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodeling, in murine molar eruption and root growth. *Eur J Oral Sci* 2002, 110: 445-451
- 250 Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, *et al.* MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover. *Cell* 1999, 99: 81-92
- 251 Mukherjee R, Bruce JA, McClister DM, Jr., Allen CM, Sweterlitsch SE, Saul JP. Time-dependent changes in myocardial structure following discrete injury in mice deficient of matrix metalloproteinase-3. *J Mol Cell Cardiol* 2005, 39: 259-268
- 252 Wang M, Qin X, Mudgett JS, Ferguson TA, Senior RM, Welgus HG. Matrix metalloproteinase deficiencies affect contact hypersensitivity: stromelysin-1 deficiency prevents the response and gelatinase B deficiency prolongs the response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96: 6885-6889
- 253 Fedak PW, Smookler DS, Kassiri Z, Ohno N, Leco KJ, Verma S, Mickle DA, *et al.* TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2004, 110: 2401-2409
- 254 Lindsey ML, Escobar GP, Mukherjee R, Goshorn DK, Sheats NJ, Bruce JA, Mains IM, *et al.* Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction. *Circulation* 2006, 113: 2919-2928
- 255 Ikonomidis JS, Hendrick JW, Parkhurst AM, Herron AR, Escobar PG, Dowdy KB, Stroud RE, *et al.* Accelerated LV remodeling after myocardial infarction in TIMP-1-deficient mice: effects of exogenous MMP inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 288: H149-158
- 256 Mukherjee R, Parkhurst AM, Mingoia JT, Sweterlitsch SE, Leiser JS, Escobar GP, Spinale FG, *et al.* Myocardial remodeling after discrete radiofrequency injury: effects of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 gene deletion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004, 286: H1242-1247
- 257 Matsumura S, Iwanaga S, Mochizuki S, Okamoto H, Ogawa S, Okada Y. Targeted deletion or pharmacological inhibition of MMP-2 prevents cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *J Clin Invest* 2005, 115: 599-609
- 258 King MK, Coker ML, Goldberg A, McElmurray JH, 3rd, Gunasinghe HR, Mukherjee R, Zile MR, *et al.* Selective matrix metalloproteinase inhibition with developing heart failure: effects on left ventricular function and structure. *Circulation research* 2003, 92: 177-185
- 259 Lindsey ML, Gannon J, Aikawa M, Schoen FJ, Rabkin E, Lopresti-Morrow L, Crawford J, *et al.* Selective matrix metalloproteinase inhibition reduces left ventricular remodeling but does not inhibit angiogenesis after myocardial infarction. *Circulation* 2002, 105: 753-758
- 260 Yarbrough WM, Mukherjee R, Brinsa TA, Dowdy KB, Scott AA, Escobar GP, Joffs C, *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition modifies left ventricular remodeling after myocardial infarction in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003, 125: 602-610
- 261 Mukherjee R, Brinsa TA, Dowdy KB, Scott AA, Baskin JM, Deschamps AM, Lowry AS, *et al.* Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation* 2003, 107: 618-625
- 262 Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O'Brien PM, Sliskovic DR, Bocan TM, *et al.* Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation* 2001, 103: 2303-2309
- 263 Spinale FG, Escobar GP, Hendrick JW, Clark LL, Camens SS, Mingoia JP, Squires CG, *et al.* Chronic matrix metalloproteinase inhibition following myocardial infarction in mice: differential effects on short and long-term survival. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 318: 966-973

- 264 Hudson MP, Armstrong PW, Ruzyllo W, Brum J, Cusmano L, Krzeski P, Lyon R, *et al.* Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of the PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006, 48: 15-20
- 265 Vanhoutte D, Schellings M, Pinto Y, Heymans S. Relevance of matrix metalloproteinases and their inhibitors after myocardial infarction: a temporal and spatial window. *Cardiovascular research* 2006, 69: 604-613
- 266 Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE, Schoen FJ, *et al.* Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000, 106: 55-62
- 267 Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, Dyspersin GD, *et al.* Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999, 5: 1135-1142
- 268 Roberts CS, Maclean D, Maroko P, Kloner RA. Early and late remodeling of the left ventricle after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1984, 54: 407-410
- 269 McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, *et al.* Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 1986, 74: 693-702
- 270 Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990, 81: 1161-1172
- 271 Struthers AD. Pathophysiology of heart failure following myocardial infarction. *Heart* 2005, 91 Suppl 2: ii14-16; discussion ii31, ii43-18
- 272 Cohn JN. Critical review of heart failure: the role of left ventricular remodeling in the therapeutic response. *Clinical cardiology* 1995, 18: IV4-12
- 273 Roy S, Khanna S, Kuhn DE, Rink C, Williams WT, Zweier JL, Sen CK. Transcriptome analysis of the ischemia-reperfused remodeling myocardium: temporal changes in inflammation and extracellular matrix. *Physiological genomics* 2006, 25: 364-374
- 274 Samuel JL, Schaub MC, Zaugg M, Mamas M, Dunn WB, Swynghedauw B. Genomics in cardiac metabolism. *Cardiovasc Res* 2008,
- 275 Kim SH, Kim HS, Lee MM. Re-expression of fetal troponin isoforms in the postinfarction failing heart of the rat. *Circ J* 2002, 66: 959-964
- 276 Palmer BM. Thick filament proteins and performance in human heart failure. *Heart failure reviews* 2005, 10: 187-197
- 277 Tomaselli GF, Zipes DP. What causes sudden death in heart failure? *Circulation research* 2004, 95: 754-763
- 278 Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 1999, 341: 1276-1283
- 279 Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation* 2002, 105: 85-92
- 280 Dorn GW, 2nd, Souroujon MC, Liron T, Chen CH, Gray MO, Zhou HZ, Csukai M, *et al.* Sustained in vivo cardiac protection by a rationally designed peptide that causes epsilon protein kinase C translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 96: 12798-12803
- 281 Mochly-Rosen D, Wu G, Hahn H, Osinska H, Liron T, Lorenz JN, Yatani A, *et al.* Cardioprotective effects of protein kinase C epsilon: analysis by in vivo modulation of PKCepsilon translocation. *Circulation research* 2000, 86: 1173-1179
- 282 Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, *et al.* Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circulation research* 2001, 89: 997-1004
- 283 Bowman JC, Steinberg SF, Jiang T, Geenen DL, Fishman GI, Buttrick PM. Expression of protein kinase C beta in the heart causes hypertrophy in adult mice and sudden death in neonates. *J Clin Invest* 1997, 100: 2189-2195
- 284 Zannad F, Adamopoulos C, Mebazaa A, Gheorghiade M. The challenge of acute decompensated heart failure. *Heart failure reviews* 2006, 11: 135-139
- 285 Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 1999, 79: 215-262
- 286 Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1994, 26: 279-292
- 287 Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annual review of cell and developmental biology* 2007, 23: 435-461

- 288 Nakahama M, Murakami T, Kusachi S, Naito I, Takeda K, Ohnishi H, Komatsubara I, *et al.* Expression of perlecan proteoglycan in the infarct zone of mouse myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 2000, 32: 1087-1100
- 289 Eghbali M, Weber KT. Collagen and the myocardium: fibrillar structure, biosynthesis and degradation in relation to hypertrophy and its regression. *Mol Cell Biochem* 1990, 96: 1-14
- 290 Banerjee I, Yekkala K, Borg TK, Baudino TA. Dynamic interactions between myocytes, fibroblasts, and extracellular matrix. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006, 1080: 76-84
- 291 Vaehri A, Salonen EM, Vartio T. Fibronectin in formation and degradation of the pericellular matrix. *Ciba Foundation symposium* 1985, 114: 111-126
- 292 Repesh LA, Fitzgerald TJ, Furcht LT. Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits. *J Histochem Cytochem* 1982, 30: 351-358
- 293 Greiling D, Clark RA. Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix. *Journal of cell science* 1997, 110 (Pt 7): 861-870
- 294 Vanhoutte D, Schellings MW, Gotte M, Swinnen M, Herias V, Wild MK, Vestweber D, *et al.* Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation* 2007, 115: 475-482
- 295 Grzesik WJ, Frazier CR, Shapiro JR, Sponseller PD, Robey PG, Fedarko NS. Age-related changes in human bone proteoglycan structure. Impact of osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem* 2002, 277: 43638-43647
- 296 Kolset SO, Prydz K, Fjeldstad K, Safaiyan F, Vuong TT, Gottfridsson E, Salmivirta M. Effect of brefeldin A on heparan sulphate biosynthesis in Madin-Darby canine kidney cells. *The Biochemical journal* 2002, 362: 359-366
- 297 Zak R. Development and proliferative capacity of cardiac muscle cells. *Circulation research* 1974, 35: suppl II:17-26
- 298 Eghbali M, Tomek R, Woods C, Bhambi B. Cardiac fibroblasts are predisposed to convert into myocyte phenotype: specific effect of transforming growth factor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, 88: 795-799
- 299 Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation* 2003, 108: 1395-1403
- 300 Gaertner R, Logeart D, Michel JB, Mercadier JJ. [Early left ventricular remodelling following acute coronary accident]. *Med Sci (Paris)* 2004, 20: 643-650
- 301 Frangogiannis NG, Shimoni S, Chang SM, Ren G, Dewald O, Gersch C, Shan K, *et al.* Active interstitial remodeling: an important process in the hibernating human myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2002, 39: 1468-1474
- 302 Sainte Beuve C, Leclercq C, Rannou F, Oliviero P, Mansier P, Chevalier B, Swynghedauw B, *et al.* Remodeling of the heart (membrane proteins and collagen) in hypertensive cardiopathy. *Kidney international* 1992, 37: S45-50
- 303 Kawakami R, Saito Y, Kishimoto I, Harada M, Kuwahara K, Takahashi N, Nakagawa Y, *et al.* Overexpression of brain natriuretic peptide facilitates neutrophil infiltration and cardiac matrix metalloproteinase-9 expression after acute myocardial infarction. *Circulation* 2004, 110: 3306-3312
- 304 Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Gout B, Berrebi-Bertrand I, Ohlstein EH. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. *Life Sci* 2001, 68: 799-814
- 305 Borel JP, Maquart FX. [Molecular mechanisms of wound scarring]. *Ann Biol Clin (Paris)* 1998, 56: 11-19
- 306 Opendakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, *et al.* Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol* 2001, 69: 851-859
- 307 Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, Burns AR, *et al.* Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 2001, 103: 2181-2187
- 308 Tao ZY, Cavin MA, Yang F, Liu YH, Yang XP. Temporal changes in matrix metalloproteinase expression and inflammatory response associated with cardiac rupture after myocardial infarction in mice. *Life Sci* 2004, 74: 1561-1572
- 309 Sun M, Dawood F, Wen WH, Chen M, Dixon I, Kirshenbaum LA, Liu PP. Excessive tumor necrosis factor activation after infarction contributes to susceptibility of myocardial rupture and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2004, 110: 3221-3228
- 310 Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 1995, 27: 1281-1292
- 311 Lu L, Zhang JQ, Ramirez FJ, Sun Y. Molecular and cellular events at the site of myocardial infarction: from the perspective of rebuilding myocardial tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, 320: 907-913

- 312 Camp TM, Tyagi SC, Aru GM, Hayden MR, Mehta JL, Tyagi SC. Doxycycline ameliorates ischemic and border-zone remodeling and endothelial dysfunction after myocardial infarction in rats. *J Heart Lung Transplant* 2004, 23: 729-736
- 313 Virag JI, Murry CE. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *The American journal of pathology* 2003, 163: 2433-2440
- 314 Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007, 204: 3037-3047
- 315 Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, Michael LH, *et al.* CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circulation research* 2005, 96: 881-889
- 316 Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE, Ikeda U. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circulation research* 2006, 99: 891-899
- 317 Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000, 5: 40-46
- 318 Majno G, Gabbiani G, Hirschel BJ, Ryan GB, Statkov PR. Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle. *Science* 1971, 173: 548-550
- 319 Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 1994, 124: 401-404
- 320 Hayashidani S, Tsutsui H, Ikeuchi M, Shiomi T, Matsusaka H, Kubota T, Imanaka-Yoshida K, *et al.* Targeted deletion of MMP-2 attenuates early LV rupture and late remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 285: H1229-1235
- 321 Mak TW, Yeh WC. Signaling for survival and apoptosis in the immune system. *Arthritis research* 2002, 4 Suppl 3: S243-252
- 322 Alexander C, Rietschel ET. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *Journal of endotoxin research* 2001, 7: 167-202
- 323 Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation* 1998, 98: 149-156
- 324 Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000, 406: 782-787
- 325 Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, *et al.* Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 1999, 162: 3749-3752
- 326 Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, *et al.* TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. *Nat Genet* 2000, 25: 187-191
- 327 Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999, 189: 1777-1782
- 328 Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 1999, 104: 271-280
- 329 Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation* 2004, 109: 784-789
- 330 Stapel H, Kim SC, Osterkamp S, Knuefermann P, Hoeft A, Meyer R, Grohe C, *et al.* Toll-like receptor 4 modulates myocardial ischaemia-reperfusion injury: Role of matrix metalloproteinases. *Eur J Heart Fail* 2006, 8: 665-672
- 331 Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, Shomura S, Takayama H, Fleisig AJ, Agnew ML, *et al.* Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 2006, 114: I270-274
- 332 Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hoefler IE, Nederhoff MG, Goumans MJ, Doevendans PA, *et al.* Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circulation research* 2008, 102: 257-264
- 333 Zhu X, Zhao H, Graveline AR, Buys ES, Schmidt U, Bloch KD, Rosenzweig A, *et al.* MyD88 and NOS2 are essential for toll-like receptor 4-mediated survival effect in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, 291: H1900-1909
- 334 Qureshi N, Takayama K, Ribic E. Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 1982, 257: 11808-11815
- 335 Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 2007, 316: 1628-1632
- 336 Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, Alexander SI, *et al.* TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007, 117: 2847-2859

- 337 Brunn GJ, Bungum MK, Johnson GB, Platt JL. Conditional signaling by Toll-like receptor 4. *FASEB J* 2005, 19: 872-874
- 338 Hwang D. Modulation of the expression of cyclooxygenase-2 by fatty acids mediated through toll-like receptor 4-derived signaling pathways. *Faseb J* 2001, 15: 2556-2564
- 339 Huszar E, Vass G, Vizi E, Csoma Z, Barat E, Molnar Vilagos G, Herjavec I, *et al.* Adenosine in exhaled breath condensate in healthy volunteers and in patients with asthma. *Eur Respir J* 2002, 20: 1393-1398
- 340 Yaar R, Jones MR, Chen JF, Ravid K. Animal models for the study of adenosine receptor function. *Journal of cellular physiology* 2005, 202: 9-20
- 341 Deussen A. Metabolic flux rates of adenosine in the heart. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2000, 362: 351-363
- 342 Olsson RA, Pearson JD. Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 1990, 70: 761-845
- 343 Schaeffer HJ, Schwender CF. Enzyme inhibitors. 26. Bridging hydrophobic and hydrophilic regions on adenosine deaminase with some 9-(2-hydroxy-3-alkyl)adenines. *Journal of medicinal chemistry* 1974, 17: 6-8
- 344 Lloyd HG, Fredholm BB. Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extracellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. *Neurochemistry international* 1995, 26: 387-395
- 345 Parkinson FE, Geiger JD. Effects of iodotubercidin on adenosine kinase activity and nucleoside transport in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1996, 277: 1397-1401
- 346 Deussen A, Stappert M, Schafer S, Kelm M. Quantification of extracellular and intracellular adenosine production: understanding the transmembranous concentration gradient. *Circulation* 1999, 99: 2041-2047
- 347 Sirotnak FM, Chello PL, Dorick DM, Montgomery JA. Specificity of systems mediating transport of adenosine, 9-beta-d-arabinofuranosyl-2-fluoroadenine, and other purine nucleoside analogues in L1210 cells. *Cancer research* 1983, 43: 104-109
- 348 FitzGerald GA. Dipyridamole. *N Engl J Med* 1987, 316: 1247-1257
- 349 Sundaram M, Yao SY, Ng AM, Griffiths M, Cass CE, Baldwin SA, Young JD. Chimeric constructs between human and rat equilibrative nucleoside transporters (hENT1 and rENT1) reveal hENT1 structural domains interacting with coronary vasoactive drugs. *J Biol Chem* 1998, 273: 21519-21525
- 350 Gould KL, Martucci JP, Goldberg DI, Hess MJ, Edens RP, Latifi R, Dudrick SJ. Short-term cholesterol lowering decreases size and severity of perfusion abnormalities by positron emission tomography after dipyridamole in patients with coronary artery disease. A potential noninvasive marker of healing coronary endothelium. *Circulation* 1994, 89: 1530-1538
- 351 Lasley RD, Randhawa MP, Jr., Hegge JO, Mentzer RM. Effects of adenosine and acadesine on interstitial nucleosides and myocardial stunning in the pig. *Can J Physiol Pharmacol* 1999, 77: 259-267
- 352 Moser GH, Schrader J, Deussen A. Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* 1989, 256: C799-806
- 353 Hirschhorn R, Roegner V, Rubinstein A, Papageorgiou P. Plasma deoxyadenosine, adenosine, and erythrocyte deoxyATP are elevated at birth in an adenosine deaminase-deficient child. *J Clin Invest* 1980, 65: 768-771
- 354 McCann WP, Katholi RE. Control of artifacts in plasma adenosine determinations. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* 1990, 94: 314-319
- 355 Funaya H, Kitakaze M, Node K, Minamino T, Komamura K, Hori M. Plasma adenosine levels increase in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1997, 95: 1363-1365
- 356 Nees S, Herzog V, Becker BF, Bock M, Des Rosiers C, Gerlach E. The coronary endothelium: a highly active metabolic barrier for adenosine. *Basic Res Cardiol* 1985, 80: 515-529
- 357 Gamboa A, Ertl AC, Costa F, Farley G, Manier ML, Hachey DL, Diedrich A, *et al.* Blockade of nucleoside transport is required for delivery of intraarterial adenosine into the interstitium: relevance to therapeutic preconditioning in humans. *Circulation* 2003, 108: 2631-2635
- 358 Muller M. Science, medicine, and the future: Microdialysis. *BMJ (Clinical research ed)* 2002, 324: 588-591
- 359 Riksen NP, van Ginneken EE, van den Broek PH, Smits P, Rongen GA. In vivo evidence against a role for adenosine in the exercise pressor reflex in humans. *J Appl Physiol* 2005, 99: 522-527
- 360 Su C. Purinergic neurotransmission and neuromodulation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 1983, 23: 397-411
- 361 Chin JH. Adenosine receptors in brain: neuromodulation and role in epilepsy. *Annals of neurology* 1989, 26: 695-698
- 362 Marangos PJ, Boulenger JP. Basic and clinical aspects of adenosinergic neuromodulation. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 1985, 9: 421-430
- 363 Deckert J, Gleiter CH. Adenosine--an endogenous neuroprotective metabolite and neuromodulator. *Journal of neural transmission* 1994, 43: 23-31

- 364 Ribeiro JA. What can adenosine neuromodulation do for neuroprotection? *Current drug targets* 2005, 4: 325-329
- 365 Dong Q, Ginsberg HN, Erlanger BF. Overexpression of the A1 adenosine receptor in adipose tissue protects mice from obesity-related insulin resistance. *Diabetes, obesity & metabolism* 2001, 3: 360-366
- 366 Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, *et al.* Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98: 9983-9988
- 367 Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001, 414: 916-920
- 368 Avila MY, Stone RA, Civan MM. Knockout of A3 adenosine receptors reduces mouse intraocular pressure. *Investigative ophthalmology & visual science* 2002, 43: 3021-3026
- 369 Polosa R. Adenosine-receptor subtypes: their relevance to adenosine-mediated responses in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2002, 20: 488-496
- 370 Feoktistov I, Biaggioni I. Role of adenosine in asthma. *Drug development research* 1996, 39: 333-336
- 371 Fozard JR. The case for a role for adenosine in asthma: almost convincing? *Current opinion in pharmacology* 2003, 3: 264-269
- 372 Kohno Y, Ji X, Mawhorter SD, Koshiba M, Jacobson KA. Activation of A3 adenosine receptors on human eosinophils elevates intracellular calcium. *Blood* 1996, 88: 3569-3574
- 373 Merighi S, Mirandola P, Milani D, Varani K, Gessi S, Klotz KN, Leung E, *et al.* Adenosine receptors as mediators of both cell proliferation and cell death of cultured human melanoma cells. *The Journal of investigative dermatology* 2002, 119: 923-933
- 374 Gao Z, Li BS, Day YJ, Linden J. A3 adenosine receptor activation triggers phosphorylation of protein kinase B and protects rat basophilic leukemia 2H3 mast cells from apoptosis. *Molecular pharmacology* 2001, 59: 76-82
- 375 Minamino T, Kitakaze M, Morioka T, Node K, Komamura K, Takeda H, Inoue M, *et al.* Cardioprotection due to preconditioning correlates with increased ecto-5'-nucleotidase activity. *Am J Physiol* 1996, 270: H238-244
- 376 Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic signalling* 2006, 2: 351-360
- 377 Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, Colgan SP. Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* 2004, 200: 1395-1405
- 378 Linden J. Adenosine in tissue protection and tissue regeneration. *Mol Pharmacol* 2005, 67: 1385-1387
- 379 Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Islam N, Pinsky DJ, Sesti C, Levi R. Metabolic control of excessive extracellular nucleotide accumulation by CD39/ecto-nucleotidase-1: implications for ischemic vascular diseases. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 305: 9-16
- 380 Madara JL, Patapoff TW, Gillece-Castro B, Colgan SP, Parkos CA, Delp C, Mrsny RJ. 5'-adenosine monophosphate is the neutrophil-derived paracrine factor that elicits chloride secretion from T84 intestinal epithelial cell monolayers. *J Clin Invest* 1993, 91: 2320-2325
- 381 Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enyoji K, Robson SC, *et al.* Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med* 2003, 198: 783-796
- 382 Gendron FP, Benrezzak O, Krugh BW, Kong Q, Weisman GA, Beaudoin AR. Purine signaling and potential new therapeutic approach: possible outcomes of NTPDase inhibition. *Curr Drug Targets* 2002, 3: 229-245
- 383 Goodenough DA, Paul DL. Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4: 285-294
- 384 Eltzschig HK, Faigle M, Knapp S, Karhausen J, Ibla J, Rosenberger P, Odegard KC, *et al.* Endothelial catabolism of extracellular adenosine during hypoxia: the role of surface adenosine deaminase and CD26. *Blood* 2006, 108: 1602-1610
- 385 Biaggioni I, Onrot J, Hollister AS, Robertson D. Cardiovascular effects of adenosine infusion in man and their modulation by dipyridamole. *Life Sci* 1986, 39: 2229-2236
- 386 Smits P, Schouten J, Thien T. Cardiovascular effects of two xanthines and the relation to adenosine antagonism. *Clin Pharmacol Ther* 1989, 45: 593-599
- 387 Belloni FL, Belardinelli L, Halperin C, Hintze TH. An unusual receptor mediates adenosine-induced SA nodal bradycardia in dogs. *Am J Physiol* 1989, 256: H1553-1564
- 388 Biaggioni I, Olafsson B, Robertson RM, Hollister AS, Robertson D. Cardiovascular and respiratory effects of adenosine in conscious man. Evidence for chemoreceptor activation. *Circulation research* 1987, 61: 779-786

- 389 Sylven C, Jonzon B, Fredholm BB, Kaijser L. Adenosine injection into the brachial artery produces ischaemia like pain or discomfort in the forearm. *Cardiovasc Res* 1988, 22: 674-678
- 390 Smits P, Lenders JW, Thien T. Caffeine and theophylline attenuate adenosine-induced vasodilation in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1990, 48: 410-418
- 391 Smits P, Williams SB, Lipson DE, Banitt P, Rongen GA, Creager MA. Endothelial release of nitric oxide contributes to the vasodilator effect of adenosine in humans. *Circulation* 1995, 92: 2135-2141
- 392 Kemp BK, Cocks TM. Adenosine mediates relaxation of human small resistance-like coronary arteries via A2B receptors. *Br J Pharmacol* 1999, 126: 1796-1800
- 393 Lieu HD, Shryock JC, von Mering GO, Gordi T, Blackburn B, Olmsted AW, Belardinelli L, *et al.* Regadenoson, a selective A2A adenosine receptor agonist, causes dose-dependent increases in coronary blood flow velocity in humans. *J Nucl Cardiol* 2007, 14: 514-520
- 394 McCallion K, Harkin DW, Gardiner KR. Role of adenosine in immunomodulation: review of the literature. *Crit Care Med* 2004, 32: 273-277
- 395 Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, Zhao ZQ, *et al.* Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res* 2005, 67: 124-133
- 396 Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 285: H579-588
- 397 Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 285: H1797-1818
- 398 Rongen GA, Oyen WJ, Ramakers BP, Riksen NP, Boerman OC, Steinmetz N, Smits P. Annexin A5 scintigraphy of forearm as a novel in vivo model of skeletal muscle preconditioning in humans. *Circulation* 2005, 111: 173-178
- 399 Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC, Virmani R. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 1987, 76: 1135-1145
- 400 Vander Heide RS, Reimer KA. Effect of adenosine therapy at reperfusion on myocardial infarct size in dogs. *Cardiovasc Res* 1996, 31: 711-718
- 401 Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 1998, 274: R577-595
- 402 Marzilli M, Orsini E, Marraccini P, Testa R. Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. *Circulation* 2000, 101: 2154-2159
- 403 Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, DiCarli MF, Leeser MA, Browne KF, Eisenberg PR, *et al.* Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol* 1999, 34: 1711-1720
- 404 Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol* 2005, 45: 1775-1780
- 405 Kloner RA, Forman MB, Gibbons RJ, Ross AM, Alexander RW, Stone GW. Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AMISTAD-2 trial. *Eur Heart J* 2006, 27: 2400-2405
- 406 Mallet ML. Proarrhythmic effects of adenosine: a review of the literature. *Emerg Med J* 2004, 21: 408-410
- 407 Pijls NH, De Bruyne B, Bech GJ, Liistro F, Heyndrickx GR, Bonnier HJ, Koolen JJ. Coronary pressure measurement to assess the hemodynamic significance of serial stenoses within one coronary artery: validation in humans. *Circulation* 2000, 102: 2371-2377
- 408 Pelleg A, Kutalek SP. Adenosine in the mammalian heart: nothing to get excited about. *Trends in pharmacological sciences* 1997, 18: 236-238
- 409 Vinten-Johansen J, Thourani VH, Ronson RS, Jordan JE, Zhao ZQ, Nakamura M, Velez D, *et al.* Broad-spectrum cardioprotection with adenosine. *Ann Thorac Surg* 1999, 68: 1942-1948
- 410 Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacological reviews* 2001, 53: 527-552
- 411 Muller CE. Medicinal chemistry of adenosine A3 receptor ligands. *Curr Top Med Chem* 2003, 3: 445-462
- 412 Drury AN, Szent-Gyorgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *The Journal of physiology* 1929, 68: 213-237
- 413 Stahl WL, Sattin A, McIlwain H. Separation of adenosine diphosphate--adenosine triphosphate-exchange activity from the cerebral microsomal sodium-plus-potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase. *The Biochemical journal* 1966, 99: 404-412

- 414 Cobbin LB, Einstein R, Maguire MH. Studies on the coronary dilator actions of some adenosine analogues. *Br J Pharmacol* 1974, 50: 25-33
- 415 Blume AJ, Dalton C, Sheppard H. Adenosine-mediated elevation of cyclic 3':5'-adenosine monophosphate concentrations in cultured mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1973, 70: 3099-3102
- 416 Burnstock G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. Ed(s) BOLIS, L., STRAUB, R.W., Raven Press ed. New York 1978: pp. 107-118
- 417 van Calker D, Muller M, Hamprecht B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Journal of neurochemistry* 1979, 33: 999-1005
- 418 Londos C, Cooper DM, Wolff J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1980, 77: 2551-2554
- 419 Longabaugh JP, Didsbury J, Spiegel A, Stiles GL. Modification of the rat adipocyte A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system during chronic exposure to an A1 adenosine receptor agonist: alterations in the quantity of GS alpha and Gi alpha are not associated with changes in their mRNAs. *Molecular pharmacology* 1989, 36: 681-688
- 420 Daly JW, Butts-Lamb P, Padgett W. Subclasses of adenosine receptors in the central nervous system: interaction with caffeine and related methylxanthines. *Cellular and molecular neurobiology* 1983, 3: 69-80
- 421 Beukers MW, den Dulk H, van Tilburg EW, Brouwer J, Ijzerman AP. Why are A(2B) receptors low-affinity adenosine receptors? Mutation of Asn273 to Tyr increases affinity of human A(2B) receptor for 2-(1-Hexynyl)adenosine. *Molecular pharmacology* 2000, 58: 1349-1356
- 422 Zhou QY, Li C, Olah ME, Johnson RA, Stiles GL, Civelli O. Molecular cloning and characterization of an adenosine receptor: the A3 adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89: 7432-7436
- 423 Salvatore CA, Jacobson MA, Taylor HE, Linden J, Johnson RG. Molecular cloning and characterization of the human A3 adenosine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993, 90: 10365-10369
- 424 Kull B, Arslan G, Nilsson C, Owman C, Lorenzen A, Schwabe U, Fredholm BB. Differences in the order of potency for agonists but not antagonists at human and rat adenosine A2A receptors. *Biochemical pharmacology* 1999, 57: 65-75
- 425 Fredholm BB, Arslan G, Halldner L, Kull B, Schulte G, Wasserman W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2000, 362: 364-374
- 426 Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* 2006, 147 Suppl 1: S46-55
- 427 Cordeaux Y, Bridson SJ, Megson AE, McDonnell J, Dickenson JM, Hill SJ. Influence of receptor number on functional responses elicited by agonists acting at the human adenosine A(1) receptor: evidence for signaling pathway-dependent changes in agonist potency and relative intrinsic activity. *Molecular pharmacology* 2000, 58: 1075-1084
- 428 Cordeaux Y, Ijzerman AP, Hill SJ. Coupling of the human A1 adenosine receptor to different heterotrimeric G proteins: evidence for agonist-specific G protein activation. *Br J Pharmacol* 2004, 143: 705-714
- 429 Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *Faseb J* 1990, 4: 2881-2889
- 430 Palmer TM, Stiles GL. Identification of an A2a adenosine receptor domain specifically responsible for mediating short-term desensitization. *Biochemistry* 1997, 36: 832-838
- 431 Perez DM, Karnik SS. Multiple signaling states of G-protein-coupled receptors. *Pharmacological reviews* 2005, 57: 147-161
- 432 Falleni A, Trincavelli ML, Macchia M, Salvetti F, Hamdan M, Calvani F, Gremigni V, *et al.* A(1) adenosine receptors in human neutrophils: direct binding and electron microscope visualization. *Journal of cellular biochemistry* 1999, 75: 235-244
- 433 Macchia M, Salvetti F, Bertini S, Di Bussolo V, Gattuso L, Gesi M, Hamdan M, *et al.* 7-Nitrobenzofurazan (NBD) derivatives of 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) as new fluorescent probes for human A(3) adenosine receptors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2001, 11: 3023-3026
- 434 Mundell SJ, Kelly E. Evidence for co-expression and desensitization of A2a and A2b adenosine receptors in NG108-15 cells. *Biochemical pharmacology* 1998, 55: 595-603
- 435 Klaasse EC, Ijzerman AP, de Grip WJ, Beukers MW. Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic signalling* 2008, 4: 21-37
- 436 Dixon AK, Gubitza AK, Sirinathsinghji DJ, Richardson PJ, Freeman TC. Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat. *Br J Pharmacol* 1996, 118: 1461-1468
- 437 Reichelt ME, Willems L, Molina JG, Sun CX, Noble JC, Ashton KJ, Schnermann J, *et al.* Genetic deletion of the A1 adenosine receptor limits myocardial ischemic tolerance. *Circulation research* 2005, 96: 363-367

- 438 Morrison RR, Teng B, Oldenburg PJ, Katwa LC, Schnermann JB, Mustafa SJ. Effects of targeted deletion of A1 adenosine receptors on postischemic cardiac function and expression of adenosine receptor subtypes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, 291: H1875-1882
- 439 Cerniway RJ, Morrison RR, Byford AM, Lankford AR, Headrick JP, Van Wylen DG, Matherne GP. A1 adenosine receptor overexpression decreases stunning from anoxia-reoxygenation: role of the mitochondrial K(ATP) channel. *Basic Res Cardiol* 2002, 97: 232-238
- 440 Headrick JP, Willems L, Ashton KJ, Holmgren K, Peart J, Matherne GP. Ischaemic tolerance in aged mouse myocardium: the role of adenosine and effects of A1 adenosine receptor overexpression. *The Journal of physiology* 2003, 549: 823-833
- 441 Lee HT, Xu H, Nasr SH, Schnermann J, Emala CW. A1 adenosine receptor knockout mice exhibit increased renal injury following ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004, 286: F298-306
- 442 Lange-Asschenfeldt C, Raval AP, Dave KR, Mochly-Rosen D, Sick TJ, Perez-Pinzon MA. Epsilon protein kinase C mediated ischemic tolerance requires activation of the extracellular regulated kinase pathway in the organotypic hippocampal slice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004, 24: 636-645
- 443 Zablocki JA, Wu L, Shryock J, Belardinelli L. Partial A(1) adenosine receptor agonists from a molecular perspective and their potential use as chronic ventricular rate control agents during atrial fibrillation (AF). *Curr Top Med Chem* 2004, 4: 839-854
- 444 Maemoto T, Tada M, Mihara T, Ueyama N, Matsuoka H, Harada K, Yamaji T, *et al.* Pharmacological characterization of FR194921, a new potent, selective, and orally active antagonist for central adenosine A1 receptors. *J Pharmacol Sci* 2004, 96: 42-52
- 445 Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, *et al.* Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98: 9407-9412
- 446 Giffin NJ, Kowacs F, Libri V, Williams P, Goadsby PJ, Kaube H. Effect of the adenosine A1 receptor agonist GR79236 on trigeminal nociception with blink reflex recordings in healthy human subjects. *Cephalalgia* 2003, 23: 287-292
- 447 Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2 receptors that promote chemotaxis and inhibit O2 generation, respectively. *J Clin Invest* 1990, 85: 1150-1157
- 448 Sun CX, Young HW, Molina JG, Volmer JB, Schnermann J, Blackburn MR. A protective role for the A1 adenosine receptor in adenosine-dependent pulmonary injury. *J Clin Invest* 2005, 115: 35-43
- 449 Jarvis MF, Jackson RH, Williams M. Autoradiographic characterization of high-affinity adenosine A2 receptors in the rat brain. *Brain Res* 1989, 484: 111-118
- 450 Gessi S, Varani K, Merighi S, Ongini E, Borea PA. A(2A) adenosine receptors in human peripheral blood cells. *Br J Pharmacol* 2000, 129: 2-11
- 451 Belardinelli L, Shryock JC, Snowdy S, Zhang Y, Monopoli A, Lozza G, Ongini E, *et al.* The A2A adenosine receptor mediates coronary vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther* 1998, 284: 1066-1073
- 452 Varani K, Portaluppi F, Gessi S, Merighi S, Ongini E, Belardinelli L, Borea PA. Dose and time effects of caffeine intake on human platelet adenosine A(2A) receptors : functional and biochemical aspects. *Circulation* 2000, 102: 285-289
- 453 Maddock HL, Broadley KJ, Bril A, Khandoudi N. Role of endothelium in ischaemia-induced myocardial dysfunction of isolated working hearts: cardioprotection by activation of adenosine A(2A) receptors. *Journal of autonomic pharmacology* 2001, 21: 263-271
- 454 Jordan JE, Zhao ZQ, Sato H, Taft S, Vinten-Johansen J. Adenosine A2 receptor activation attenuates reperfusion injury by inhibiting neutrophil accumulation, superoxide generation and coronary endothelial adherence. *J Pharmacol Exp Ther* 1997, 280: 301-309
- 455 Zhao L, Eghbali-Webb M. Release of pro- and anti-angiogenic factors by human cardiac fibroblasts: effects on DNA synthesis and protection under hypoxia in human endothelial cells. *Biochimica et biophysica acta* 2001, 1538: 273-282
- 456 Cronstein BN. Adenosine, an endogenous anti-inflammatory agent. *J Appl Physiol* 1994, 76: 5-13
- 457 Cronstein BN, Haines KA. Stimulus-response uncoupling in the neutrophil. Adenosine A2-receptor occupancy inhibits the sustained, but not the early, events of stimulus transduction in human neutrophils by a mechanism independent of actin-filament formation. *The Biochemical journal* 1992, 281 (Pt 3): 631-635
- 458 Fredholm BB, Zhang Y, van der Ploeg I. Adenosine A2A receptors mediate the inhibitory effect of adenosine on formyl-Met-Leu-Phe-stimulated respiratory burst in neutrophil leucocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 1996, 354: 262-267
- 459 Suzuki H, Takei M, Nakahata T, Fukamachi H. Inhibitory effect of adenosine on degranulation of human cultured mast cells upon cross-linking of Fc epsilon RI. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 242: 697-702

- 460 Lukashev D, Ohta A, Sitkovsky M. Targeting hypoxia--A(2A) adenosine receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Drug Discov Today* 2004, 9: 403-409
- 461 Sullivan GW, Rieger JM, Scheld WM, Macdonald TL, Linden J. Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexyl adenosine A(2A) receptor agonists. *Br J Pharmacol* 2001, 132: 1017-1026
- 462 Toufektsian MC, Yang Z, Prasad KM, Overbergh L, Ramos SI, Mathieu C, Linden J, *et al.* Stimulation of A2A-adenosine receptors after myocardial infarction suppresses inflammatory activation and attenuates contractile dysfunction in the remote left ventricle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, 290: H1410-1418
- 463 Lasley RD, Smart EJ. Cardiac myocyte adenosine receptors and caveolae. *Trends in cardiovascular medicine* 2001, 11: 259-263
- 464 Funakoshi H, Zacharia LC, Tang Z, Zhang J, Lee LL, Good JC, Herrmann DE, *et al.* A1 adenosine receptor upregulation accompanies decreasing myocardial adenosine levels in mice with left ventricular dysfunction. *Circulation* 2007, 115: 2307-2315
- 465 Lasley RD, Kristo G, Keith BJ, Mentzer RM, Jr. The A2a/A2b receptor antagonist ZM-241385 blocks the cardioprotective effect of adenosine agonist pretreatment in in vivo rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007, 292: H426-431
- 466 Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, *et al.* Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A2a receptor. *Nature* 1997, 388: 674-678
- 467 El Yacoubi M, Ledent C, Parmentier M, Daoust M, Costentin J, Vaugeois J. Absence of the adenosine A(2A) receptor or its chronic blockade decrease ethanol withdrawal-induced seizures in mice. *Neuropharmacology* 2001, 40: 424-432
- 468 Chen JF, Huang Z, Ma J, Zhu J, Moratalla R, Standaert D, Moskowitz MA, *et al.* A(2A) adenosine receptor deficiency attenuates brain injury induced by transient focal ischemia in mice. *J Neurosci* 1999, 19: 9192-9200
- 469 Monopoli A, Lozza G, Forlani A, Mattavelli A, Ongini E. Blockade of adenosine A2A receptors by SCH 58261 results in neuroprotective effects in cerebral ischaemia in rats. *Neuroreport* 1998, 9: 3955-3959
- 470 Aden U, Halldner L, Lagercrantz H, Dalmau I, Ledent C, Fredholm BB. Aggravated brain damage after hypoxic ischemia in immature adenosine A2A knockout mice. *Stroke* 2003, 34: 739-744
- 471 Day YJ, Huang L, Ye H, Linden J, Okusa MD. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005, 288: F722-731
- 472 Huang ZL, Qu WM, Eguchi N, Chen JF, Schwarzschild MA, Fredholm BB, Urade Y, *et al.* Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nat Neurosci* 2005, 8: 858-859
- 473 Feoktistov I, Biaggioni I. Adenosine A2B receptors. *Pharmacological reviews* 1997, 49: 381-402
- 474 Stehle JH, Rivkees SA, Lee JJ, Weaver DR, Deeds JD, Reppert SM. Molecular cloning and expression of the cDNA for a novel A2-adenosine receptor subtype. *Mol Endocrinol* 1992, 6: 384-393
- 475 Yang D, Zhang Y, Nguyen HG, Koupenova M, Chauhan AK, Makitalo M, Jones MR, *et al.* The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion. *J Clin Invest* 2006, 116: 1913-1923
- 476 Xu Y, Ravid K, Smith BD. Major histocompatibility class II transactivator expression in smooth muscle cells from A2b adenosine receptor knock-out mice: cross-talk between the adenosine and interferon-gamma signaling. *J Biol Chem* 2008, 283: 14213-14220
- 477 Vitzthum H, Weiss B, Bachleitner W, Kramer BK, Kurtz A. Gene expression of adenosine receptors along the nephron. *Kidney Int* 2004, 65: 1180-1190
- 478 Cooper J, Hill SJ, Alexander SP. An endogenous A2B adenosine receptor coupled to cyclic AMP generation in human embryonic kidney (HEK 293) cells. *Br J Pharmacol* 1997, 122: 546-550
- 479 Auchampach JA, Jin X, Wan TC, Caughey GH, Linden J. Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A3 receptor and evidence that degranulation is mediated by the A2B receptor. *Molecular pharmacology* 1997, 52: 846-860
- 480 Holgate ST. The Quintiles Prize Lecture 2004. The identification of the adenosine A2B receptor as a novel therapeutic target in asthma. *Br J Pharmacol* 2005, 145: 1009-1015
- 481 Harada H, Asano O, Hoshino Y, Yoshikawa S, Matsukura M, Kabasawa Y, Nijima J, *et al.* 2-Alkynyl-8-aryl-9-methyladenines as novel adenosine receptor antagonists: their synthesis and structure-activity relationships toward hepatic glucose production induced via agonism of the A(2B) receptor. *Journal of medicinal chemistry* 2001, 44: 170-179
- 482 Zhong H, Belardinelli L, Maa T, Zeng D. Synergy between A2B adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005, 32: 2-8
- 483 Xaus J, Mirabet M, Lloberas J, Soler C, Lluís C, Franco R, Celada A. IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation. *J Immunol* 1999, 162: 3607-3614

- 484 Wakeno M, Minamino T, Seguchi O, Okazaki H, Tsukamoto O, Okada K, Hirata A, *et al.* Long-term stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. *Circulation* 2006, 114: 1923-1932
- 485 Dubey RK, Gillespie DG, Zacharia LC, Mi Z, Jackson EK. A(2b) receptors mediate the antimitogenic effects of adenosine in cardiac fibroblasts. *Hypertension* 2001, 37: 716-721
- 486 Linden J. Cloned adenosine A3 receptors: pharmacological properties, species differences and receptor functions. *Trends in pharmacological sciences* 1994, 15: 298-306
- 487 Gessi S, Merighi S, Varani K, Leung E, Mac Lennan S, Borea PA. The A3 adenosine receptor: an enigmatic player in cell biology. *Pharmacol Ther* 2008, 117: 123-140
- 488 Dougherty C, Barucha J, Schofield PR, Jacobson KA, Liang BT. Cardiac myocytes rendered ischemia resistant by expressing the human adenosine A1 or A3 receptor. *Faseb J* 1998, 12: 1785-1792
- 489 Headrick JP, Peart J. A3 adenosine receptor-mediated protection of the ischemic heart. *Vascul Pharmacol* 2005, 42: 271-279
- 490 Carr CS, Hill RJ, Masamune H, Kennedy SP, Knight DR, Tracey WR, Yellon DM. Evidence for a role for both the adenosine A1 and A3 receptors in protection of isolated human atrial muscle against simulated ischaemia. *Cardiovasc Res* 1997, 36: 52-59
- 491 Auchampach JA, Rizvi A, Qiu Y, Tang XL, Maldonado C, Teschner S, Bolli R. Selective activation of A3 adenosine receptors with N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methyluronamide protects against myocardial stunning and infarction without hemodynamic changes in conscious rabbits. *Circulation research* 1997, 80: 800-809
- 492 Tracey WR, Magee WP, Oleynek JJ, Hill RJ, Smith AH, Flynn DM, Knight DR. Novel N6-substituted adenosine 5'-N-methyluronamides with high selectivity for human adenosine A3 receptors reduce ischemic myocardial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 285: H2780-2787
- 493 Auchampach JA, Ge ZD, Wan TC, Moore J, Gross GJ. A3 adenosine receptor agonist IB-MECA reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 285: H607-613
- 494 Cross HR, Murphy E, Black RG, Auchampach J, Steenbergen C. Overexpression of A(3) adenosine receptors decreases heart rate, preserves energetics, and protects ischemic hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, 283: H1562-1568
- 495 Black RG, Jr., Guo Y, Ge ZD, Murphree SS, Prabhu SD, Jones WK, Bolli R, *et al.* Gene dosage-dependent effects of cardiac-specific overexpression of the A3 adenosine receptor. *Circulation research* 2002, 91: 165-172
- 496 Guo Y, Bolli R, Bao W, Wu WJ, Black RG, Jr., Murphree SS, Salvatore CA, *et al.* Targeted deletion of the A3 adenosine receptor confers resistance to myocardial ischemic injury and does not prevent early preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 2001, 33: 825-830
- 497 Cerniway RJ, Yang Z, Jacobson MA, Linden J, Matherne GP. Targeted deletion of A(3) adenosine receptors improves tolerance to ischemia-reperfusion injury in mouse myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001, 281: H1751-1758
- 498 Lu Z, Fassett J, Xu X, Hu X, Zhu G, French J, Zhang P, *et al.* Adenosine A3 Receptor Deficiency Exerts Unanticipated Protective Effects on the Pressure-Overloaded Left Ventricle. *Circulation* 2008,
- 499 Shneyvays V, Nawrath H, Jacobson KA, Shainberg A. Induction of apoptosis in cardiac myocytes by an A3 adenosine receptor agonist. *Experimental cell research* 1998, 243: 383-397
- 500 Harrison GJ, Cerniway RJ, Peart J, Berr SS, Ashton K, Regan S, Paul Matherne G, *et al.* Effects of A(3) adenosine receptor activation and gene knock-out in ischemic-reperfused mouse heart. *Cardiovasc Res* 2002, 53: 147-155
- 501 Ge ZD, Peart JN, Kreckler LM, Wan TC, Jacobson MA, Gross GJ, Auchampach JA. Cl-IB-MECA [2-chloro-N6-(3-iodobenzyl)adenosine-5'-N-methylcarboxamide] reduces ischemia/reperfusion injury in mice by activating the A3 adenosine receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 2006, 319: 1200-1210
- 502 Wagner DR, McTiernan C, Sanders VJ, Feldman AM. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced secretion of tumor necrosis factor-alpha in the failing human heart. *Circulation* 1998, 97: 521-524
- 503 Wagner DR, Kubota T, Sanders VJ, McTiernan CF, Feldman AM. Differential regulation of cardiac expression of IL-6 and TNF-alpha by A2- and A3-adenosine receptors. *Am J Physiol* 1999, 276: H2141-2147
- 504 Ramkumar V, Stiles GL, Beaven MA, Ali H. The A3 adenosine receptor is the unique adenosine receptor which facilitates release of allergic mediators in mast cells. *J Biol Chem* 1993, 268: 16887-16890
- 505 Zhong H, Shlykov SG, Molina JG, Sanborn BM, Jacobson MA, Tilley SL, Blackburn MR. Activation of murine lung mast cells by the adenosine A3 receptor. *J Immunol* 2003, 171: 338-345
- 506 Feoktistov I, Ryzhov S, Goldstein AE, Biaggioni I. Mast cell-mediated stimulation of angiogenesis: cooperative interaction between A2B and A3 adenosine receptors. *Circulation research* 2003, 92: 485-492
- 507 Meade CJ, Dumont I, Worrall L. Why do asthmatic subjects respond so strongly to inhaled adenosine? *Life Sci* 2001, 69: 1225-1240

- 508 Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, Dentener MA, Voitenok NN, van den Wildenberg FA, Buurman WA. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J Immunol* 1997, 158: 5400-5408
- 509 Salvatore CA, Tilley SL, Latour AM, Fletcher DS, Koller BH, Jacobson MA. Disruption of the A(3) adenosine receptor gene in mice and its effect on stimulated inflammatory cells. *J Biol Chem* 2000, 275: 4429-4434
- 510 Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, *et al.* ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006, 314: 1792-1795
- 511 Lee HT, Ota-Setlik A, Xu H, D'Agati VD, Jacobson MA, Emala CW. A3 adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia- and myoglobinuria-induced renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003, 284: F267-273
- 512 Rivo J, Zeira E, Galun E, Matot I. Activation of A3 adenosine receptor provides lung protection against ischemia-reperfusion injury associated with reduction in apoptosis. *Am J Transplant* 2004, 4: 1941-1948
- 513 Linden J, Taylor HE, Robeva AS, Tucker AL, Stehle JH, Rivkees SA, Fink JS, *et al.* Molecular cloning and functional expression of a sheep A3 adenosine receptor with widespread tissue distribution. *Molecular pharmacology* 1993, 44: 524-532
- 514 Jacobson KA, Nikodijevic O, Shi D, Gallo-Rodriguez C, Olah ME, Stiles GL, Daly JW. A role for central A3-adenosine receptors. Mediation of behavioral depressant effects. *FEBS Lett* 1993, 336: 57-60
- 515 Von Lubitz DK, Lin RC, Popik P, Carter MF, Jacobson KA. Adenosine A3 receptor stimulation and cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 1994, 263: 59-67
- 516 Kim SG, Ravi G, Hoffmann C, Jung YJ, Kim M, Chen A, Jacobson KA. p53-Independent induction of Fas and apoptosis in leukemic cells by an adenosine derivative, Cl-IB-MECA. *Biochemical pharmacology* 2002, 63: 871-880
- 517 Rouy D, Ernens I, Jeanty C, Wagner DR. Plasma storage at -80 degrees C does not protect matrix metalloproteinase-9 from degradation. *Anal Biochem* 2005, 338: 294-298
- 518 Merighi S, Benini A, Mirandola P, Gessi S, Varani K, Leung E, MacLennan S, *et al.* A3 adenosine receptors modulate hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human A375 melanoma cells. *Neoplasia* 2005, 7: 894-903
- 519 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. *Anal Biochem* 1994, 218: 325-329
- 520 Trahtenberg U, Atallah M, Krispin A, Verbovetski I, Mevorach D. Calcium, leukocyte cell death and the use of annexin V: fatal encounters. *Apoptosis* 2007, 12: 1769-1780
- 521 Spinale FG, Coker ML, Heung LJ, Bond BR, Gunasinghe HR, Etoh T, Goldberg AT, *et al.* A matrix metalloproteinase induction/activation system exists in the human left ventricular myocardium and is upregulated in heart failure. *Circulation* 2000, 102: 1944-1949
- 522 Chen J, Tung CH, Allport JR, Chen S, Weissleder R, Huang PL. Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after myocardial infarction. *Circulation* 2005, 111: 1800-1805
- 523 Barnes CR, Mandell GL, Carper HT, Luong S, Sullivan GW. Adenosine modulation of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil activation. *Biochemical pharmacology* 1995, 50: 1851-1857
- 524 Olson MW, Bernardo MM, Pietila M, Gervasi DC, Toth M, Kotra LP, Massova I, *et al.* Characterization of the monomeric and dimeric forms of latent and active matrix metalloproteinase-9. Differential rates for activation by stromelysin 1. *J Biol Chem* 2000, 275: 2661-2668
- 525 Takahashi C, Sheng Z, Horan TP, Kitayama H, Maki M, Hitomi K, Kitaura Y, *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95: 13221-13226
- 526 Sexl V, Mancusi G, Holler C, Gloria-Maercker E, Schutz W, Freissmuth M. Stimulation of the mitogen-activated protein kinase via the A2A-adenosine receptor in primary human endothelial cells. *J Biol Chem* 1997, 272: 5792-5799
- 527 Powers KA, Szaszi K, Khadaroo RG, Tawadros PS, Marshall JC, Kapus A, Rotstein OD. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med* 2006, 203: 1951-1961
- 528 Murphree LJ, Marshall MA, Rieger JM, MacDonald TL, Linden J. Human A(2A) adenosine receptors: high-affinity agonist binding to receptor-G protein complexes containing Gbeta(4). *Molecular pharmacology* 2002, 61: 455-462
- 529 Tintinger G, Steel HC, Anderson R. Taming the neutrophil: calcium clearance and influx mechanisms as novel targets for pharmacological control. *Clin Exp Immunol* 2005, 141: 191-200
- 530 Visser SS, Theron AJ, Ramafi G, Ker JA, Anderson R. Apparent involvement of the A(2A) subtype adenosine receptor in the anti-inflammatory interactions of CGS 21680, cyclopentyladenosine, and IB-MECA with human neutrophils. *Biochemical pharmacology* 2000, 60: 993-999

- 531 Zhao P, Li XG, Yang M, Shao Q, Wang D, Liu S, Song H, *et al.* Hypoxia suppresses the production of MMP-9 by human monocyte-derived dendritic cells and requires activation of adenosine receptor A(2b) via cAMP/PKA signaling pathway. *Molecular immunology* 2008, 45: 2187-2195
- 532 Trincavelli ML, Tuscano D, Cecchetti P, Falleni A, Benzi L, Klotz KN, Gremigni V, *et al.* Agonist-induced internalization and recycling of the human A(3) adenosine receptors: role in receptor desensitization and resensitization. *Journal of neurochemistry* 2000, 75: 1493-1501
- 533 Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Ikeuchi M, Matsusaka H, Suematsu N, Wen J, *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2003, 108: 2134-2140
- 534 Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 2006, 211: 609-618
- 535 Najjar HM, Ruhl S, Bru-Capdeville AC, Peters JH. Adenosine and its derivatives control human monocyte differentiation into highly accessory cells versus macrophages. *J Leukoc Biol* 1990, 47: 429-439
- 536 Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nature reviews* 2004, 3: 401-416
- 537 Garratt KN, Holmes DR, Jr., Molina-Viamonte V, Reeder GS, Hodge DO, Bailey KR, Lobl JK, *et al.* Intravenous adenosine and lidocaine in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1998, 136: 196-204
- 538 Leesar MA, Stoddard M, Ahmed M, Broadbent J, Bolli R. Preconditioning of human myocardium with adenosine during coronary angioplasty. *Circulation* 1997, 95: 2500-2507
- 539 Tang Z, Diamond MA, Chen JM, Holly TA, Bonow RO, Dasgupta A, Hyslop T, *et al.* Polymorphisms in adenosine receptor genes are associated with infarct size in patients with ischemic cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2007, 82: 435-440
- 540 Safran N, Shneyvays V, Balas N, Jacobson KA, Nawrath H, Shainberg A. Cardioprotective effects of adenosine A1 and A3 receptor activation during hypoxia in isolated rat cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* 2001, 217: 143-152
- 541 Tourneur L, Mistou S, Schmitt A, Chiocchia G. Adenosine receptors control a new pathway of Fas-associated death domain protein expression regulation by secretion. *J Biol Chem* 2008, 283: 17929-17938
- 542 Villareal FJ, Griffin M, Omens J, Dillmann W, Nguyen J, Covell J. Early short-term treatment with doxycycline modulates postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation* 2003, 108: 1487-1492
- 543 Yarbrough WM, Mukherjee R, Escobar GP, Mingoia JT, Sample JA, Hendrick JW, Dowdy KB, *et al.* Selective targeting and timing of matrix metalloproteinase inhibition in post-myocardial infarction remodeling. *Circulation* 2003, 108: 1753-1759

ANNEXES

Adenosine Inhibits Matrix Metalloproteinase-9 Secretion By Neutrophils

Implication of A2a Receptor and cAMP/PKA/Ca²⁺ Pathway

Isabelle Ernens, Didier Rouy, Emilie Velot, Yvan Devaux, Daniel R. Wagner

Abstract—Matrix metalloproteinases (MMPs), and in particular MMP-9 secreted by neutrophils, are capable of degrading the matrix components of the heart and are thought to be the driving force behind myocardial matrix remodeling after infarction. Adenosine, a naturally produced nucleoside, has been shown to have cardioprotective effects and to inhibit secretion of various cytokines. The aim of our study was to determine the effect of adenosine on the secretion of MMP-9 by neutrophils. Neutrophils were isolated from healthy volunteers through Ficoll and Dextran sedimentation. Neutrophils were activated by *N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) in the presence or absence of adenosine or adenosine analogs. Zymography and enzyme linked immunosorbent assay were used to measure MMP-9 secretion. Adenosine (1 μ mol/L) decreased the fMLP-induced MMP-9 secretion by $30 \pm 2\%$ ($n=8$, $P<0.001$). The effect was dose-dependent and was not specific to fMLP because adenosine also inhibited MMP-9 secretion by LPS- or H₂O₂-stimulated neutrophils. The effect of adenosine was mimicked by the adenosine A2a receptor agonist CGS21680 and was inhibited by both the A2a antagonist SCH5826 and A2a RNA silencing. The A3 agonist IB-MECA moderately decreased fMLP-induced MMP-9 secretion. Agonists and antagonists of the other types of adenosine receptors had no significant effect. Adenosine increased intracellular cAMP concentration and accelerated the return to baseline of the intracytoplasmic calcium peak. The inhibition of MMP-9 secretion by adenosine, as well as the calcium effect, was prevented by the protein kinase A inhibitor H-89. In conclusion, we show here that adenosine inhibits MMP-9 secretion by neutrophils. Our results suggest that this effect implies the A2a receptor and is mediated through the cAMP/PKA/Ca²⁺ pathway. Therefore, adenosine may represent a new approach to prevent matrix degradation and remodeling after myocardial injury. (*Circ Res*. 2006;99:590-597.)

Key Words: adenosine ■ neutrophils ■ myocardial remodeling ■ protein kinase A ■ matrix metalloproteinase-9

Despite reperfusion therapy with thrombolysis or percutaneous intervention, the development of left ventricular remodeling and heart failure after myocardial infarction has not significantly decreased and remains associated with a more than 10-fold elevated risk of death.¹ Enhanced activity of matrix metalloproteinases (MMPs) and in particular MMP-9 after infarction breaks down collagen contributing to myocyte slippage and ventricular remodeling. Recent observations² and the Framingham study have shown that levels of MMP-9 are elevated after myocardial infarction both in the acute and chronic phases.³ We have identified MMP-9 as a risk marker for the development of left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction.⁴

Animal studies have shown that ventricular remodeling after infarction can be attenuated through the use of MMPs inhibitors.⁵⁻⁷ However, recent results from the PREMIER (Prevention of Myocardial Infarction Early Remodeling) trial failed to demonstrate a beneficial effect of MMP inhibition

on left ventricular remodeling after myocardial infarction.⁸ Therefore, understanding the cellular and molecular triggers of MMPs expression is of major interest to understand and possibly modify the remodeling process.

The nucleoside adenosine (Ado) is formed in the myocardium through dephosphorylation of AMP when there is an imbalance between tissue oxygen supply and demand which occurs in the setting of acute myocardial infarction and congestive heart failure. Multiple lines of evidence have shown that Ado protects against ischemia/reperfusion injury.⁹ In animals and in humans, Ado can reduce infarct size and improve coronary flow.¹⁰ We have shown that Ado inhibits the expression of TNF- α in the rat and failing human heart.^{11,12} However, the effect of Ado on enzymes participating in extracellular matrix degradation has not been studied.

As high levels of MMP-9 are associated with a deleterious outcome after myocardial infarction, the aim of the present study was to investigate the effect of Ado on the expression

Original received February 20, 2006; resubmission received July 6, 2006; revised resubmission received August 1, 2006; accepted August 8, 2006.

From the Laboratory of Cardiovascular Research (I.E., D.R., E.V., Y.D.), CRP-Santé, Luxembourg; and the Division of Cardiology (D.R.W.), Centre Hospitalier Luxembourg.

Correspondence to Daniel R. Wagner, Division of Cardiology, Centre Hospitalier Luxembourg, 4 rue Barblé, L1210 Luxembourg. E-mail wagner.daniel@chl.lu

© 2006 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <http://circres.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/01.RES.0000241428.82502.d4

and secretion of MMP-9. Using near-infrared fluorescent imaging, Chen et al have elegantly demonstrated that infiltrating neutrophils are the likely source of MMP-9 activity early after infarction.¹³ Therefore, we used isolated neutrophils to study the effect of Ado and Ado analogs on MMP-9. Taken together, our results suggest that pharmacological inhibition of MMP-9 through Ado may favor the stabilization of the extracellular matrix after myocardial infarction.

Materials and Methods

An expanded Materials and Methods section can be found in the supplement available at <http://circres.ahajournals.org>.

Cell Culture

Neutrophils from healthy donors were isolated from heparinized blood by Ficoll-Hypaque (ICN) centrifugation followed by dextran sedimentation (Amersham, Rosendaal, Netherlands). Purity of the cell preparations was >93% as determined with a BD FACSCanto flow cytometer (Beckton Dickinson, Erembodegem, Belgium) using anti-CD16 for neutrophils (Immunotools, Friesoythe, Germany). Cell viability, as determined by trypan blue exclusion, was >98%. Purified neutrophils were resuspended at a density of 0.5×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium containing L-glutamine (Cambrex, Verviers, Belgium) and supplemented with nonessential amino acids and sodium pyruvate. One mL of the cell suspension was seeded per well into 24-well plates. Cells were allowed to rest for 2 hours at 37°C-5% CO₂. If indicated, neutrophils were primed with TNF- α (10 U/mL) for 15 minutes before preincubation. Cells were preincubated for 5 minutes with Ado (0.01 to 25 μ mol/L), Ado receptors agonists (0.1 to 100 nmol/L), or Ado receptors antagonists (1 to 100 nmol/L) as needed. Then fMLP (10^{-7} mol/L), LPS (10 ng/mL), or H₂O₂ (10 mmol/L) were added and cells were incubated for another 15 minutes (H₂O₂ and fMLP), or 2 hours for conditions with LPS. For experiments involving siRNAs, neutrophils were transfected using the Nucleofection technology (Amaxa, Cologne, Germany): 1.4 μ g of each siRNA was transfected into 1×10^6 cells following the manufacturer's recommendations. Controls underwent the same transfection procedure. Cells were incubated for 48 hours before treatments with Ado and fMLP.

Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained by Ficoll gradient using the Monocyte Isolation Kit II from Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Germany). Purity was estimated by flow cytometry with anti-CD14-PE (monocytes/macrophages), anti-CD13-APC (monocytes and granulocytes), anti-CD20-PE Cy7 (B cells), anti-CD27-FITC (T cells), CD34-PerCP (bone marrow-derived progenitor cells), and anti-CD45-APC Cy7 (leukocytes). Purity was typically above 93%. Monocytes were cultured in RPMI 1640 containing L-Glutamine, sodium pyruvate, nonessential amino acids, penicillin/streptomycin, and 1% fetal calf serum. Differentiation was achieved with 50 ng/mL macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) for 7 days. Cells were then preincubated with 10 μ mol/L Ado and 10 μ mol/L erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)-adenine hydrochloride (EHNA, an adenosine deaminase inhibitor) for 15 minutes before activation with 100 ng/mL LPS for 24 hours.

For all cells, conditioned medium was collected, mixed with bovine serum albumin (0.2% final concentration) and protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany), and centrifuged at 600g for 5 minutes, 4°C. Cell-free supernatants were stored at -20°C until use.

Analysis of Gelatinase Activity

Gelatin zymography was performed on cell-free conditioned medium as described before.¹⁴ Densitometry was performed on scanned zymograms using the Scion Image program (Scion Corp, Frederick, Mass). The area of the pro-MMP-9 band was used to evaluate gelatinolytic activity, expressed as a percentage of the control condition as indicated. We had previously verified that this band was representative of the global MMP-9 activity (proMMP-9, lipocalin-

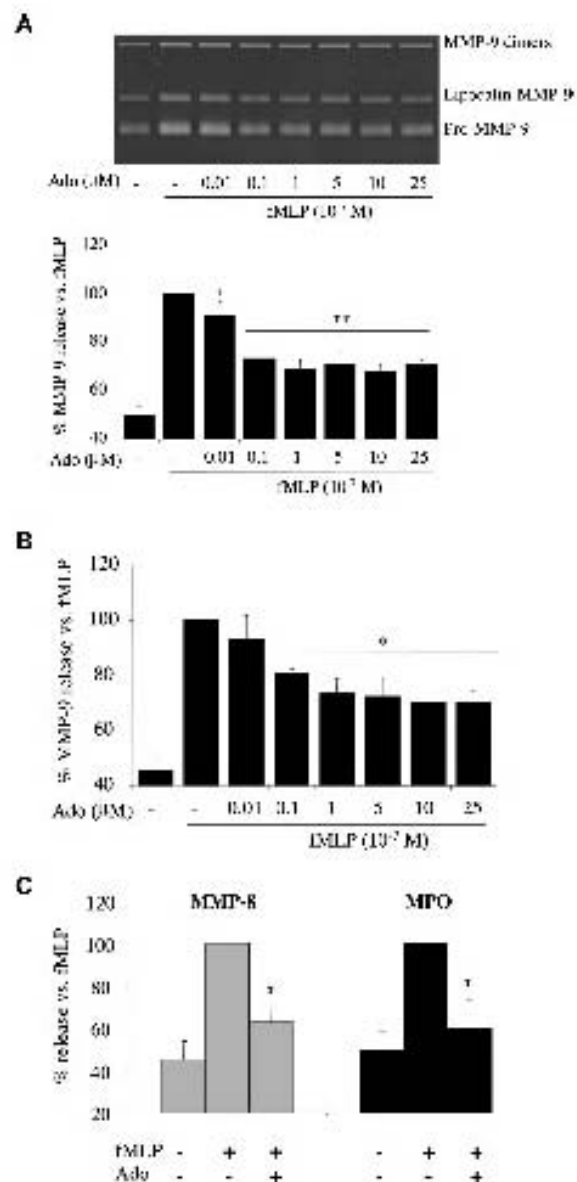


Figure 1. Adenosine dose-dependently inhibits MMP-9 secretion. Neutrophils were preincubated with Ado (0.01 to 25 μ mol/L) for 5 minutes before incubation for 15 minutes in the presence of fMLP (10^{-7} mol/L). A, Cell-free conditioned medium was analyzed by gelatin zymography. A representative zymogram is shown (upper panel). Gels were scanned and the density of the pro-MMP-9 band was quantified (lower panel). B, Measure of MMP-9 concentration in cell-free conditioned medium by ELISA. The extent of MMP-9 release is expressed as mean \pm SEM (n=8) relative to fMLP alone (100%). C, Neutrophils were incubated with Ado (1 μ mol/L) and/or fMLP (10^{-7} mol/L). MMP-8 and MPO concentrations were measured in conditioned medium (mean \pm SEM of 3 independent experiments). * $P < 0.05$ vs fMLP, ** $P < 0.001$ vs fMLP.

MMP-9 complex, MMP-9 dimers). A strong correlation was observed between the intensities of the three bands.

Measurement of cAMP Concentration

cAMP concentration was assessed using the direct cAMP enzyme immunoassay kit according to the manufacturer's protocol. Because

and secretion of MMP-9. Using near-infrared fluorescent imaging, Chen et al have elegantly demonstrated that infiltrating neutrophils are the likely source of MMP-9 activity early after infarction.¹³ Therefore, we used isolated neutrophils to study the effect of Ado and Ado analogs on MMP-9. Taken together, our results suggest that pharmacological inhibition of MMP-9 through Ado may favor the stabilization of the extracellular matrix after myocardial infarction.

Materials and Methods

An expanded Materials and Methods section can be found in the supplement available at <http://circres.ahajournals.org>.

Cell Culture

Neutrophils from healthy donors were isolated from heparinized blood by Ficoll-Hypaque (ICN) centrifugation followed by dextran sedimentation (Amersham, Rosendaal, Netherland). Purity of the cell preparations was >93% as determined with a BD FACSCanto flow cytometer (Beckton Dickinson, Erembodegem, Belgium) using anti-CD16 for neutrophils (Immunotools, Friesoythe, Germany). Cell viability, as determined by trypan blue exclusion, was >98%. Purified neutrophils were resuspended at a density of 0.5×10^6 cells/mL in RPMI 1640 medium containing L-glutamine (Cambrex, Verviers, Belgium) and supplemented with nonessential amino acids and sodium pyruvate. One ml of the cell suspension was seeded per well into 24-well plates. Cells were allowed to rest for 2 hours at 37°C/5% CO₂. If indicated, neutrophils were primed with TNF- α (10 U/mL) for 15 minutes before preincubation. Cells were preincubated for 5 minutes with Ado (0.01 to 25 μ M), Ado receptors agonists (0.1 to 100 nmol/L), or Ado receptors antagonists (1 to 100 nmol/L) as needed. Then fMLP (10^{-7} mol/L), LPS (10 ng/mL), or H₂O₂ (10 mmol/L) were added and cells were incubated for another 15 minutes (H₂O₂ and fMLP), or 2 hours for conditions with LPS. For experiments involving siRNAs, neutrophils were transfected using the Nucleofection technology (Amaxa, Cologne, Germany): 1.4 μ g of each siRNA was transfected into 1×10^6 cells following the manufacturer's recommendations. Controls underwent the same transfection procedure. Cells were incubated for 48 hours before treatments with Ado and fMLP.

Monocytes were purified from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained by Ficoll gradient using the Monocyte Isolation Kit II from Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, Germany). Purity was estimated by flow cytometry with anti-CD14-PE (monocytes/macrophages), anti-CD13-APC (monocytes and granulocytes), anti-CD20-PE Cy7 (B cells), anti-CD27-FITC (T cells), CD34-PerCP (bone marrow-derived progenitor cells), and anti-CD45-APC Cy7 (leukocytes). Purity was typically above 93%. Monocytes were cultured in RPMI 1640 containing L-Glutamine, sodium pyruvate, nonessential amino acids, penicillin/streptomycin, and 1% fetal calf serum. Differentiation was achieved with 50 ng/mL macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) for 7 days. Cells were then preincubated with 10 μ M Ado and 10 μ M erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl)-adenine hydrochloride (EHNA, an adenosine deaminase inhibitor) for 15 minutes before activation with 100 ng/mL LPS for 24 hours.

For all cells, conditioned medium was collected, mixed with bovine serum albumin (0.2% final concentration) and protease inhibitors (Roche, Mannheim, Germany), and centrifuged at 600g for 5 minutes, 4°C. Cell-free supernatants were stored at -20°C until use.

Analysis of Gelatinase Activity

Gelatin zymography was performed on cell-free conditioned medium as described before.¹⁴ Densitometry was performed on scanned zymograms using the Scion Image program (Scion Corp, Frederick, Mass). The area of the pro-MMP-9 band was used to evaluate gelatinolytic activity, expressed as a percentage of the control condition as indicated. We had previously verified that this band was representative of the global MMP-9 activity (proMMP-9, lipocalin-

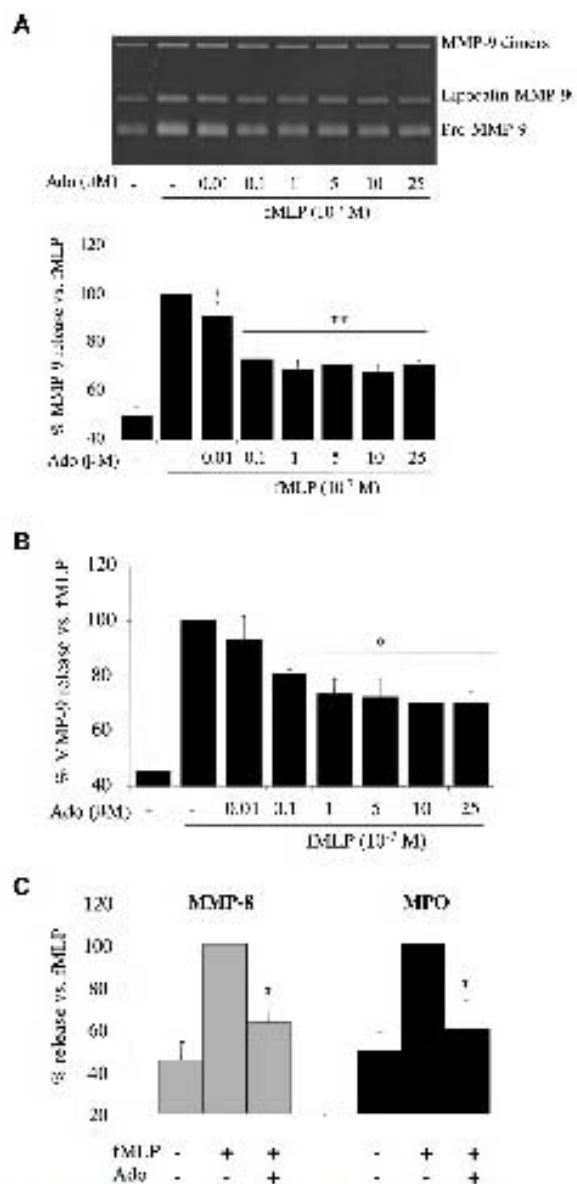


Figure 1. Adenosine dose-dependently inhibits MMP-9 secretion. Neutrophils were preincubated with Ado (0.01 to 25 μ M) for 5 minutes before incubation for 15 minutes in the presence of fMLP (10^{-7} mol/L). A, Cell-free conditioned medium was analyzed by gelatin zymography. A representative zymogram is shown (upper panel). Gels were scanned and the density of the pro-MMP-9 band was quantified (lower panel). B, Measure of MMP-9 concentration in cell-free conditioned medium by ELISA. The extent of MMP-9 release is expressed as mean \pm SEM (n=8) relative to fMLP alone (100%). C, Neutrophils were incubated with Ado (1 μ M) and/or fMLP (10^{-7} mol/L). MMP-8 and MPO concentrations were measured in conditioned medium (mean \pm SEM of 3 independent experiments). * $P < 0.05$ vs fMLP, ** $P < 0.001$ vs fMLP.

MMP-9 complex, MMP-9 dimers). A strong correlation was observed between the intensities of the three bands.

Measurement of cAMP Concentration

cAMP concentration was assessed using the direct cAMP enzyme immunoassay kit according to the manufacturer's protocol. Because

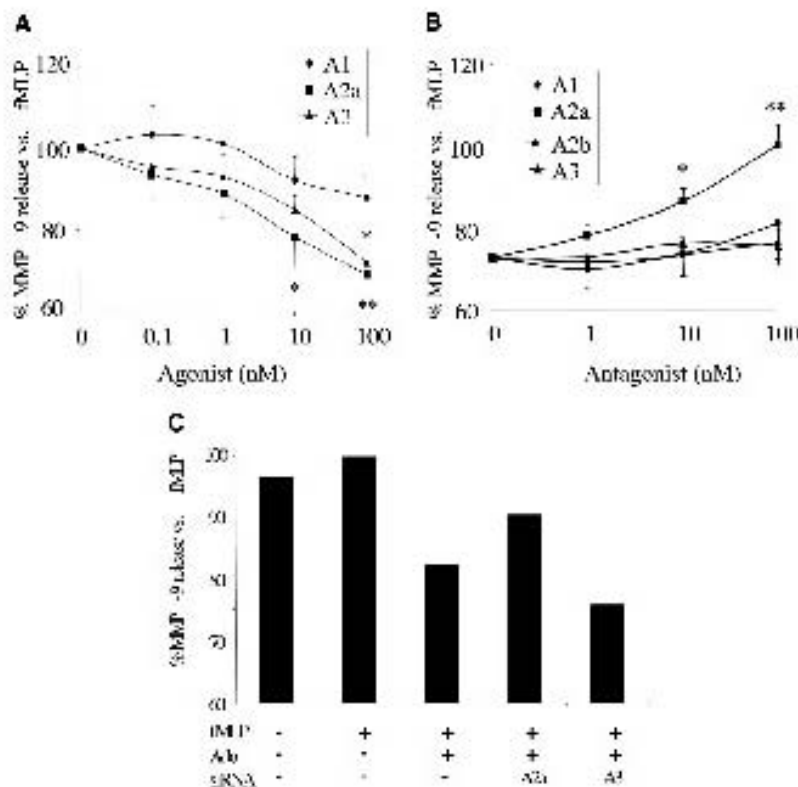


Figure 3. Inhibition of MMP-9 secretion by Ado is mediated by the A2a receptor. **A**, Neutrophils were preincubated with Ado receptor agonists (0 to 100 nmol/L) for 5 minutes before treatment with fMLP (10^{-7} mol/L) for 15 minutes. Agonists used were specific for the A1AR (CPA, \blacklozenge), the A2aAR (CGS21680, \blacksquare), or the A3AR (IB-MECA, \blacktriangle). The extent of MMP-9 release is expressed as mean \pm SEM ($n=6$) relative to fMLP alone (100%). * $P<0.05$ vs fMLP, ** $P<0.005$ vs fMLP. **B**, Neutrophils were preincubated with Ado (1 μ mol/L) and Ado receptor antagonists (0 to 100 nmol/L) for 5 minutes before treatment with fMLP (10^{-7} mol/L) for 15 minutes. Antagonists used were specific for the A1AR (CPX, \blacklozenge), the A2aAR (SCH58261, \blacksquare), the A2bAR (MRS1754, \blacklozenge), or the A3AR (PSB10, \blacktriangle). The extent of MMP-9 release is expressed as mean \pm SEM ($n=4$) relative to fMLP alone (100%). * $P<0.05$ vs fMLP + Ado, ** $P<0.005$ vs fMLP + Ado. **C**, Neutrophils were transfected with A2aAR- or A3AR-specific siRNAs, incubated for 48 hours, and treated with Ado (1 μ mol/L) for 5 minutes and fMLP (10^{-7} mol/L) for 15 minutes. Control conditions underwent the same procedure with no added siRNA. MMP-9 release in conditioned medium from a representative experiment is shown.

experiments. Similarly to fMLP-treated cells, Ado inhibited MMP-9 secretion by neutrophils stimulated with LPS or H_2O_2 (Figure 2A). This observation indicated that the effect of Ado on MMP-9 secretion was not restricted to the bacterial agents fMLP or LPS but also occurs when cells are stimulated with a reactive oxygen species generator such as H_2O_2 .

The so-called Ado modulators ITU (an inhibitor of Ado kinase) and DIP (an inhibitor of Ado transport) are substances known to increase the endogenous concentration of Ado. We tested their ability to replicate the inhibition of MMP-9 secretion by Ado. Both adenosine modulators reproduced the effect of Ado (Figure 2B). Furthermore, replacing Ado by the nonspecific Ado receptor agonist NECA resulted in a similar inhibition of MMP-9 secretion (Figure 2B). These data reinforced our finding that Ado is a reproducible inhibitor of MMP-9 secretion.

Inhibition of MMP-9 Secretion by Ado Is Mediated by the A2a Receptor

To evaluate the type of Ado receptor involved in the inhibition of MMP-9 secretion by Ado, a pharmacological approach using several Ado receptors agonists and antagonists was initially chosen. The A2a-specific agonist CGS21680 was able to replicate the inhibitory effect of Ado on MMP-9. The A3-specific agonist IB-MECA showed a weaker effect on MMP-9 at high concentration whereas the A1 specific agonist C8031 was essentially without effect (Figure 3A). Among the 4 Ado receptors antagonists tested, only the A2a-specific antagonist SCH58261 was able to suppress the effect of Ado on MMP-9 (Figure 3B). To rule

out the possibility that this suppression could be a result of an increase in MMP-9 secretion by SCH58261 itself, additional experiments were performed. The A2a antagonist SCH58261 at the concentration of 100 nM used in these experiments and giving maximal inhibition of MMP-9 release did not modify the fMLP-induced MMP-9 secretion (results not shown).

To compensate for a potential lack of specificity of the Ado agonists and antagonists, a second approach taking profit of the highly specific RNA interference process was used. Neutrophils were transfected with siRNA specific for the A2aAR or A3AR receptors before treatment with Ado and fMLP. Figure 3C shows that only the A2aAR-specific siRNA reversed, at least partly, the inhibitory effect of Ado on MMP-9 secretion. Taken together, these results demonstrate that the inhibition of MMP-9 secretion by Ado is most probably mediated by the A2aAR.

Human Neutrophils Express Both A2aAR and A3AR mRNA

The relative expression of the 4 different Ado receptors on neutrophils is poorly characterized. Using quantitative PCR, we confirmed the presence of both the A3 and the A2a receptors on neutrophils. The absence of any amplified products in a control reaction without reverse transcriptase (-RT) attested the absence of any contaminating genomic DNA in the RNA preparations (Figure 4A). Quantification revealed that the A2a receptor was 2.5-fold higher expressed than the A3 receptor (Figure 4B). These data are in accordance with the results obtained with Ado receptor agonists

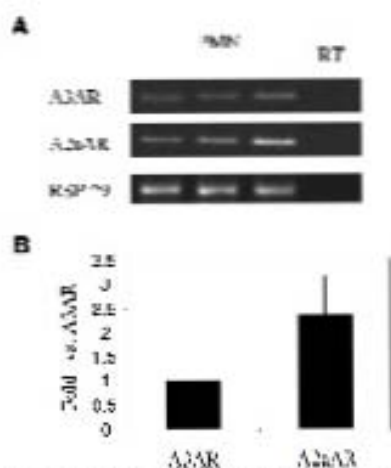


Figure 4. Human neutrophils express both A2AR and A3AR mRNAs. Neutrophils from 3 donors were used to assess the relative expression of A2aAR and A3AR. Total RNA was extracted from neutrophils purified from blood of 3 donors and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed. A, A control without reverse transcriptase (-RT) attested for the absence of genomic DNA amplification. PCR products were loaded on a 2% agarose gel and a single band of the expected size for each receptor but not for the -RT control confirmed the specificity of the amplification and the expression of both A2a and A3 receptors mRNA by neutrophils. B, Quantification revealed that A2aAR mRNA was 2.5-fold more expressed than A3AR. Results are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs A3AR.

and antagonists, ie, the A2a receptor appears to be the key mediator of the inhibition of MMP-9 secretion by Ado.

The Inhibition of MMP-9 Secretion by Ado Is cAMP-, PKA-, and Calcium-Related

The bacterial agent fMLP is known to trigger neutrophil degranulation through a massive inositol triphosphate-mediated calcium release from intracellular Ca^{2+} stores. We investigated whether the cAMP/PKA pathway could be responsible for the observed effect of Ado through modulation of intracellular Ca^{2+} stores. The effect of Ado on intracellular cAMP in unstimulated and fMLP-stimulated neutrophils is shown in Figure 5. Ado increased cAMP in unstimulated and fMLP-stimulated cells to the same extent.

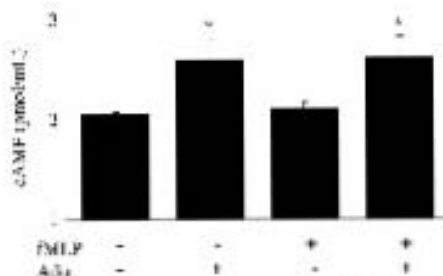


Figure 5. Adenosine increases intracellular cAMP concentration. Neutrophils were preincubated with or without Ado ($1 \mu\text{mol/L}$) for 5 minutes before treatment with or without fMLP (10^{-7}mol/L) for 3 minutes. Intracellular cAMP concentration was measured using direct cAMP enzyme immunoassay kit. Values are mean \pm SEM ($n=3$). * $P < 0.05$ vs control.

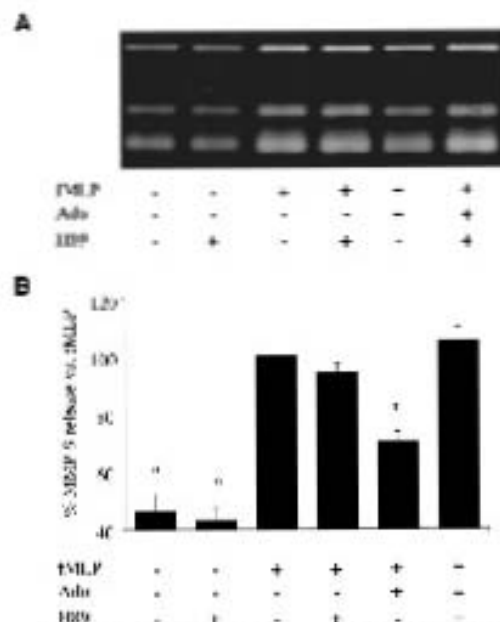


Figure 6. The PKA inhibitor H89 prevents the inhibition of MMP-9 release by Ado. Neutrophils were incubated with or without H89 ($10 \mu\text{mol/L}$) for 15 minutes, then with or without Ado ($1 \mu\text{mol/L}$) for 5 minutes, and then with or without fMLP (10^{-7}mol/L) for 15 minutes. Cell-free conditioned medium was analyzed by zymography and densitometry. A, A representative zymogram is shown. B, Densitometric analysis revealed that, whereas H89 alone or in combination with fMLP did not modify MMP-9 secretion, it prevented the Ado-mediated inhibition of MMP-9 secretion. The extent of MMP-9 release is expressed as mean \pm SEM ($n=3$) relative to fMLP alone (100%). * $P < 0.01$ vs fMLP.

Because cAMP formation leads to PKA phosphorylation, the involvement of PKA in the effect of Ado was evaluated using the specific PKA inhibitor H89. When added to untreated neutrophils or fMLP-treated neutrophils, H89 did not modify MMP-9 secretion. However, it abrogated the inhibition of MMP-9 secretion by Ado (Figure 6).

Finally, the kinetic of free cytosolic calcium concentration was studied less than fMLP stimulation, in the presence or absence of Ado. Figure 7A shows a representative pattern of Fluo-4 responses in fMLP-activated neutrophils obtained by spectrofluorimetry. The addition of fMLP to neutrophils triggered the characteristic, abrupt increase in Fluo-4 fluorescence because of elevated concentrations of cytosolic Ca^{2+} . Ado did not modify the magnitude of this increase but accelerated the rate of subsequent decline in fluorescence intensity, indicating an accelerated clearance of Ca^{2+} from the cytosol. Figure 7B shows that Ado shortens the time to half-peak from 43.7 ± 11.4 sec to 23.5 ± 6.3 sec ($P < 0.001$), an effect totally reversed by adding H89. These results were confirmed by flow cytometry (not shown). Moreover, a reproductive decrease of cytosolic calcium by $24 \pm 7\%$ ($P < 0.001$) was observed during the preincubation of the neutrophils with Ado before stimulation with fMLP, indicating that Ado has an effect per se on cytosolic calcium. Signal transduction pathways activated by fMLP in human neutrophils have been recently reviewed and include the protein

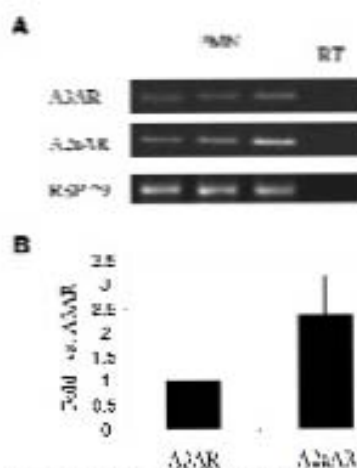


Figure 4. Human neutrophils express both A2AR and A3AR mRNAs. Neutrophils from 3 donors were used to assess the relative expression of A2aAR and A3AR. Total RNA was extracted from neutrophils purified from blood of 3 donors and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed. A, A control without reverse transcriptase (-RT) attested for the absence of genomic DNA amplification. PCR products were loaded on a 2% agarose gel and a single band of the expected size for each receptor but not for the -RT control confirmed the specificity of the amplification and the expression of both A2a and A3 receptors mRNA by neutrophils. B, Quantification revealed that A2aAR mRNA was 2.5-fold more expressed than A3AR. Results are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs A3AR.

and antagonists, ie, the A2a receptor appears to be the key mediator of the inhibition of MMP-9 secretion by Ado.

The Inhibition of MMP-9 Secretion by Ado Is cAMP-, PKA-, and Calcium-Related

The bacterial agent fMLP is known to trigger neutrophil degranulation through a massive inositol triphosphate-mediated calcium release from intracellular Ca^{2+} stores. We investigated whether the cAMP/PKA pathway could be responsible for the observed effect of Ado through modulation of intracellular Ca^{2+} stores. The effect of Ado on intracellular cAMP in unstimulated and fMLP-stimulated neutrophils is shown in Figure 5. Ado increased cAMP in unstimulated and fMLP-stimulated cells to the same extent.

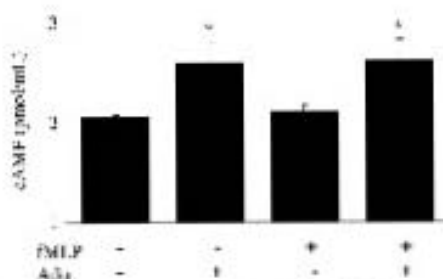


Figure 5. Adenosine increases intracellular cAMP concentration. Neutrophils were preincubated with or without Ado ($1 \mu\text{mol/L}$) for 5 minutes before treatment with or without fMLP (10^{-7}mol/L) for 3 minutes. Intracellular cAMP concentration was measured using direct cAMP enzyme immunoassay kit. Values are mean \pm SEM ($n=3$). * $P < 0.05$ vs control.

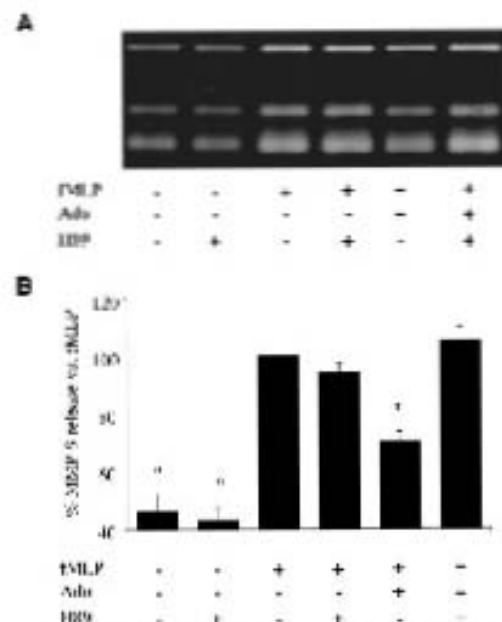


Figure 6. The PKA inhibitor H89 prevents the inhibition of MMP-9 release by Ado. Neutrophils were incubated with or without H89 ($10 \mu\text{mol/L}$) for 15 minutes, then with or without Ado ($1 \mu\text{mol/L}$) for 5 minutes, and then with or without fMLP (10^{-7}mol/L) for 15 minutes. Cell-free conditioned medium was analyzed by zymography and densitometry. A, A representative zymogram is shown. B, Densitometric analysis revealed that, whereas H89 alone or in combination with fMLP did not modify MMP-9 secretion, it prevented the Ado-mediated inhibition of MMP-9 secretion. The extent of MMP-9 release is expressed as mean \pm SEM ($n=3$) relative to fMLP alone (100%). * $P < 0.01$ vs fMLP.

Because cAMP formation leads to PKA phosphorylation, the involvement of PKA in the effect of Ado was evaluated using the specific PKA inhibitor H89. When added to untreated neutrophils or fMLP-treated neutrophils, H89 did not modify MMP-9 secretion. However, it abrogated the inhibition of MMP-9 secretion by Ado (Figure 6).

Finally, the kinetic of free cytosolic calcium concentration was studied less than fMLP stimulation, in the presence or absence of Ado. Figure 7A shows a representative pattern of Fluo-4 responses in fMLP-activated neutrophils obtained by spectrofluorimetry. The addition of fMLP to neutrophils triggered the characteristic, abrupt increase in Fluo-4 fluorescence because of elevated concentrations of cytosolic Ca^{2+} . Ado did not modify the magnitude of this increase but accelerated the rate of subsequent decline in fluorescence intensity, indicating an accelerated clearance of Ca^{2+} from the cytosol. Figure 7B shows that Ado shortens the time to half-peak from 43.7 ± 11.4 sec to 23.5 ± 6.3 sec ($P < 0.001$), an effect totally reversed by adding H89. These results were confirmed by flow cytometry (not shown). Moreover, a reproductive decrease of cytosolic calcium by $24 \pm 7\%$ ($P < 0.001$) was observed during the preincubation of the neutrophils with Ado before stimulation with fMLP, indicating that Ado has an effect per se on cytosolic calcium. Signal transduction pathways activated by fMLP in human neutrophils have been recently reviewed and include the protein

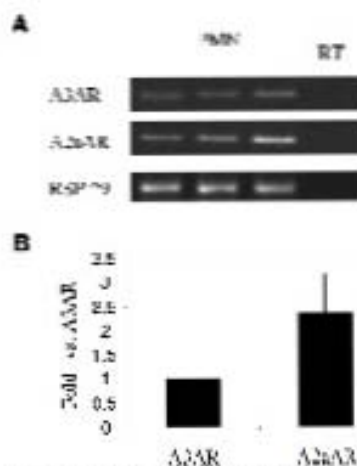


Figure 4. Human neutrophils express both A2AR and A3AR mRNAs. Neutrophils from 3 donors were used to assess the relative expression of A2aAR and A3AR. Total RNA was extracted from neutrophils purified from blood of 3 donors and quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed. A, A control without reverse transcriptase (-RT) attested for the absence of genomic DNA amplification. PCR products were loaded on a 2% agarose gel and a single band of the expected size for each receptor but not for the -RT control confirmed the specificity of the amplification and the expression of both A2a and A3 receptors mRNA by neutrophils. B, Quantification revealed that A2aAR mRNA was 2.5-fold more expressed than A3AR. Results are mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs A3AR.

and antagonists, ie, the A2a receptor appears to be the key mediator of the inhibition of MMP-9 secretion by Ado.

The Inhibition of MMP-9 Secretion by Ado Is cAMP-, PKA-, and Calcium-Related

The bacterial agent fMLP is known to trigger neutrophil degranulation through a massive inositol triphosphate-mediated calcium release from intracellular Ca^{2+} stores. We investigated whether the cAMP/PKA pathway could be responsible for the observed effect of Ado through modulation of intracellular Ca^{2+} stores. The effect of Ado on intracellular cAMP in unstimulated and fMLP-stimulated neutrophils is shown in Figure 5. Ado increased cAMP in unstimulated and fMLP-stimulated cells to the same extent.

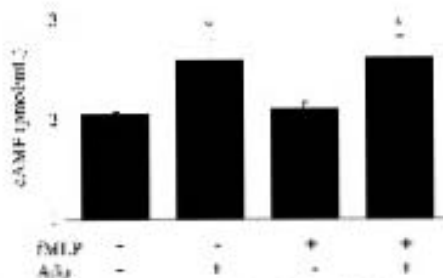


Figure 5. Adenosine increases intracellular cAMP concentration. Neutrophils were preincubated with or without Ado ($1 \mu\text{mol/L}$) for 5 minutes before treatment with or without fMLP (10^{-7}mol/L) for 3 minutes. Intracellular cAMP concentration was measured using direct cAMP enzyme immunoassay kit. Values are mean \pm SEM ($n=3$). * $P < 0.05$ vs control.

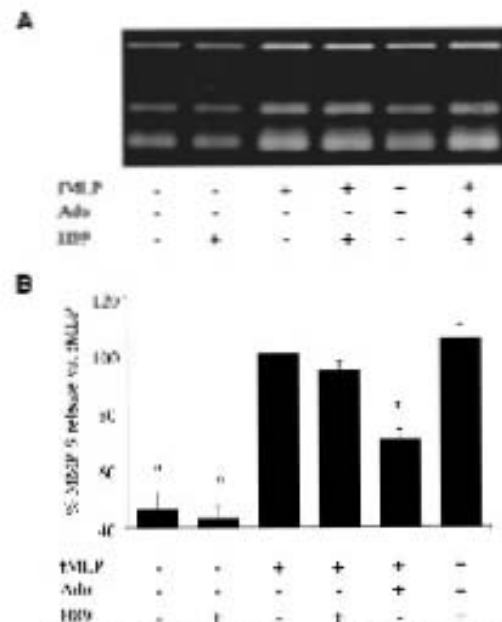


Figure 6. The PKA inhibitor H89 prevents the inhibition of MMP-9 release by Ado. Neutrophils were incubated with or without H89 ($10 \mu\text{mol/L}$) for 15 minutes, then with or without Ado ($1 \mu\text{mol/L}$) for 5 minutes, and then with or without fMLP (10^{-7}mol/L) for 15 minutes. Cell-free conditioned medium was analyzed by zymography and densitometry. A, A representative zymogram is shown. B, Densitometric analysis revealed that, whereas H89 alone or in combination with fMLP did not modify MMP-9 secretion, it prevented the Ado-mediated inhibition of MMP-9 secretion. The extent of MMP-9 release is expressed as mean \pm SEM ($n=3$) relative to fMLP alone (100%). * $P < 0.01$ vs fMLP.

Because cAMP formation leads to PKA phosphorylation, the involvement of PKA in the effect of Ado was evaluated using the specific PKA inhibitor H89. When added to untreated neutrophils or fMLP-treated neutrophils, H89 did not modify MMP-9 secretion. However, it abrogated the inhibition of MMP-9 secretion by Ado (Figure 6).

Finally, the kinetic of free cytosolic calcium concentration was studied less than fMLP stimulation, in the presence or absence of Ado. Figure 7A shows a representative pattern of Fluo-4 responses in fMLP-activated neutrophils obtained by spectrofluorimetry. The addition of fMLP to neutrophils triggered the characteristic, abrupt increase in Fluo-4 fluorescence because of elevated concentrations of cytosolic Ca^{2+} . Ado did not modify the magnitude of this increase but accelerated the rate of subsequent decline in fluorescence intensity, indicating an accelerated clearance of Ca^{2+} from the cytosol. Figure 7B shows that Ado shortens the time to half-peak from 43.7 ± 11.4 sec to 23.5 ± 6.3 sec ($P < 0.001$), an effect totally reversed by adding H89. These results were confirmed by flow cytometry (not shown). Moreover, a reproductive decrease of cytosolic calcium by $24 \pm 7\%$ ($P < 0.001$) was observed during the preincubation of the neutrophils with Ado before stimulation with fMLP, indicating that Ado has an effect per se on cytosolic calcium. Signal transduction pathways activated by fMLP in human neutrophils have been recently reviewed and include the protein

21. Zhang Y, Palmblad J, Fredholm BB. Biphasic effect of ATP on neutrophil functions mediated by P2U and adenosine A2A receptors. *Biochem Pharmacol.* 1996;51:957-965.
22. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood.* 1997;89:3503-3521.
23. Kohno Y, Ji X, Mawhorter SD, Koshida M, Jacobson KA. Activation of A3 adenosine receptors on human eosinophils elevates intracellular calcium. *Blood.* 1996;88:3569-3574.
24. Thiele A, Kronstein R, Weibel A, Gerth A, Nleber K, Haenschildt S. Regulation of adenosine receptor subtypes during cultivation of human monocytes: role of receptors in preventing lipopolysaccharide-triggered respiratory burst. *Infect Immun.* 2004;72:1349-1357.
25. Otafi ME, Gallo-Rodriguez C, Jacobson KA, Stiles GL. 125I-4-aminobenzyl-5'-N-methylcarboxamidoadenosine, a high affinity radioligand for the rat A3 adenosine receptor. *Mol Pharmacol.* 1994;45:978-982.
26. Visser SS, Theron AJ, Ramaffi G, Ker JA, Anderson R. Apparent involvement of the A(2A) subtype adenosine receptor in the anti-inflammatory interactions of CGS 21680, cyclopentyladenosine, and IB-MECA with human neutrophils. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:993-999.
27. Gessi S, Varani K, Merighi S, Callabrega E, Iannotta V, Leung E, Baraldi PG, Borea PA. A(3) adenosine receptors in human neutrophils and promyelocytic HL60 cells: a pharmacological and biochemical study. *Mol Pharmacol.* 2002;61:415-424.
28. Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, Dentener MA, Vollenok NN, van den Wildenberg FA, Blaauwman WA. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J Immunol.* 1997;158:5400-5408.
29. Jordan JE, Theurani VH, Auchampach JA, Robinson JA, Wang NP, Vinten-Johnsen J. A(3) adenosine receptor activation attenuates neutrophil function and neutrophil-mediated reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1999;277:H1895-H1905.
30. Murphree LJ, Marshall MA, Rieger JM, MacDonald TL, Linden J. Human A(2A) adenosine receptors: high-affinity agonist binding to receptor-G protein complexes containing Gbeta(4). *Mol Pharmacol.* 2002;61:455-462.
31. Zalavary S, Bengtsson T. Adenosine inhibits actin dynamics in human neutrophils: evidence for the involvement of cAMP. *Eur J Cell Biol.* 1998;75:128-139.
32. Sullivan GW, Rieger JM, Scheid WM, Macdonald TL, Linden J. Cyclic AMP-dependent inhibition of human neutrophil oxidative activity by substituted 2-propynylcyclohexyl adenosine A(2A) receptor agonists. *Br J Pharmacol.* 2001;132:1017-1026.
33. Lew PD, Monod A, Waldvogel FA, Dewald B, Baggiolini M, Pozzan T. Quantitative analysis of the cytosolic free calcium dependency of exocytosis from three subcellular compartments in intact human neutrophils. *J Cell Biol.* 1986;102:2197-2204.
34. Tintinger G, Steel HC, Anderson R. Taming the neutrophil: calcium clearance and influx mechanisms as novel targets for pharmacological control. *Cell Exp Immunol.* 2005;141:191-200.
35. Spinale FG, Escobar GP, Hendrick JW, Clark LL, Camens SS, Mingola JP, Squires CG, Stroud RE, Ikonomidou JS. Chronic matrix metalloproteinase inhibition following myocardial infarction in mice: differential effects on short and long term survival. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;318:966-973.



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

Emilie Velot¹, Benjamin Haas¹, Frédérique Léonard¹, Isabelle Emens¹, Magali Rolland-Turner¹, Chantal Schwartz¹, Dan Longrois^{2,3}, Yvan Devaux¹, and Daniel R. Wagner^{4*}

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

Received 29 April 2008; revised 10 July 2008; accepted 15 July 2008

Time for primary review: 29 days

KEYWORDS

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

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

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

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

1. Introduction

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

The transition from adaptive to maladaptive remodelling is mediated, at least partly, by dysregulated activation of the pro-inflammatory response involving both cellular and non-cellular mediators, among which matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role. MMP-9, a member of the MMP family of zinc-endopeptidases, contributes to a

large extent to maladaptive remodelling. Imbalance between MMP-9 and its inhibitory counterpart tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)-1 results in extracellular matrix (ECM) degradation. Direct inhibition of MMP has not yet been shown to have a clinical benefit.⁴ Cellular mechanisms involved in MMP-9 activation after MI are not thoroughly understood. Given the complex regulation of ECM biology, modulation of one of the upstream triggers of MMP-9 could be of potential therapeutic interest.

Adenosine (Ado) might be such an upstream regulator of MMP-9. Ado has been found to be cardioprotective in a range of cardiovascular disorders, particularly during myocardial ischaemia when Ado is massively released.^{5,6} We have previously reported that Ado inhibits TNF- α and IL-6 production by cardiac myocytes⁷⁻⁹ and MMP-9 secretion by neutrophils.¹⁰ Neutrophils are among the first wave of cells recruited to infarcted tissues. The second wave of inflammatory cells recruited to the infarcted tissues consists mainly of monocytes/macrophages. These cells migrate

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

along a gradient of the chemokine monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, which binds to its receptor CC chemokine receptor-2 (CCR2) expressed at the cell surface. Macrophages are the major contributor of MMP-9 secretion in the context of acute MI. So far, the effect of Ado on MMP-9 production by monocytes/macrophages has not been investigated.

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

2. Methods

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

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

2.1 Cell culture

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

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

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

2.2 Real-time quantitative polymerase chain reaction

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

2.3 Flow cytometry

Macrophages were stained with the following antibodies: FITC-conjugated mouse anti-human Toll-like receptor-4 (TLR4) (clone HTA125, Abcam, Cambridge, UK), APC-Cy7-conjugated mouse anti-human CD14 (clone M ϕ P9, BD Biosciences), AlexaFluor647-conjugated mouse anti-human CCR2 (clone 48607, BD Biosciences), and appropriate isotype controls. Ten thousand events were analysed on a BD FACSCanto[™] flow cytometer (BD Biosciences), and analysis was performed with the FACSDiva[™] software (BD Biosciences).

2.4 Analysis of gelatinase activity

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

2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay

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

2.6 Migration assay

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

2.7 Statistical analysis

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

3. Results

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

Monocytes were isolated from PBMCs obtained from both healthy volunteers and MI patients by negative selection and differentiated along the macrophage lineage by M-CSF. The effects of Ado on MMP-9 production were measured by quantitative PCR and ELISA. Using both techniques, a mild but significant increase in MMP-9 secretion was detected in the Ado-treated group. Ado induced a 70% increase in MMP-9 mRNA expression and a 20% increase in MMP-9 protein secretion in cell supernatants obtained from both

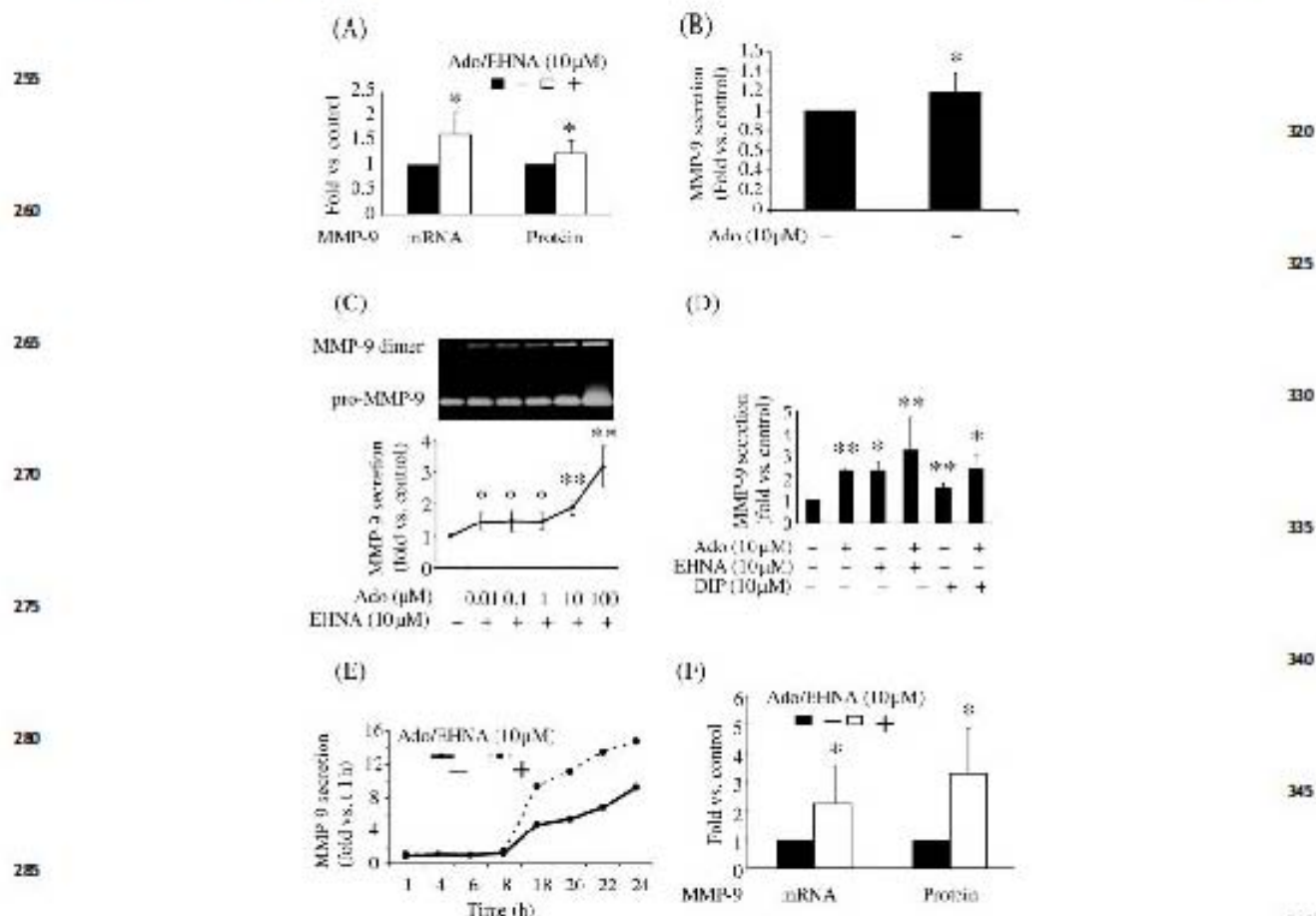


Figure 1 Adenosine (Ado) increases matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) production by primary and THP-1-derived macrophages. Monocytes isolated from peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers and myocardial infarction patients by negative selection were differentiated with 50 ng/mL MCSF for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

cultures of macrophages from healthy volunteers and MI patients (Figure 1A and B).

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

Having demonstrated that Ado consistently increases MMP-9 secretion by primary macrophages, we explored the mechanisms responsible for this effect in macrophages differentiated from the monocytic cell line THP-1. Cells were incubated for 15 min with increasing concentrations of Ado and 10 μ M EHNA prior to differentiation with 150 nM PMA for 48 h. Ado increased MMP-9 production by THP-1 macrophages in a dose-dependent manner, reaching a three-fold

increase with 100 μ M Ado (Figure 1C). Ado also increased MMP-9 production when it was added after differentiation (data not shown). Concentrations of 10 μ M Ado and 10 μ M EHNA were used in further experiments. Considering that Ado concentrations found *in vivo* in conditions like HF¹¹ and sepsis¹² are in the micromolar range, our results suggest that the effect reported here is of biological relevance.

3.3 Both endogenous and exogenous Ado enhance matrix metalloproteinase-9 secretion

To characterize the relative contribution of endogenous and exogenous Ado in MMP-9 production, several modulators of Ado metabolism such as EHNA, which enhances endogenous Ado through inhibition of Ado deaminase, and DIP, which

inhibits Ado transport, were used. When added alone, Ado, EHNA, or DIP induced MMP-9 secretion. When Ado was combined with EHNA or DIP, an additive effect was observed, resulting in a higher MMP-9 secretion than each substance alone (Figure 1D). These data show that both endogenous and exogenous Ado stimulate MMP-9 secretion.

3.4 Adenosine increases matrix metalloproteinase-9 mRNA and protein expression

To investigate the mechanism involved in enhanced MMP-9 secretion, we performed time-course experiments. An incubation period of at least 18 h was necessary to detect the effect of Ado on MMP-9 (Figure 1E). Using quantitative PCR, we observed that Ado induced a more than two-fold increase in MMP-9 mRNA expression in THP-1 cells, which was higher than in primary macrophages (Figure 1F). In parallel, we determined a three-fold increase in MMP-9 protein expression by ELISA (Figure 1F). Together, these observations suggest that the Ado-dependent release of MMP-9 is regulated at the transcriptional level.

3.5 Adenosine increases tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 but not RECK expression

Imbalance between MMPs and TIMPs can result in the deregulation of ECM turnover and lead to the development of

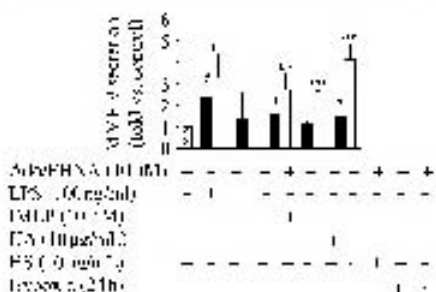


Figure 2 Adenosine (Ado) increases matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) production by activated macrophages. THP-1 macrophages were treated by Ado as described in the figure. Then cells were treated with 100 ng/mL LPS, 10^{-7} M fMLP, 10 μ g/mL hyaluronan (HA), 10 μ g/mL heparan sulfate, or were incubated in hypoxia. For all conditions, MMP-9 concentration in conditioned media was measured by ELISA after 24 h. LPS, HA, and hypoxia enhanced MMP-9 production. Ado exacerbated MMP-9 secretion in all conditions tested. Results are mean \pm SD ($n \geq 3$). * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.05$ vs. no Ado/EHNA.

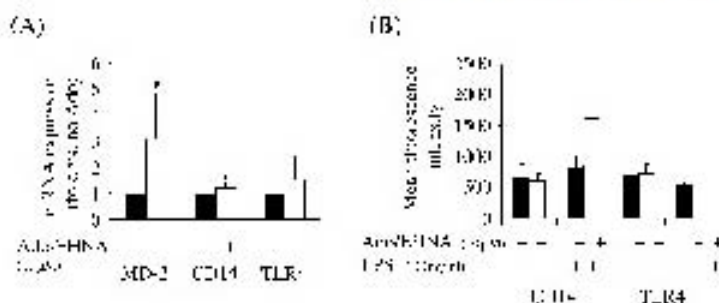


Figure 3 Adenosine (Ado) modulates the LPS recognition system. THP-1 macrophages were treated by Ado as described in Figure 2. (A) Quantitative PCR revealed that Ado increased MD-2 mRNA expression by macrophages, whereas CD14 and TLR4 expression remained unchanged ($n = 6$). (B) Twenty-four hours after differentiation, cells were treated with 100 ng/mL LPS and were harvested 24 h later. Ado alone did not change the cell surface expression of TLR4 and CD14 but increased CD14 expression on LPS-treated macrophages ($n = 3$). Results are mean \pm SD. * $P < 0.01$ vs. control.

adverse remodelling. Ado mildly increased TIMP-1 secretion, the main endogenous inhibitor of MMP-9 (see Supplementary material online, Figure S1). This suggests the existence of a feedback loop to compensate for the increased MMP-9 production. However, considering the equimolar ratio of the MMP-9/TIMP-1 heterodimer, the low increase in TIMP-1 (40%) is probably insufficient to counterbalance the three-fold increase in MMP-9 secretion (see Supplementary material online, Figure S1).

The membrane-anchored inhibitor of MMP, RECK (reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs), a key regulator of ECM turnover,¹³ inhibits pro-MMP-9 processing to the active MMP-9 form. As shown in the Supplementary material online, Figure S1, Ado did not modify RECK expression.

3.6 Adenosine increased matrix metalloproteinase-9 production by activated macrophages

We next determined whether Ado could also increase MMP-9 production by macrophages activated by stimuli such as the bacterial superantigen LPS or the peptide fMLP. In addition, several potential activators of the TLR4 such as HS and HA were tested. Finally, macrophages were subjected to hypoxia. MMP-9 production was above the control condition when macrophages were treated with LPS, HA, and hypoxia. Pre-treating the cells with Ado resulted in an exacerbation of MMP-9 secretion in all conditions tested, although this effect did not reach significance with fMLP (Figure 2). Together with data from Figure 1D, these results suggest that the effect of Ado on MMP-9 production appears to be independent of the presence of LPS, HA, fMLP, or hypoxia.

3.7 Adenosine modulates the Toll-like receptor-4 pathway

Since Ado enhanced MMP-9 production when macrophages were treated with LPS or endogenous activators of TLR4, we investigated the effects of Ado on the TLR4 pathway. LPS binds to TLR4 on the surface of macrophages, and a complex between LPS, TLR4, the receptor CD14, and the accessory protein MD-2 is formed. Quantitative PCR revealed that Ado induced a three-fold increase in MD-2 mRNA expression by macrophages (Figure 3A). CD14 and TLR4 are expressed on the cell surface or in the cytoplasm of macrophages, and cells can be primed by receptor exocytosis for further activation. Flow cytometry showed that Ado

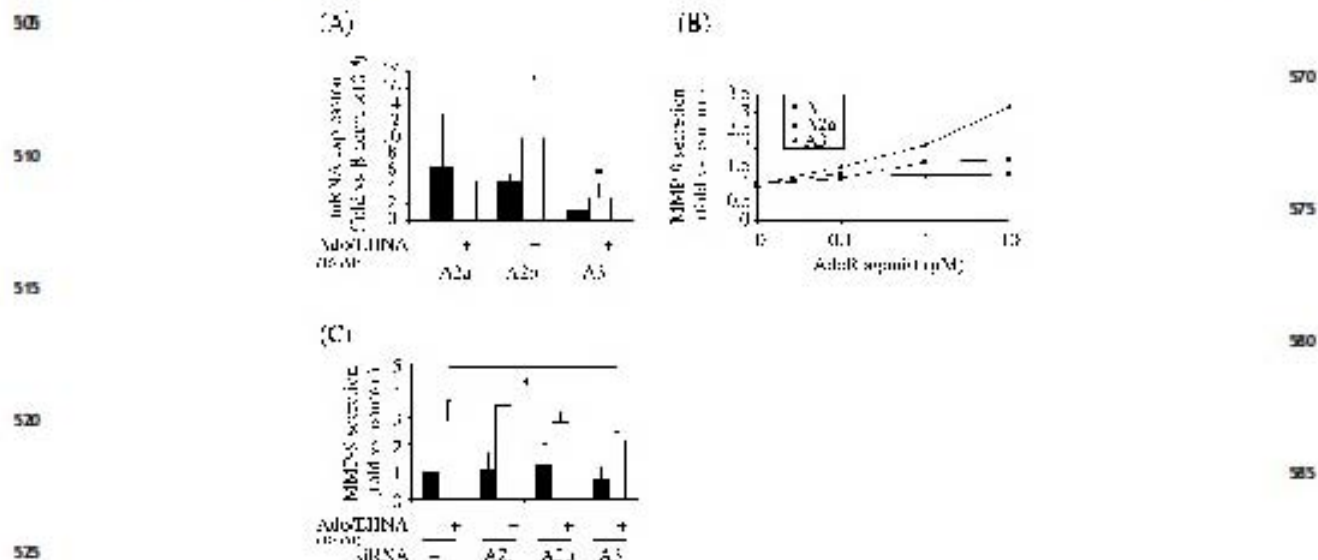


Figure 4 Adenosine (Ado) increases matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) production through its A3 receptor. (A) THP-1 macrophages were treated by Ado as described in Figure 2. Quantitative PCR revealed that A2a and A2b were the predominant forms of Ado receptors in macrophages. Ado induced a more than two-fold increase in A3 and A2b expression. Results are mean \pm SD ($n=6$). * $P < 0.05$ vs. control. (B) THP-1 cells were treated for 15 min with 0.1, 1, or 10 μ M of Ado receptors agonists (CPA, A1-specific; CGS21680, A2a-specific; IB-MECA, A3-specific). EHNA was omitted to specifically study the effect of exogenous Ado. After 48 h of differentiation with 150 nM phorbol myristate acetate (PMA), gelatinase activity was assessed in conditioned medium. The A3 agonist mimicked the effect of Ado on MMP-9 secretion. The experiment was performed twice with similar results. (C) Cells were transfected with siRNA specific for A2a, A2b, or A3 Ado receptors, incubated for 48 h to achieve down-regulation of Ado receptors expression, treated for 15 min with 10 μ M Ado and 10 μ M EHNA or vehicle before differentiation into macrophages with 150 nM PMA for 48 h. Conditioned medium was analysed by gelatin zymography. The A3-specific siRNA inhibits the Ado-mediated increase in MMP-9 secretion. Results are mean \pm SD ($n=3$). * $P < 0.05$ vs. Ado.

increases the expression of CD14, but not TLR4, on the cell surface in the presence of LPS (Figure 3B). Collectively, these data suggest that Ado primes macrophages for increased responsiveness to LPS through enhanced MD-2 and CD14 expression. This observation may explain why Ado exacerbates MMP-9 secretion by LPS-activated macrophages LPS (Figure 2).

3.8 Adenosine increases matrix metalloproteinase-9 production through its A3 receptor

To address which type of receptor mediates the effect of Ado on MMP-9 secretion, we used both pharmacological and molecular approaches. First, we determined the relative expression of each of the four Ado receptors by macrophages. Quantitative PCR showed that receptors of the A2 type were the predominant form (Figure 4A). No A1 receptor mRNA was detected in our experiments. Ado induced a more than two-fold increase in A2b and A3 receptors expression. Secondly, experiments using agonists of Ado receptors showed that only the A3-specific agonist IB-MECA was able to increase MMP-9 secretion to the same extent than Ado (Figure 4B). This result has been confirmed in primary macrophages (see Supplementary material online, Figure S3). Finally, a genomic approach using siRNA specific for A2a, A2b, and A3 receptors was used. The specific down-regulation of Ado receptors by their respective siRNA was verified by quantitative PCR (data not shown). Zymography revealed that only the A3-specific siRNA was able to significantly inhibit the Ado-mediated increase in MMP-9 secretion

(Figure 4C). Taken together, these results show that the A3 receptor mediates the effect of Ado on MMP-9 secretion.

3.9 Adenosine improves monocyte migratory capacity

Infiltration of monocytes/macrophages into the myocardium post-MI is under the control of cell migration, which is facilitated by degradation of the ECM by MMP-9, and chemotaxis, which involves the binding of the chemokine MCP-1 to its cognate receptor CCR2. We therefore tested whether the increase in MMP-9 secretion by Ado could improve monocyte migration along a gradient of MCP-1. For this purpose, the top of a modified Boyden chamber was coated with gelatin B and MCP-1 was added in the bottom compartment. Monocytes were treated with Ado before seeding on the microporous membrane of the chamber. As shown in Figure 5A, Ado enhanced cell migration through the gelatin layer. This effect was inhibited by the synthetic MMP inhibitor GM6001 and the endogenous MMP-9 inhibitor TIMP-1 (Figure 5A). To test a potential effect of Ado on chemotaxis, CCR2 expression was measured by quantitative PCR. As shown in Figure 5B, Ado had opposite effects on CCR2 mRNA expression depending on the differentiation status of monocytes. Ado increased CCR2 expression by monocytes (50% increase vs. control), whereas it decreased CCR2 expression by macrophages (75% inhibition vs. control). When assessed at the cell surface by flow cytometry, Ado also potentially reduced the expression of CCR2 on macrophages (Figure 5C). The mean fluorescence intensity of CCR2 staining was decreased by Ado from 800 to 500, and the percentage of cells expressing CCR2 was reduced by

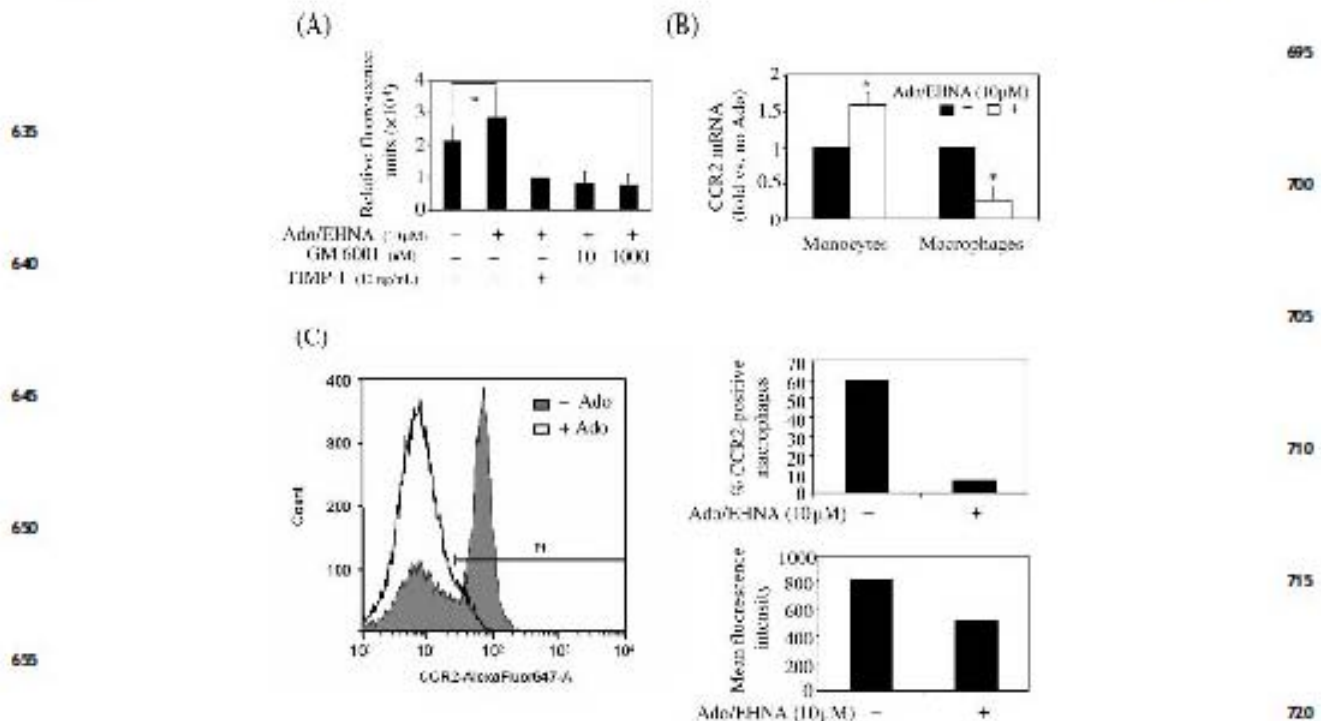


Figure 5 Ado increases monocytes migratory capacity. (A) THP-1 monocytes were treated for 24 h with 10 μM Ado and 10 μM EHNA or vehicle before seeding on the microporous membrane of a modified Boyden chamber pre-coated with gelatin B. About 10 ng/mL MCP-1 was added in the bottom compartment. When specified, cells were pre-incubated with tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP-1 (10 ng/mL) or GM6001 (10 nM or 1 μM) before seeding on the membrane. Cell migration was quantified by fluorescence after 24 h. Ado enhanced cell migration and TIMP-1 or GM6001 prevented this effect. Results are mean ± SD (n = 5). *P < 0.05 vs. no Ado. (B) THP-1 monocytes and monocytes differentiated into macrophages by 150 nM PMA were treated for 24 h with 10 μM Ado and 10 μM EHNA or vehicle before assessment of CCR2 mRNA expression by quantitative PCR. Ado enhanced CCR2 expression in monocytes and decreased CCR2 expression in macrophages. Results are mean ± SD (n = 5). *P < 0.05 vs. no Ado. (C) Ado decreases CCR2 expression in macrophages. Macrophages were treated for 6 h with 10 μM Ado and 10 μM EHNA or vehicle before assessment of CCR2 expression by flow cytometry. The P1 gate was used to determine the percentage of CCR2-positive cells. A representative experiment from three independent experiments is shown.

Ado from 60 to 6% (Figure 5C). Therefore, we concluded that Ado enhances monocytes migration through increased MMP-9 activity. In addition, our data suggest that the chemotactic capacity of macrophages is significantly attenuated by Ado through a loss of CCR2 expression.

3.10 Blood cells isolated from patients with acute myocardial infarction show enhanced matrix metalloproteinase-9 expression

Since Ado is massively released in the heart after MI, we hypothesized that blood cells isolated from patients the day of MI could express high levels of MMP-9. The PAXgene[®] RNA blood system that allows RNA extraction of all blood cells from only 2.5 mL of blood was used in these experiments. This does not have a major impact on the accuracy of our results assuming that the monocytes/macrophages population is largely responsible for MMP-9 mRNA expression. Indeed, MMP-9 is also released in large amounts from neutrophils by degranulation, thus independent from *de novo* transcription.¹⁴ Cells from MI patients expressed significantly more MMP-9 mRNA than controls (Figure 6). These observations suggest that the increased secretion of MMP-9 by monocytes/macrophages in the presence of Ado occurs during ischaemia post-acute MI.

A potential regulation of the expression of Ado receptors after MI has been tested in the same two groups of MI

patients and healthy volunteers. As shown in the Supplementary material online, Figure S2, MI had no significant effect on the expression of Ado receptors.

4. Discussion

The main finding of the present study is that, in sharp contrast to our previous observations in neutrophils, Ado enhances MMP-9 secretion by macrophages.

The fact that Ado prevents MMP-9 release by neutrophils whereas it enhances MMP-9 secretion by macrophages has several implications. Neutrophils are recruited to the infarct area early after MI (<2 days), whereas macrophages invade the lesion 2–4 days post-MI. The mechanisms responsible for MMP-9 production by these two cell types are fundamentally different. Neutrophils rapidly release large amounts of MMP-9 by degranulation. In our experiments, however, MMP-9 secretion by macrophages was not detected before 8 h, which is consistent with a *de novo* protein synthesis. We previously demonstrated in neutrophils that Ado decreases MMP-9 secretion through the A2a receptor and this mechanism involved a quick signalling cascade with rapid Ca²⁺ mobilization.¹⁰ A recent study showed that hypoxia inhibits MMP-9 expression in monocyte-derived dendritic cells through the A2b receptor.¹⁵ Data presented here show that enhancement of MMP-9 production by

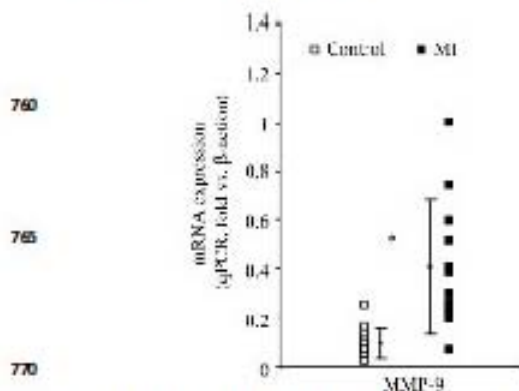


Figure 6 Cells isolated from the blood of patients with acute myocardial infarction (MI) secrete more matrix metalloproteinase-9 than healthy controls. Blood samples from healthy volunteers (controls, open square) and patients with MI (filled square) were recovered in RNeasy[®] tubes. RNA was extracted and quantified by qPCR. Cells isolated from patients with MI have higher levels of MMP-9 than controls. Results were normalized to β -actin. Each square represents one patient and the means \pm SD ($n = 12$ in each group) are displayed. * $P < 0.0005$ vs. controls.

macrophages after exposure to Ado is mediated through A3 receptor activation and involves a transcriptional effect, although a contribution of the A2b receptor cannot be fully excluded. Therefore, the effects of Ado on MMP-9 production by inflammatory cells are highly dependent on the type of Ado receptors and their respective signalling pathways. This might have important implications for therapies using Ado analogues in the inflammatory context of MI or HF.

We also determined whether Ado was able to enhance MMP-9 production by activated macrophages. When macrophages were treated by the widely used superantigen LPS, a strong release of MMP-9 was observed and this effect was amplified by Ado. This observation suggests that macrophages can be primed by Ado for enhanced responsiveness to LPS. Our results showing that Ado increased MD-2 and CD14 expression are in accordance with this hypothesis. This priming mechanism appears to be different from the priming induced by oxidative stress that recruits TLR4 to the plasma membrane.⁷⁶ Whether these two mechanisms occur simultaneously following MI and result in exaggerated macrophage activation remains to be determined.

A direct link between TLR4 activation and the development of LV remodelling has recently been proven by Timmers *et al.*¹⁷ However, the prototypical activator of TLR4, the bacterial product LPS, is probably absent in the heart after MI, suggesting that TLR4 must be activated by other endogenous ligands. Several ligands from diverse origins appear to be able to bind and activate TLR4, among which some are potentially present in the ischaemic heart. These include HS, which is involved in endothelial barrier integrity,¹⁸ and HA, which is up-regulated in the kidney after ischaemia-reperfusion.¹⁹ Our data show that LPS and HA significantly triggered MMP-9 production and that this effect was amplified by Ado. Interestingly, hypoxia was also able to induce MMP-9 production, reaching maximal levels after Ado treatment (four-fold increase). This observation suggests that Ado, which is massively released during ischaemia, is a potent stimulator of MMP-9 production in the ischaemic heart.

Chemotaxis and cell migration are two distinct processes that orchestrate monocytes tissue infiltration. The role of the main monocyte chemoattractant MCP-1 in LV remodelling is controversial since both beneficial²⁰ and deleterious²¹ effects have been found in mice models. Interestingly, a study by Dewald *et al.*²² highlighted the possibility that MCP-1 could, at the same time, promote healing of infarcted areas and contribute to LV remodelling. Two distinct subsets of monocytes have been identified in the murine infarcted heart: inflammatory monocytes bearing the CCR2 receptor are recruited during the early phase post-MI and monocytes lacking the CCR2 receptor and exhibiting healing properties are recruited during the late phase.²³ Our results reveal a dual effect of Ado on monocytes/macrophages. First, Ado improves monocyte migration through up-regulation of MMP-9 activity, and secondly, Ado favours healing macrophages to inflammatory macrophages through a loss of CCR2 expression.

We²⁴ and others²⁵ have shown that MMP-9 is a biomarker of HF after MI. Therefore, we compared MMP-9 expression in blood cells from patients with acute MI and healthy volunteers and we observed that cells from patients with acute MI had higher levels of MMP-9. This is probably due to a priming of the macrophages by the large amounts of Ado released in the ischaemic heart following MI. However, the exact contribution of Ado to this priming and the mechanisms involved in this potential priming remain to be determined.

A study with MMP-9 deficient mice revealed MMP-9 as a potential therapeutic target to prevent LV remodelling after MI.²⁶ However, the PREMIER (prevention of myocardial infarction early remodelling) phase II trial showed that non-specific inhibition of MMPs activity with PG-116800 failed to prevent LV remodelling and did not improve outcome after MI.⁴ In this study, the MMP inhibitor was given 24-72 h post-MI. The negative results of this trial might be explained either by the non-specificity of the MMP inhibitor used or by the suboptimal timing of drug delivery. Further experimental work is necessary to fully understand the implication of MMPs in LV remodelling.

The therapeutic potential of Ado or Ado analogues has been reported in both animal studies and clinical trials. In animals, cardioprotective activities of Ado were found during three windows of opportunity: as a pre-treatment of ischaemia, during ischaemia, or during reperfusion. A dichotomy between the types of receptors involved was first hypothesized, A1 receptors mediating the cardioprotective effects of Ado during pre-treatment and during ischaemia, mainly through metabolic changes, and A2 receptors being beneficial during reperfusion, mainly through inhibition of neutrophil activity.²⁷ Our previous data supported the involvement of A2a receptors in the protection provided by Ado in post-ischaemic injury, through inhibition of MMP-9 release by neutrophils.¹⁰ So far, most studies have shown that A3 receptor activation is cardioprotective before or during ischaemia.^{27,28} This protection appears to be dose-dependent: mice with mild over-expression of A3 were partly protected from ischaemic injury whereas mice which highly over-expressed the A3 receptor developed a dilated cardiomyopathy.²⁹ It can be speculated that this phenomenon may partly be related to the stimulation of MMP-9 by the A3 receptor. Indeed, while low doses of MMP-9 may favour angiogenesis,³⁰ persistent high doses of MMP-9 will likely lead to matrix degradation and remodelling. Recent work by Feldman's group³¹ demonstrated the

association between a polymorphism in the coding region of the A3 receptor and the infarct size in a population of patients with ischaemic cardiomyopathy. However, this observation has to be confirmed in larger studies.

Few clinical trials have tested the therapeutic potential of Ado in the context of MI. Ado improved cardiac function of patients with MI when combined with lidocaine³² or primary angioplasty.^{33,34} However, these trials, although reporting a beneficial clinical outcome, were performed on a small number of patients. The AMISTAD I and II trials, with a larger sample size, demonstrated a reduction in infarct size by Ado as an adjunct to reperfusion therapy, when added early after infarction.^{35,36} A post hoc analysis of the AMISTAD-II trial revealed that Ado reduced mortality when added within 3 h of infarction.³⁷ Of note, in this trial, Ado was administered for more than 48 h after MI. Based on our current findings, it can be speculated that some of the early benefit of Ado was offset by stimulation of MMP-9 and migration of macrophages later on.

In conclusion, the Ado A3 receptor increases MMP-9 secretion by human monocytes/macrophages, in contrast to the A2a receptor that inhibits MMP-9 secretion by neutrophils. Therefore, therapy with Ado in the setting of ischaemic injury appears complex because the effects dramatically change with the type of receptor stimulated and the dosage. Since high doses of MMP-9, such as those released by neutrophils, may lead to matrix degradation, whereas moderate doses, such as those produced by monocytes/macrophages, may improve revascularization, our results suggest the testing of a dual therapeutic strategy with A2a agonists immediately after MI and A3 agonists during the remodelling phase.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Funding

Société pour la Recherche sur les Maladies Cardiovasculaires; Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche of Luxembourg.

Acknowledgements

We thank Céline Jeanty, Mélanie Vausort, Bernadette Leners, Christelle Nicolas, Malou Gloesener, and Loredana Jacobs for expert technical assistance. The help of Nicolaas Bruns and Wim Ammerlaan with flow cytometry is acknowledged.

Conflict of interest: none declared.

References

- Kannel WB. Vital epidemiologic clues in heart failure. *J Clin Epidemiol* 2000;53:229-235.
- Levy D, Menchatah S, Larson MG, Benjamin EJ, Kupka MJ, Ho KK et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* 2002;347:1397-1402.
- Zamrad F, Mebazaa A, Juilliere Y, Cohen-Solal A, Guize L, Alla F et al. Clinical profile, contemporary management and one-year mortality in patients with severe acute heart failure syndromes: the EFICA study. *Eur J Heart Fail* 2006;8:697-705.
- Hudson MP, Armstrong PW, Ruzyllo W, Brum J, Cusmano L, Krzeski P et al. Effects of selective matrix metalloproteinase inhibitor (PG-116800) to prevent ventricular remodeling after myocardial infarction: results of the PREMIER (prevention of myocardial infarction early remodeling) trial. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:15-20.
- Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5:247-264.
- Willems L, Ashton KJ, Headrick JP. Adenosine-mediated cardioprotection in the aging myocardium. *Cardiovasc Res* 2005;66:245-255.
- Wagner DR, McTiernan C, Sanders VJ, Feldman AM. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced secretion of tumor necrosis factor-alpha in the failing human heart. *Circulation* 1998;97:521-524.
- Wagner DR, Combes A, McTiernan C, Sanders VJ, Lemster B, Feldman AM. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res* 1998;82:47-56.
- Wagner DR, Kubota T, Sanders VJ, McTiernan CF, Feldman AM. Differential regulation of cardiac expression of IL-6 and TNF-alpha by A2- and A3-adenosine receptors. *Am J Physiol* 1999;276:H2141-H2147.
- Errens I, Rouy D, Velot E, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: Implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca2+ pathway. *Circ Res* 2006;99:590-597.
- Funaya H, Kitakaze M, Node K, Minamino T, Komamura K, Hori M. Plasma adenosine levels increase in patients with chronic heart failure. *Circulation* 1997;95:1363-1365.
- Barnes CR, Mandell GL, Carper HT, Luong S, Sullivan GW. Adenosine modulation of tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil activation. *Biochem Pharmacol* 1995;50:1851-1857.
- Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM et al. The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001;107:789-800.
- Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J et al. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 2001;103:2181-2187.
- Zhao P, Li XG, Yang M, Shao Q, Wang D, Liu S et al. Hypoxia suppresses the production of MMP-9 by human monocyte-derived dendritic cells and requires activation of adenosine receptor A(2b) via cAMP/PKA signaling pathway. *Mol Immunol* 2008;45:2187-2195.
- Powers KA, Szasz K, Khadaroo RG, Tadwros PS, Marshall JC, Kapus A et al. Oxidative stress generated by hemorrhagic shock recruits Toll-like receptor 4 to the plasma membrane in macrophages. *J Exp Med* 2006;203:1951-1961.
- Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hofer IE, Nederhoff MG, Goumans MJ et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction. *Circ Res* 2008;102:257-264.
- Tang AH, Brum GJ, Cascalho M, Platt JL. Phthal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J Leukoc Biol* 2007;82:282-285.
- Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007;117:2847-2859.
- Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE et al. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 2006;99:891-899.
- Hayashidani S, Butani H, Shiomi T, Ikauchi M, Matsusaka H, Sumitani N et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2003;108:2134-2140.
- Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T et al. CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res* 2005;96:881-889.
- Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* 2007;204:3037-3047.
- Wagner DR, Delagardille C, Errens I, Rouy D, Villant M, Bessel J. Matrix metalloproteinase-9 is a marker of heart failure after acute myocardial infarction. *J Card Fail* 2006;12:66-72.
- Yan AT, Yan RT, Spinale FG, Afzal R, Gunasinghe HR, Arnold M et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure. *J Card Fail* 2006;12:514-519.

NOT FOR
PUBLIC RELEASE

- 1010 26. Ducharme A, Frantz S, Aikawa M, Rabkin E, Lindsey M, Rohde LE et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase-9 attenuates left ventricular enlargement and collagen accumulation after experimental myocardial infarction. *J Clin Invest* 2000;106:55-62.
- 1015 27. Vinten-Johansen J, Thourani VH, Ranson RS, Jordan JE, Zhao ZQ, Nakamura M et al. Broad-spectrum cardioprotection with adenosine. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1942-1948.
- 1020 28. Safian N, Shneyvays V, Balas N, Jacobson KA, Nawroth H, Shaliberg A. Cardioprotective effects of adenosine A1 and A3 receptor activation during hypoxia in isolated rat cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem* 2001;217:143-152.
- 1025 29. Black RG Jr, Guo Y, Ge ZD, Murphy SS, Prabhu SD, Jones WK et al. Gene dosage-dependent effects of cardiac-specific overexpression of the A3 adenosine receptor. *Circ Res* 2002;91:165-172.
- 1030 30. Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med* 1999;5:1135-1142.
- 1035 31. Tang Z, Diamond MA, Chen JM, Holly TA, Banow RO, Dasgupta A et al. Polymorphisms in adenosine receptor genes are associated with infarct size in patients with ischemic cardiomyopathy. *Clin Pharmacol Ther* 2007;82:435-440.
- 1040 32. Garratt KN, Holmes DR Jr, Molina-Viamonte Y, Reeder GS, Hodge DO, Bailey KR et al. Intravenous adenosine and lidocaine in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1998;136:196-204.
- 1045 33. Leesar MA, Stoddard M, Ahmed M, Broadbent J, Bolli R. Preconditioning of human myocardium with adenosine during coronary angioplasty. *Circulation* 1997;95:2500-2507.
- 1050 34. Mazzilli M, Ostini E, Marmacini F, Testa R. Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. *Circulation* 2000;101:2154-2159.
- 1055 35. Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, DiCarli MF, Leesar MA, Browne KF et al. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction Study of Adenosine (AWISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:1711-1720.
- 1060 36. Ros AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AWISTAD-II). *J Am Coll Cardiol* 2003;45:1775-1780.
- 1065 37. Kloner RA, Forman MB, Gibbons RJ, Ros AM, Alexander RW, Stone GW. Impact of time to therapy and reperfusion modality on the efficacy of adenosine in acute myocardial infarction: the AWISTAD-2 trial. *Eur Heart J* 2006;27:2400-2405.
- 1070

**Vascular Endothelial Growth Factor and the Soluble form of its receptor
VEGF Receptor -1 Contribute to the Pro-angiogenic properties of
Adenosine**

**Isabelle Ernens,¹ Frédérique Léonard,¹ Mélanie Vausort,¹ Emilie Velot,¹ Magali
Rolland-Turner,¹ Tung Chan², Arthur M. Feldman², Yvan Devaux,¹ and Daniel R.
Wagner^{1,3}**

¹Laboratory of Cardiovascular Research, CRP-Santé, Luxembourg, Luxembourg

²Department of Medicine, Thomas Jefferson University, USA

³Division of Cardiology, Centre Hospitalier Luxembourg, Luxembourg

Running title: pro-angiogenic effects of adenosine

Address for correspondence:

Daniel R. Wagner, MD, PhD, FACC, FECS

Division of Cardiology, Centre Hospitalier Luxembourg, 4 rue Barblé, L1210 Luxembourg.

Tel +352 44 11 2221; Fax +352 44 11 66 29; E-mail: wagner.daniel@chl.lu

Abstract

Post-infarct left ventricular (LV) remodeling is a leading cause of heart failure. It is widely accepted that adenosine (Ado), produced locally in the heart following myocardial infarction (MI), provides cardioprotection. In addition, its implication in LV remodeling has recently been revealed but is still poorly characterized. Angiogenesis is a complex phenomenon controlled by a balance of both pro-angiogenic factors – such as the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – and anti-angiogenic factors – such as the soluble form of the VEGF receptor-1 (VEGFR1 or sFlt-1). Since angiogenesis may positively affect LV remodeling, the effects of Ado on angiogenesis were investigated. Primary human macrophages were challenged with the prototypic Toll-Like Receptor 4 (TLR4) ligand lipopolysaccharide (LPS) or other endogenous ligands potentially present in the heart after MI. LPS and hyaluronan triggered VEGF production by macrophages and this production was amplified by Ado (22-fold increase after 24 hours of LPS, $P < 0.0001$).

Conversely, Ado inhibited the production of sFlt-1 triggered by LPS and heparan sulfate (43% inhibition after 24 hours of LPS, $P = 0.006$). Up-regulation of VEGF and sFlt-1 production by LPS was under the control of the Hypoxia Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) whereas Ado appeared to activate the transcriptional coactivator peroxisome-proliferator-activated receptor- γ coactivator -1 α (PGC-1 α). The effects of Ado on VEGF and sFlt-1 were mimicked by agonists of the A2a and A3 receptors and blunted by antagonists of the A2a and A2b receptors. Overexpression of A2a but not A1 receptor in transgenic mice in a cardiac-specific and inducible manner increased the levels of plasma VEGF and VEGF mRNA in the heart. The pro-angiogenic action of Ado is operational and amplified in cells from patients with acute MI since the up-regulation of VEGF induced by Ado was higher in macrophages from MI patients than healthy controls (2-fold, $P = 0.02$). In conclusion, Ado exacerbates

VEGF production and antagonizes sFlt-1 production by macrophages through its A2a receptor, thereby conferring them with a truly pro-angiogenic phenotype. Therefore, our study emphasizes the testing of Ado analogs as a new therapy to stimulate angiogenesis and prevent cardiac remodeling.

Key Words: myocardial infarction, left ventricular remodeling, adenosine, angiogenesis, vascular endothelial growth factor.

Introduction

Left ventricular (LV) remodeling after myocardial infarction (MI) with resultant chronic heart failure remains a major clinical problem for which there are currently only incomplete solutions. Although the effects of angiogenic signals on the post-MI myocardium are not fully understood, it appears that angiogenesis may induce cardiac repair and positively affect ventricular remodeling¹. It is widely accepted that macrophages are critical regulators of the remodeling process, particularly through regulation of angiogenesis.

Hypoxic cardiac tissues produce adenosine (Ado) from dephosphorylation of adenosine tri-phosphate (ATP) and Ado in turn functions to restore the balance between oxygen demand and oxygen supply to the heart². It has traditionally been believed that Ado increases oxygen supply by increasing coronary vasodilatation and decreases oxygen demand in the heart through anti-adrenergic effects³. An emerging concept is that adenosine (Ado) plays a major role in stimulating angiogenesis⁴. Indeed, Ado has been reported to stimulate the proliferation and migration of endothelial cells in culture^{5,6} to induce capillary growth in normal and hypertrophied hearts⁷ and to promote wound neovascularisation⁸.

Endothelial cell growth is mainly under the control of vascular endothelial growth factor (VEGF), whose expression is triggered by the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), a heterodimeric transcription factor consisting of HIF-1 α and HIF-1 β subunits⁹. While HIF-1 β is stable and constitutively expressed, HIF-1 α is unstable under normoxic condition and can be stabilized by hypoxia and other signaling pathways. Recently, another transcriptional activator, the peroxisome-proliferator-activated receptor- γ coactivator -1 α (PGC-1 α), has been shown to regulate VEGF expression independently of HIF-1 α in hypoxic conditions¹⁰. Several isoforms of VEGF produced through alternative splicing of four VEGF genes have been identified, all expressed in the human myocardium. VEGF binds to three types of VEGF receptors (VEGFR1-3). Although the mitogenic power of VEGFR2 is recognized, the role of

VEGFR1 in endothelial cell function is less clear¹¹. VEGFR1 but not VEGFR2 is expressed by monocytes/macrophages and can be produced under a soluble form by alternative splicing, named sVEGFR1 or sFlt-1 (soluble Fms-like tyrosine kinase 1). Whereas sFlt-1 level is low in the acute phase post-MI, it is increased at 2 weeks after MI¹², raising the possibility that sFlt-1 may play a role in LV remodeling.

Although Ado has been shown to up-regulate VEGF expression in cultured smooth muscle cells¹³, murine peritoneal macrophages¹⁴, and more recently human dendritic cells¹⁵, its effects on human macrophages are unknown. Ado and lipopolysaccharide (LPS) synergistically enhanced VEGF production and this effect was absent in macrophages from mice that lack functional Toll-like receptor-4 (TLR4)¹⁴ or MyD88-deficient mice¹⁶. These data suggested the existence of a cross-talk between Ado receptors (AdoRs) and TLR4, both critical components of the innate immune response. Whereas this cross-talk appears to play a role in wound healing¹⁶, its association with a cardiac phenotype has not been reported.

Several lines of evidence demonstrate that TLR4 is abundantly expressed in the heart and is activated after ischemia¹⁷⁻²⁰. The role of TLR4 activation in this setting remains largely controversial and both beneficial^{20, 21} and deleterious^{18, 19} effects have been reported. Interestingly, a recent study linked TLR4 activation to the development of maladaptive LV remodeling²². However, the prototypical activator of TLR4, LPS, is most probably absent in the heart after MI, raising the hypothesis that TLR4 must be activated by other endogenous ligands. Interestingly, TLR4 possesses other ligands than LPS, among which some are potentially present in the heart after MI. First, Monophosphoryl Lipid A (MLA), a low-toxicity LPS derivative used as vaccine adjuvant²³, and its more toxic homolog Diphosphoryl Lipid A (DLA). Second, heparan sulfate (HS), an endogenous TLR4 ligand involved in endothelial barrier integrity²⁴. Third, IL-1 β , which is involved in the progression of LV

remodeling after MI^{25, 26}. Finally, High Mobility Group Box 1 (HMGB1), hyaluronan and biglycan, which are all up-regulated in the kidney after ischemia-reperfusion²⁷.

Therefore, the aim of the current study was to determine the effect of Ado on angiogenesis induced by stimulation of TLR4 in human macrophages. We report that Ado confers macrophages with a pro-angiogenic phenotype through increased VEGF and decreased sFlt-1 production. The strongest effect of Ado is found when macrophages are activated by HS, suggesting that Ado and HS collaborate to maintain endothelial barrier integrity. This effect is under the dependence of HIF-1 α and the A2a Ado receptor. We also provide evidence for an exacerbation of this phenomenon in patients following acute MI. Since angiogenesis may benefit to cardiac repair and adaptive LV remodeling, therapeutic strategies targeting Ado and TLR4 receptors are suggested.

Methods

Materials

All materials and reagents were from Sigma (Bornem, Belgium) unless specified. Ado receptors agonists were C141 (2-[4-[(2-carboxyethyl)phenyl]ethylamino]-5'-N-ethylcarbamoyl, A2a specific) and IB-MECA (1-deoxy-1-[6-[[3-iodophenyl)methyl]amino]-9H-purine-9-yl]-N-methyl-D-ribofuranuronamide, A3 specific). Ado receptors antagonists were SCH58261 (7-(2-phenylethyl)-2-(2-furyl)pyrazolo[4,3e]1,2,4-triazolo[1,5c]pyrimidine, A2a specific), MRS 1754 (8-[4-[[4-Cyanophenyl]carbamoylmethyl]oxy]phenyl)-1,3-di(n-propyl)xanthine, A2b specific) and PSB-10 (8-Ethyl-4-methyl-2-(2,3,5-trichlorophenyl)-(8R)-4,5,7,8-tetrahydro-1H-imidazo[2.1-i]purin-5-one, A3 specific). Ficoll was from ICN Flow (Asse-Relegem, Belgium). EHNA (erythro-9-(2-Hydroxy-3-nonyl) adenosine hydrochloride) was used as Ado deaminase inhibitor. The E-Toxate[®] reagent from *Limulus polyphemus* (LAL assay having a detection sensitivity of 0.05 EU/mL) was used to ensure the absence of endotoxin contamination in Ado and other drugs used in the study. IL-1 β and TGF- β were obtained from PeproTech (London, UK).

Cell culture

Peripheral venous blood was obtained from patients with acute MI, healthy volunteers, and few patients with haemochromatosis in case large amounts of blood (200 mL) were necessary for the experiments. Patients with acute MI were enrolled in the Luxembourg Acute Myocardial Infarction Registry and were treated with primary percutaneous coronary intervention. Acute MI was defined by the presence of chest pain < 12 hours with significant ST elevation and positive cardiac enzymes. Blood samples were obtained at the time of mechanical reperfusion. All patients signed an informed consent. Peripheral blood

mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll gradient. Monocytes were purified by negative selection using the Monocyte Isolation Kit II (Myltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) as described before²⁸. Differentiation was achieved by adding 50 ng/mL macrophage-colony stimulating factor (M-CSF, Peprotech, Levallois-Peret, France) for 7 days. Human primary cardiac fibroblasts purchased from TCS CellWorks Ltd (Buckingham, UK) were cultured in fibroblast medium supplemented with fibroblast growth supplement and 2 % FBS (TCS CellWorks Ltd). Myofibroblasts were obtained by treating fibroblasts with 10 ng/mL TGF- β for 24 hours. Prior the experiment, fibroblasts and myofibroblasts were rendered quiescent in fibroblast medium supplemented with insulin (10 μ g/ml), transferrin (5.5 μ g/ml), sodium selenite (5 pg/ml), BSA (0.5 mg/ml) and linoleic acid (4.7 μ g/ml) for 5 hours. Cells were incubated with Ado and EHNA to prevent Ado metabolism or with agonists of Ado receptors. Antagonists of Ado receptors were added 15 min prior to Ado treatment. Modulators of Ado metabolism were dipyridamole (DIP), which inhibits Ado transferase and iodotubericidin (ITU), which inhibits adenosine kinase. LPS (from *Escherichia coli* 026:B6), Monophosphoryl Lipid A (MLA, from *Escherichia coli* F583), Diphosphoryl Lipid A (DLA, from *Escherichia coli* F583), Heparan sulfate (from Bovine kidney), HMGB1, hyaluronan, biglycan or IL-1 β were used as cell activators. Cells and conditioned medium were harvested and stored at -80°C until use.

The dose of Ado used in these experiments was relatively high (10 μ mol/L). However, it is known that Ado accumulates extracellularly to high levels (up to 100 μ mol/L) in ischemic conditions²⁹.

Animal experiments

Transgenic mice with cardiac-specific and inducible overexpression of A1 or A2a receptors were used in this study. These mice have been previously characterized^{30, 31}. Transgene

induction was triggered by doxycycline administration. Plasma and left ventricles were harvested and stored at -80°C.

Real-time quantitative PCR (qPCR)

Total RNA from cultured cells was isolated using TriReagent[®] and the RNeasy[®] mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Potential contaminating genomic DNA was digested by DNase I treatment (Qiagen). One µg of total RNA was reverse-transcribed using the Superscript[®] II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). PCR primers were designed using the Beacon Designer software (Premier Biosoft, Palo Alto, USA) and were chosen to encompass an intron. Primer details are shown in Table 1. PCR was performed using the iCycler[®] and the IQ[™] SYBR[®] Green Supermix (Biorad, Nazareth, Belgium). 1/10 dilutions of cDNA were used. PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C, 30 sec at 95°C and 1 min annealing (40-fold). Optimal annealing temperature was determined for each primer pair. Melting point analysis was obtained after 80 cycles for 10 sec from 55°C up to 95°C. Each run included negative reaction controls. β-actin was chosen as housekeeping gene for normalization. Expression levels were calculated by the relative quantification method ($\Delta\Delta C_t$) using the Genex software (Biorad) which takes into account primer pair efficiency.

Flow cytometry

Brefeldin A was added in macrophage cultures 12 hours before harvesting to block cytokine production into Golgi apparatus. Macrophages were harvested using a cell dissociation buffer and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS, Cambrex, Verviers, Belgium) supplemented with 1% BSA. 150 000 cells were stained with antibodies against CD14 (mouse IgG2b clone M5E2, PE-Cy7-coupled, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium) and CD45

(mouse IgG1 clone 2D1, PerCP-coupled, BD Biosciences) in 50 μ l PBS-1% BSA for 30 min and then washed. After fixation and permeabilisation with the Cytotfix/cytoperm Plus kit (BD Biosciences), detection of intracellular VEGF was achieved with antibodies against VEGF (mouse IgG2a clone 23410, PE-coupled, R&D Systems, Oxon, UK). Proper isotype controls were used for each antibody. 20 000 events were analysed on a BD FACSCanto™ flow cytometer and analysis was performed with the FACSDiva™ software (BD Biosciences). Histograms were performed with the FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, USA).

Immunoblotting

Preparation of whole and nuclear cells extracts. Whole cells extracts were prepared using Cell lysis buffer (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA) added with protease inhibitor cocktail (Prophac, Howald, Luxembourg) and 0.1mM PMSF. For nuclear extracts, cells were washed with PBS, centrifuged at 800xg 4°C for 3 min, and suspended in 200 μ l of buffer A [10 mM Hepes (pH 7.9), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 300 mM sucrose, 1 mM NaVO₃, 0.5mM DTT, protease inhibitor cocktail]. After 10 min incubation on ice, cells were lysed by 0.1% Nonidet P-40 (Prophac). Nuclei were pelleted by centrifugation at 800xg 4°C for 1 min. Supernatants containing cytoplasmic extracts were stored at -80°C. Nuclei were washed with 200 μ l of buffer A and then lysed with 30 μ l of buffer B [20 mM Hepes (pH 7.9), 420 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 25% of glycerol, 1 mM NaVO₃, 0.5mM DTT, protease inhibitor cocktail]. After 15 min incubation on ice, lysed nuclei were centrifuged at 13,400xg 4°C for 5 min. Supernatants containing the nuclear extracts were stored at -80°C. Protein concentration was determined using the DC Protein Assay (Biorad).

Western blotting. Proteins were resolved on 8% SDS/polyacrylamide gels and transferred to polyvinylidene difluoride membranes. Blocking was achieved with Tris-buffered saline (TBS)

containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) non-fat dry milk for 1 hour at room temperature. After washing, membranes were incubated overnight at +4°C with 1:1000 dilution of rabbit anti-human HIF-1 α antibody (Cell Signaling). To control for sample loading, membranes were stripped and reprobed with 1:10,000 dilution of mouse anti-human β -actin antibody (Abcam, Cambridge, UK). Secondary antibodies were donkey anti-rabbit or donkey anti-mouse coupled to HRP (Jackson Immunoresearch, West Grove, USA). Chemiluminescence detection was performed (Pierce, Rockford, IL).

Trans-AM HIF-1 α assay

Activation of HIF-1 α was quantified using an ELISA-based assay kit (Trans-AM HIF-1, Active Motif, Rixensart, Belgium) following the manufacturer's instructions. Nuclear preparations were performed as described above. The active forms of HIF-1 -HIF-1 α and β -contained in nuclear extracts bind to an oligonucleotide containing the HIF-1 binding site attached to a 96-well plate. Detection is achieved using conventional ELISA technology.

ELISA

For human samples, VEGF165 and sFlt-1 concentrations were measured by ELISA using the Quantikine DVE00 and DVR100B kits, respectively (R&D Systems). Detection limits of the assays were 5 pg/mL for VEGF and 3.5 p/mL for sFlt-1. Kits used for mouse samples were the Quantikine DMMV00 and MVR100 kits (R&D Systems), with detection limits of 3 pg/mL for VEGF and 9.8 p/mL for sFlt-1.

Cytotoxicity assay

To determine a potential cytotoxicity of any of the drugs used in this study, cell supernatants were assayed for lactate dehydrogenase (LDH) activity using a LDH-based cytotoxicity detection kit (Prophac) as described by the manufacturer. No significant cytotoxicity was detected for any of the drugs used at the concentrations mentioned in this paper.

Statistical analysis

Results are mean \pm S.D. Data with a Gaussian distribution were analyzed by paired t-test.

Mann-Whitney (unpaired data) or Wilcoxon (paired data) tests were used for non-Gaussian data. A *P* value < 0.05 was considered significant.

Results

Adenosine and TLR4 activation increase VEGF production by human monocytes/macrophages. An emerging concept is that Ado stimulates angiogenesis mainly through VEGF-dependent mechanisms. When VEGF levels were determined in conditioned medium of primary human macrophages, it was observed that LPS significantly up-regulated VEGF secretion. Upon co-stimulation with Ado and LPS, this response was enhanced, (22-fold increase after 24 hours, $P < 0.0001$ vs control, Figure 1A). This secretion was paralleled by an increase of VEGF mRNA expression, reaching a robust 200-fold increase when cells were treated with Ado and LPS ($P = 0.02$ vs control, Figure 1B). Flow cytometry experiments were performed to assess the levels of VEGF inside the cells (Figure 1C-D). Only CD14/CD45 double positive cells were selected for these analyses. Whereas almost all macrophages expressed VEGF, only 22% of the monocytes had detectable levels of intracellular VEGF. Untreated macrophages expressed 15-fold more VEGF than monocytes. Both Ado and LPS increased the percentage of VEGF-expressing monocytes. In addition, Ado and LPS increased the levels of VEGF in both monocytes and macrophages (Figure 1C-D). Therefore, Ado and LPS increased both the number of VEGF-positive monocytes and macrophages and the amount of VEGF produced by the cells.

We tested the ability of other TLR4 ligands to modulate VEGF production. MLA and DLA used at doses ranging from 10 to 1000 ng/mL both failed to modify VEGF expression, either on untreated or Ado-pretreated macrophages (data not shown). Hyaluronan alone potently triggered VEGF production and Ado pre-treatment amplified this effect (Figure 1D). Resulting VEGF concentrations in the conditioned medium were equivalent to those obtained with LPS (Figure 1A). HS dose-dependently increased VEGF production when applied onto Ado-treated macrophages (Figure 1E). HMGB1 (not shown), biglycan (Figure 1F) and IL-1 β

(Figure 1G) were not able to induce VEGF by either untreated or Ado-treated macrophages. In these experiments Ado induced VEGF production to the same extent (100-150 pg/mL) as with LPS (Figure 1A).

These data show that activation of TLR4 by endogenous ligands potentially involved in the remodeling process can trigger a significant production of VEGF and that Ado can amplify this production.

Adenosine induces VEGF production by cardiac (myo)fibroblasts. Several cell types contribute to VEGF production in the heart. We evaluated whether Ado also modulated VEGF production by primary human cardiac fibroblasts or myofibroblasts obtained after treatment of fibroblasts with TGF- β . Ado induced a dose-dependent increase of VEGF concentration in cell supernatants from both cell types (Figure 2). Therefore, Ado is able to trigger VEGF production by multiple cell types.

Blockade of Ado transferase increases VEGF production. Ado enters the cells through its transmembrane transporter Ado transferase. We examined whether blocking this transport, thereby increasing the concentration of extracellular Ado and its binding to Ado receptors, could affect VEGF production. When macrophages were treated with DIP, an inhibitor of Ado transferase, VEGF production was increased (Figure 3A). This effect was exacerbated in the presence of exogenous Ado (Figure 3B). In contrast, inhibition of Ado kinase by ITU had no effect on VEGF, in the presence (Figure 3A) or absence (Figure 3B) of exogenous Ado. Of note, higher concentrations of ITU were cytotoxic. These results show that both endogenous and exogenous Ado can increase VEGF production and that this effect is most probably mediated by binding of Ado to its membrane receptors.

Adenosine blunts TLR4-induced sFlt-1 production. The soluble form of VEGFR1, sFlt-1, binds free VEGF and prevents its further binding to membrane VEGFR1. We investigated whether Ado had an effect on this anti-angiogenic process. Macrophages were first challenged with LPS to induce sFlt-1 production (Figure 4A). Measured 24 hours after LPS challenge, sFlt-1 concentration in conditioned medium was decreased by 43% in the presence of Ado ($P=0.006$ vs LPS, Figure 4A). This inhibitory effect was again found when sFlt-1 was induced by other TLR4 ligands such as HS (Figure 4B) and IL-1 β (Figure 4C). While hyaluronan also triggered a significant production of sFlt-1, Ado had no effect on this production (Figure 4D). Nor MLA, DLA, HMGB1 or biglycan were able to induce a detectable release of sFlt-1 (not shown).

Therefore, these results show first that not all TLR4 ligands trigger sFlt-1 production and second that the inhibitory effect of Ado on sFlt-1 production depends on the type of TLR4 ligand inducing this production.

Effects of Ado on other regulators of angiogenesis. Angiogenesis is under the control of a complex network of pro- and anti- angiogenic factors³². The balance between these factors dictate whether angiogenesis has to be stimulated or slowed down. While investigating the expression of some of these factors in Ado- and/or LPS- stimulated macrophages, we found that thrombospondin-2 and endostatin, both anti-angiogenic, were undetectable in macrophages treated with Ado and LPS (not shown). These data strengthened the pro-angiogenic capacity of Ado.

The production of VEGF and sFlt-1 is associated with HIF-1 α activation. The main transcription factor regulating the expression of VEGF in the settings of ischemia is the Hypoxia Inducible Factor- α . Whether sFlt-1 expression is also under the control of HIF-1 α is

unclear. As observed with VEGF, both Ado and LPS increased HIF-1 α mRNA levels, reaching an 8-fold induction after 24 hours ($P=0.0007$ vs control, Figure 5A). Of note, HS and hyaluronan, but not biglycan, also increased HIF-1 α mRNA and this increase was higher in the presence of Ado, observations that corroborate the regulation of VEGF expression displayed in Figure 1 (data not shown). The expression of VEGF and HIF-1 α evolved sequentially, HIF-1 α being rapidly induced after LPS challenge and VEGF induction starting 6 hours later (Figure 5B). 24 hours after LPS treatment, HIF-1 α expression returned to baseline level while VEGF reached its peak expression (Figure 5B). At all time points between 2 and 24 hours, Ado and LPS increased HIF-1 α and VEGF expression (not shown). HIF-1 α protein was then measured in total, cytoplasmic and nuclear cellular fractions. LPS increased HIF-1 α expression in total and nuclear extracts but not in cytoplasmic extracts, showing that LPS induces the nuclear translocation of HIF-1 α (Figure 5C-D). In contrast, Ado increased HIF-1 α expression in total and cytoplasmic extracts but not in nuclear extracts (Figure 5C-D). Collectively, these data suggest that LPS controls VEGF and sFlt-1 production through increased transcription and nuclear translocation of HIF-1 α . In contrast, Ado appears to only protect HIF-1 α from a rapid degradation.

Adenosine and LPS regulate the expression of the transcriptional coactivator PGC-1 α). The absence of nuclear translocation of HIF-1 α after Ado and LPS treatment could not explain the increased release of VEGF shown in Figure 1A and therefore suggested that Ado controls the activation of another transcriptional activator of VEGF. We tested whether the transcriptional coactivator PGC-1 α could mediate the effect of Ado on VEGF. LPS potently inhibited PGC-1 α expression and Ado partially prevented this inhibition (Figure 5E). Four hours after the addition of LPS, PGC-1 α mRNA was more than two-fold more abundant in Ado-treated cells

compared with vehicle-treated cells (Figure 5E). Therefore, PGC-1 α may account for the stimulation of VEGF production when Ado precedes LPS challenge.

Adenosine and LPS regulate the expression of their receptors. The effects of Ado are mediated through binding to one or more of its receptors (A1, A2a, A2b and A3), each activating distinct signaling cascades. The relative distribution of these receptors on human macrophages was determined. The expression of A1 mRNA was below the sensitivity of the qPCR assay in all samples tested (not shown). Under steady state conditions, expression levels of AdoRs were as follows: A2b>A3>A2a (Figure 6). Ado induced a 4-fold up-regulation of A3 expression. Addition of LPS highly increased A2a expression (100-fold) and decreased the expression of A2b and A3. Of note, Ado amplified the effect of LPS on A2a. In the presence of Ado and LPS, the expression of A2a was nearly 300-fold increased (Figure 6). These data reveal that the expression of Ado receptors is under tight control of LPS and Ado itself.

The A2a receptor mediates the effects of Ado on VEGF production. Investigation of the Ado receptors involved in the effects of Ado on VEGF and sFlt-1 was first performed using a pharmaceutical approach. Drugs used were agonists of A2a (C141) and A3 (IB-MECA) receptors on one hand and antagonists of A2a (SCH58261), A2b (MRS1754) and A3 (PSB10) receptors on the other hand. Both the A2a and A3 agonists were able to reproduce the increase of VEGF (Figure 7A) and the decrease in sFlt-1 (Figure 7C) induced by Ado. These effects were partly inhibited by the A2a and A2b antagonists (Figure 7B-D).

Secondly, in vivo experiments using transgenic mice with cardiac-specific and inducible overexpression of A1 or A2a receptors were undertaken. VEGF and sFlt-1 levels were measured in plasma and heart tissues of mice following transgene induction or without

induction. Wild-type littermates were used as controls. Mice harboring the A1 transgene had similar plasma levels of VEGF, whether they were induced for A1 overexpression or not (Figure 8A). Regarding the A2a transgenic mice, only one mouse out of four had detectable plasma VEGF in the absence of induction. Upon induction of A2a receptor overexpression, three mice out of four had detectable plasma VEGF (Figure 8A). In general, transgenic mice had slightly lower plasma levels of VEGF compared to wild-type littermates (Figure 8A). Of note, the detection threshold for the assay was 3 pg/mL. Plasma levels of sFlt-1 were low in all mice and often below the detection limit of the assay (9.8 pg/mL). No differences in plasma sFlt-1 were observed between the five groups of mice (data not shown). This is consistent with the low production of sFlt-1 and with the absence of effect of Ado on sFlt-1 production by cultured macrophages when they are not stimulated by LPS (Figure 4). Measured in cardiac tissue, VEGF and HIF-1 α mRNA expression was enhanced by A2a receptor overexpression (Figure 8B). This is consistent with the up-regulation of VEGF and HIF-1 α mRNA expression by Ado in cultured macrophages (Figures 1 and 5). As it was observed for plasma level, cardiac mRNA level of VEGF was lower in transgenic mice compared to wild-type littermates (Figure 8B).

All together, data from Figures 6, 7, and 8 point out the A2a receptor as the main mediator of the effects of Ado on VEGF and sFlt-1 secretion. However, contribution of the other types of AdoRs cannot be fully excluded.

Angiogenesis is enhanced in A2a-overexpressing mice. WB with endothelial cells marker on heart homogenates from Feldman's mice (Figure 8).

The pro-angiogenic effect of Ado is exacerbated in patients with acute MI. Large amounts of Ado are released locally in the ischemic heart as a result of ATP breakdown. To test whether

the pro-angiogenic effects of Ado described here occur in the settings of acute MI, monocytes freshly isolated from the blood of patients following acute MI and healthy volunteers were harvested, differentiated to macrophages and treated with LPS and/or Ado. The up-regulation of VEGF secretion and the down-regulation of sFlt-1 secretion by Ado were present in patients with acute MI (Figure 9). In addition, Figure 9A shows that the effect of Ado on VEGF was more potent in macrophages from MI donors (4-fold) than healthy controls (2-fold). The down-regulation of sFlt-1 shown in Figure 9B tended to be enhanced in macrophages from MI donors (31% inhibition) compared with healthy controls (27% inhibition) but this effect was not statistically significant ($p=0.17$). Therefore, the pro-angiogenic effects of Ado are stimulated by acute MI.

Discussion

The main finding of the present study is the identification of the strong pro-angiogenic capacity of Ado. Since this effect is present in patients with acute MI, our finding suggests the testing of Ado analogs to stimulate angiogenesis post-MI and thus dampens the adverse effects of LV remodeling.

Macrophages play a key role in LV remodeling after acute MI. Monocytosis predicts poor outcome after MI (LV dilatation, impaired ejection fraction)³³⁻³⁵. Mice that overexpress monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) show an induction of macrophage infiltration and neovascularisation, and an improvement in LV function after MI³⁶. Injections of activated macrophages into the ischemic myocardium after coronary ligation accelerate neovascularisation, tissue repair and improve cardiac remodeling and function³⁷. Conversely, macrophage depletion impairs wound healing and increases LV remodeling after myocardial injury in mice³⁸. Our study confirms in human cells that macrophages release large amounts of VEGF upon co-stimulation with Ado and LPS. In addition, we provide compelling evidence that not all TLR4 agonists are able to induce VEGF.

Indeed, aware that LPS is unlikely present in significant amounts during ischemia, we tested the ability of other endogenous or exogenous TLR4 ligands to induce VEGF production. Hyaluronan is a polymer of disaccharides which accumulates in the infarcted myocardium³⁹. A mixed ester of hyaluronan with butyric and retinoic acid has been shown to improve cardiac repair after MI through stimulation of VEGF-mediated neoangiogenesis⁴⁰. Of note, hyaluronan alone does not stimulate but rather inhibits cardiogenesis⁴¹, an observation that contrasts with our results showing induction of VEGF by hyaluronan per se. Hyaluronan is a sulphated glycosaminoglycan which appears in the early remodeling phase of the infarcted heart whereas heparan sulphate belongs to the family of proteoglycans which appears during the late remodeling phase. We recently reported that HA but not HS is able to induce the

secretion of matrix metalloproteinase -9 (MMP-9) by macrophages⁴². Here, we observed that while HA triggered a strong production of VEGF, HS failed to induce VEGF production. Together, these data suggest that HA has a dual effect on neoangiogenesis during early remodeling: stimulation of endothelial cells proliferation by VEGF and facilitation of their migration by MMP-9-mediated collagen digestion. A recent work revealed the potential of syndecan-1, a member of the heparan- and chondroitin-sulfate carrying transmembrane proteins, to protect the heart against dilatation and dysfunction after MI in mice⁴³. Whether other members of the heparan- and chondroitin-sulfate carrying transmembrane proteins family have potential therapeutic benefits in the setting of MI and heart failure would be interesting to determine. Among other putative TLR4 ligands, we studied HMGB1 and biglycan. HMGB1, a chromosomal protein involved in transcription, is a potent inducer of cardiac regeneration after MI⁴⁴. Biglycan, a core protein with two glycosaminoglycan chains, is increased after MI⁴⁵ and contributes to adaptive LV remodeling⁴⁶. HMGB1 and biglycan failed to induce a detectable production of VEGF, as this was the case for the LPS-derivatives MLA and DLA, which lack the polysaccharide chains of LPS. Therefore, VEGF may not contribute to the cardioprotective properties of HMGB1 and biglycan. Actually, biglycan is required for stable collagen matrix formation⁴⁶. However, we confirm that hyaluronan is a potent inducer of VEGF and that this effect may account for its protective role in cardiac regeneration. Mechanistically, our findings suggest that induction of VEGF production by TLR4 requires the binding of a polysaccharide chain such as that found in LPS or hyaluronan. The effect of Ado on VEGF production appears to be additive to the other triggers of VEGF production, suggesting that Ado does not directly interfere with TLR4 signaling pathway leading to VEGF production.

The profile of cytokine expression after MI described by Sasayama group²⁶ revealed a strong level of IL-1 β in macrophages during the early phase after MI. IL-1 β was suggested to

mediate the activation of TLR4 observed in the injured myocardium ¹⁷ and to inhibit the progression of LV remodeling ²⁵. In our experiments, IL-1 β failed to trigger VEGF production, suggesting that neoangiogenesis does not significantly contribute to the protective role of IL-1 β during the acute phase after MI.

Angiogenesis is a complex phenomenon regulated by a network of multiple pro- and anti- angiogenic factors ³². This reveals the necessity to study angiogenesis at multiple levels, considering one factor alone may not reflect what really happens. In this prospect, we studied other actors of the angiogenic balance which dictates whether angiogenesis has to be dampened or stimulated. The soluble form of the VEGFR1 (aka sFlt-1) is one such anti-angiogenic factor. Expressed by monocytes/macrophages, sFlt-1 is released into the extracellular milieu where it binds free VEGF, thereby preventing its further binding to membrane-associated VEGFR1. Whereas sFlt-1 has been implicated in the pathogenesis of preeclampsia, its role in cardiovascular disorders is still poorly characterized. It is only known that its level rises in the late phase post-MI, suggesting a potential role on LV remodeling ¹². In the present study, we show for the first time that Ado acts as a potent inhibitor of sFlt-1 production triggered by TLR4 activation, thus identifying another mechanism through which Ado may positively regulate LV remodeling.

Another potent factor regulating angiogenesis is the transcription factor HIF-1 α . Hypoxia induces the expression of VEGF ⁹ and sFlt-1 ⁴⁷ through up-regulation of HIF-1 α . In our hands, HIF-1 α mRNA levels were transiently increased in LPS-treated macrophages and this increase was amplified and sustained in the presence of Ado. The increase of HIF-1 α expression was significant (8-fold) and preceded the induction of VEGF expression by LPS and Ado. Therefore, HIF-1 α activation following LPS challenge mediates the increased VEGF and sFlt-1 expression observed in the present study. These data are in accordance with recent reports showing that HIF-1 α expression is induced by LPS ⁴⁸. However, the regulation

of VEGF and sFlt-1 expression by Ado most probably uses another pathway since Ado does not enhance HIF-1 α nuclear translocation.

The transcriptional coactivator PGC-1 α regulates VEGF expression independently of HIF-1 α during hypoxia¹⁰. A strong down-regulation of PGC-1 α mRNA was measured upon LPS challenge, consistently with a previous study using a rat cardiomyocyte cell line⁴⁹. The fact that Ado prevented this effect suggests that PGC-1 α activation may account for the potentiation of the LPS-induced production of VEGF. This is the first report of an effect of Ado on PGC-1 α .

The study of the interaction between LPS and AdoRs showed that LPS up-regulates the A2a receptor in macrophages and it was speculated that this was a feedback mechanism to limit macrophage activation⁵⁰. Consistently, we report here that LPS and Ado potently induced the expression of A2a (300-fold increase). The transcription profile of AdoRs expression suggested that the A2a receptor may be involved in the effects of Ado described here. A pharmacological approach with Ado analogs also pointed out the A2a receptor. In addition, VEGF production was increased by overexpression of A2a but not A1 receptor in mice. Since the A2a transgene is under the control of the alpha-myosin heavy chain promoter, our data show that cardiomyocytes produce VEGF in response to A2a overexpression. Therefore, our data show that the A2a receptor mediates the up-regulation of VEGF by Ado, consistently with^{14,51}. We also report that Ado triggers VEGF production by multiple cardiac cell types such as macrophages, cardiomyocytes and fibroblasts. In addition, our results suggest that the A3 receptor is also able to mediate this effect. This was unexpected since the increase of VEGF by NECA and LPS was absent in A3-deficient mice¹⁴. This discrepancy may be due to species differences in the affinity of Ado agonists to bind to their target receptors. In addition, the A3 agonist used here, IB-MECA, may also interfere with the A2a receptor⁵². The exact role of the A3AR in the cardioprotective effects of Ado is a matter of

intense investigation. In studies by Leibovich and coll.^{14, 48, 51}, LPS alone was unable to stimulate VEGF production by macrophages, in sharp contrast with our results and others⁵³ showing that LPS is a strong inducer of VEGF expression. Again, this probably emanates from species differences, the macrophages used in our study and in⁵³ being primary human macrophages whereas those used in^{14, 51} are murine peritoneal macrophages.

Two distinct subsets of monocytes are sequentially recruited in the heart after MI depending on the chemokine profile⁵⁴. First, CCR2⁺ monocytes bearing the CD14 and CD16 receptors and producing TNF- α invade the infarcted area following a gradient of MCP-1, exhibit inflammatory functions and digest damaged tissue. Second, CX3CR1^{hi} monocytes lacking the CD16 receptor and producing VEGF are recruited by a gradient of fractalkine (CX3CL1) and exhibit pro-angiogenic properties which allow for tissue repair. Our data showing that Ado shifts monocytes from a pro-inflammatory to a pro-angiogenic phenotype accurately identify a cardioprotective effect of Ado in the second phase of the response to ischemic injury. While CD14^{hi}/CD16⁻/CCR2⁻/CX3CR1^{hi} cells are thought to give rise to resident tissue cells, CD14⁺/CD16⁺/CCR2⁺/CX3CR1^{lo} cells give rise to macrophages and dendritic cells. In addition, CD14^{hi}/CD16⁻/CCR2⁻/CX3CR1^{hi} cells appear to be involved in the resolution of the inflammatory response. Therefore, our data reveal a new anti-inflammatory role for Ado.

A provocative finding of the present study is that stimulation of angiogenesis by Ado is present and stronger after acute MI. This raised the possibility that MI could prime monocytes for enhanced responsiveness to Ado. However, the expression of AdoRs was not significantly different between acute MI patients and healthy volunteers (not shown). Since Ado is released in large amounts in the myocardium after an ischemic period, Ado may directly induce a positive feedback to improve the response to further Ado molecules. Our observation that Ado induced a 4-fold up-regulation of A3 expression is consistent with this

assumption. Other mechanisms could explain that could enhance Ado responsiveness, such as increased breakdown of ATP by the ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (CD39/ENTPD1) – which increases Ado concentration in the extracellular milieu – are under investigation. Indeed, ENTPD1 expression is enhanced following myocardial ischemia/reperfusion and provides cardioprotection⁵⁵.

Among the TLR4 agonists used in this study, heparan sulphate – which is involved in endothelial barrier integrity – appears to act in concert with Ado to stimulate angiogenesis, a natural repair mechanism, providing an interface between the innate immune response and tissue repair. One of the earliest responses to tissue injury is an increase in blood flow and vascular permeability to promote wound healing. The implications of a synergistic interaction between a product of ischemia (Ado) and products of infection/inflammation (TLRs agonists) are far-reaching. Indeed, agonists of the TLRs may be used in the future to induce a robust stimulation of angiogenesis at the very site of injury, where ATP is degraded into Ado. This effect could be further enhanced with Ado-regulating agents which limit the metabolism of Ado. All together, this could potentially provide a novel approach to the ischemic heart through targeted angiogenesis.

In conclusion, our results identify some mechanisms involved in the cross-talk between Ado and TLR4 which stimulate angiogenesis. Ado appears to set the stage for a spiralling effect that results in dramatic increase of VEGF and decrease of sFlt-1 production by macrophages. Although administration of angiogenic growth factors in animal models of ischemia improves neovascularization, clinical trials of VEGF administration are mostly disappointing⁵⁶⁻⁵⁸. Therefore, we suggest testing pharmacologic co-manipulations with Ado and TLR4 agonists to stimulate angiogenesis in animal models of MI.

References

1. Fukuda S, Kaga S, Sasaki H, Zhan L, Zhu L, Otani H, Kalfin R, Das DK, Maulik N. Angiogenic signal triggered by ischemic stress induces myocardial repair in rat during chronic infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36(4):547-559.
2. Berne RM. Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. *Am J Physiol.* 1963;204:317-322.
3. Belardinelli L, Vogel S, Linden J, Berne RM. Antiadrenergic action of adenosine on ventricular myocardium in embryonic chick hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1982;14(5):291-294.
4. Adair TH. Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;289(2):R283-R296.
5. Ethier MF, Chander V, Dobson JG, Jr. Adenosine stimulates proliferation of human endothelial cells in culture. *Am J Physiol.* 1993;265(1 Pt 2):H131-138.
6. Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ. Adenosine and hypoxia stimulate proliferation and migration of endothelial cells. *Am J Physiol.* 1988;255(3 Pt 2):H554-562.
7. Torry RJ, O'Brien DM, Connell PM, Tomanek RJ. Dipyridamole-induced capillary growth in normal and hypertrophic hearts. *Am J Physiol.* 1992;262(4 Pt 2):H980-986.
8. Montesinos MC, Shaw JP, Yee H, Shamamian P, Cronstein BN. Adenosine A(2A) receptor activation promotes wound neovascularization by stimulating angiogenesis and vasculogenesis. *The American journal of pathology.* 2004;164(6):1887-1892.
9. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1995;92(12):5510-5514.
10. Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM, Baek KH, Rosenzweig A, Spiegelman BM. HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature.* 2008;451(7181):1008-1012.
11. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacological reviews.* 2004;56(4):549-580.
12. Kodama Y, Kitta Y, Nakamura T, Takano H, Umetani K, Fujioka D, Saito Y, Kawabata K, Obata JE, Mende A, Kobayashi T, Kugiyama K. Atorvastatin increases plasma soluble Fms-like tyrosine kinase-1 and decreases vascular endothelial growth factor and placental growth factor in association with improvement of ventricular function in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(1):43-50.
13. Gu JW, Brady AL, Anand V, Moore MC, Kelly WC, Adair TH. Adenosine upregulates VEGF expression in cultured myocardial vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1999;277(2 Pt 2):H595-602.
14. Leibovich SJ, Chen JF, Pinhal-Enfield G, Belem PC, Elson G, Rosania A, Ramanathan M, Montesinos C, Jacobson M, Schwarzschild MA, Fink JS, Cronstein B. Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin. *The American journal of pathology.* 2002;160(6):2231-2244.
15. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Huang Y, Tikhomirov OY, Blackburn MR, Biaggioni I, Carbone DP, Feoktistov I, Dikov MM. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood.* 2008;112(5):1822-1831.

16. Macedo L, Pinhal-Enfield G, Alshits V, Elson G, Cronstein BN, Leibovich SJ. Wound Healing Is Impaired in MyD88-Deficient Mice. A Role for MyD88 in the Regulation of Wound Healing by Adenosine A2A Receptors. *The American journal of pathology*. 2007.
17. Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(3):271-280.
18. Oyama J, Blais C, Jr., Liu X, Pu M, Kobzik L, Kelly RA, Bourcier T. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation*. 2004;109(6):784-789.
19. Shimamoto A, Chong AJ, Yada M, Shomura S, Takayama H, Fleisig AJ, Agnew ML, Hampton CR, Rothnie CL, Spring DJ, Pohlman TH, Shimpo H, Verrier ED. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I270-274.
20. Stapel H, Kim SC, Osterkamp S, Knuefermann P, Hoefl A, Meyer R, Grohe C, Baumgarten G. Toll-like receptor 4 modulates myocardial ischaemia-reperfusion injury: Role of matrix metalloproteinases. *Eur J Heart Fail*. 2006;8(7):665-672.
21. Zhu X, Zhao H, Graveline AR, Buys ES, Schmidt U, Bloch KD, Rosenzweig A, Chao W. MyD88 and NOS2 are essential for toll-like receptor 4-mediated survival effect in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(4):H1900-1909.
22. Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, Hoefl IE, Nederhoff MG, Goumans MJ, Doevendans PA, van Echteld CJ, Joles JA, Quax PH, Piek JJ, Pasterkamp G, de Kleijn DP. Toll-Like Receptor 4 Mediates Maladaptive Left Ventricular Remodeling and Impairs Cardiac Function Following Myocardial Infarction. *Circulation research*. 2007.
23. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science*. 2007;316(5831):1628-1632.
24. Tang AH, Brunn GJ, Cascalho M, Platt JL. Pivotal advance: endogenous pathway to SIRS, sepsis, and related conditions. *J Leukoc Biol*. 2007;82(2):282-285.
25. Hwang MW, Matsumori A, Furukawa Y, Ono K, Okada M, Iwasaki A, Hara M, Miyamoto T, Touma M, Sasayama S. Neutralization of interleukin-1beta in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(5):1546-1553.
26. Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*. 1998;98(2):149-156.
27. Wu H, Chen G, Wyburn KR, Yin J, Bertolino P, Eris JM, Alexander SI, Sharland AF, Chadban SJ. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(10):2847-2859.
28. Ernens I, Rouy D, Velot E, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca2+ pathway. *Circulation research*. 2006;99(6):590-597.
29. Van Belle H, Goossens F, Wynants J. Formation and release of purine catabolites during hypoperfusion, anoxia, and ischemia. *Am J Physiol*. 1987;252(5 Pt 2):H886-893.
30. Chan TO, Funakoshi H, Song J, Zhang XQ, Wang J, Cheung PH, DeGeorge J, B.R., Li X, Zhang J, Herrmann DE, Diamond M, Houser SR, Koch WJ, Cheung JY, Feldman AM. Cardiac-Restricted Overexpression of the A2A-Adenosine Receptor

- Increases Contractile Performance in Mice By Altering Calcium Handling. *CTS Clinical and Translational Science*. 2007.
31. Funakoshi H, Chan TO, Good JC, Libonati JR, Piuholo J, Chen X, MacDonnell SM, Lee LL, Herrmann DE, Zhang J, Martini J, Palmer TM, Sanbe A, Robbins J, Houser SR, Koch WJ, Feldman AM. Regulated overexpression of the A1-adenosine receptor in mice results in adverse but reversible changes in cardiac morphology and function. *Circulation*. 2006;114(21):2240-2250.
 32. Abdollahi A, Schwager C, Kleeff J, Esposito I, Domhan S, Peschke P, Hauser K, Hahnfeldt P, Hlatky L, Debus J, Peters JM, Friess H, Folkman J, Huber PE. Transcriptional network governing the angiogenic switch in human pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(31):12890-12895.
 33. Maekawa Y, Anzai T, Yoshikawa T, Asakura Y, Takahashi T, Ishikawa S, Mitamura H, Ogawa S. Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39(2):241-246.
 34. Mariani M, Fetiveau R, Rossetti E, Poli A, Poletti F, Vandoni P, D'Urbano M, Cafiero F, Mariani G, Klersy C, De Servi S. Significance of total and differential leucocyte count in patients with acute myocardial infarction treated with primary coronary angioplasty. *Eur Heart J*. 2006;27(21):2511-2515.
 35. Barron HV, Cannon CP, Murphy SA, Braunwald E, Gibson CM. Association between white blood cell count, epicardial blood flow, myocardial perfusion, and clinical outcomes in the setting of acute myocardial infarction: a thrombolysis in myocardial infarction 10 substudy. *Circulation*. 2000;102(19):2329-2334.
 36. Morimoto H, Takahashi M, Izawa A, Ise H, Hongo M, Kolattukudy PE, Ikeda U. Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circulation research*. 2006;99(8):891-899.
 37. Leor J, Rozen L, Zulloff-Shani A, Feinberg MS, Amsalem Y, Barbash IM, Kachel E, Holbova R, Mardor Y, Daniels D, Ocherashvilli A, Orenstein A, Danon D. Ex vivo activated human macrophages improve healing, remodeling, and function of the infarcted heart. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I94-100.
 38. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *The American journal of pathology*. 2007;170(3):818-829.
 39. Waldenstrom A, Martinussen HJ, Gerdin B, Hallgren R. Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88(5):1622-1628.
 40. Ventura C, Cantoni S, Bianchi F, Lionetti V, Cavallini C, Scarlata I, Foroni L, Maioli M, Bonsi L, Alviano F, Fossati V, Bagnara GP, Pasquinelli G, Recchia FA, Perbellini A. Hyaluronan mixed esters of butyric and retinoic Acid drive cardiac and endothelial fate in term placenta human mesenchymal stem cells and enhance cardiac repair in infarcted rat hearts. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282(19):14243-14252.
 41. Ventura C, Maioli M, Asara Y, Santoni D, Scarlata I, Cantoni S, Perbellini A. Butyric and retinoic mixed ester of hyaluronan. A novel differentiating glycoconjugate affording a high throughput of cardiogenesis in embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(22):23574-23579.

42. Velot E, Haas B, Leonard F, Ernens I, Rolland-Turner M, Schwartz C, Longrois D, Devaux Y, Wagner DR. Activation of the adenosine-A3 receptor stimulates matrix metalloproteinase-9 secretion by macrophages. *Cardiovascular research*. 2008.
43. Vanhoutte D, Schellings MW, Gotte M, Swinnen M, Herias V, Wild MK, Vestweber D, Chorianopoulos E, Cortes V, Rigotti A, Stepp MA, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM, Heymans S. Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation*. 2007;115(4):475-482.
44. Limana F, Germani A, Zacheo A, Kajstura J, Di Carlo A, Borsellino G, Leoni O, Palumbo R, Battistini L, Rastaldo R, Muller S, Pompilio G, Anversa P, Bianchi ME, Capogrossi MC. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit+ cell proliferation and differentiation. *Circulation research*. 2005;97(8):e73-83.
45. Yamamoto K, Kusachi S, Ninomiya Y, Murakami M, Doi M, Takeda K, Shinji T, Higashi T, Koide N, Tsuji T. Increase in the expression of biglycan mRNA expression Co-localized closely with that of type I collagen mRNA in the infarct zone after experimentally-induced myocardial infarction in rats. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(9):1749-1756.
46. Westermann D, Mersmann J, Melchior A, Freudenberger T, Petrik C, Schaefer L, Lullmann-Rauch R, Lettau O, Jacoby C, Schrader J, Brand-Herrman SM, Young MF, Schultheiss HP, Levkau B, Baba HA, Unger T, Zacharowski K, Tschöpe C, Fischer JW. Biglycan is required for adaptive remodeling after myocardial infarction. *Circulation*. 2008;117(10):1269-1276.
47. Nevo O, Soleymanlou N, Wu Y, Xu J, Kingdom J, Many A, Zamudio S, Caniggia I. Increased expression of sFlt-1 in in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;291(4):R1085-1093.
48. Ramanathan M, Pinhal-Enfield G, Hao I, Leibovich SJ. Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in macrophages by adenosine A2A receptor agonists and endotoxin involves transcriptional regulation via the hypoxia response element in the VEGF promoter. *Molecular biology of the cell*. 2007;18(1):14-23.
49. Planavila A, Sanchez RM, Merlos M, Laguna JC, Vazquez-Carrera M. Atorvastatin prevents peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) downregulation in lipopolysaccharide-stimulated H9c2 cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1736(2):120-127.
50. Murphree LJ, Sullivan GW, Marshall MA, Linden J. Lipopolysaccharide rapidly modifies adenosine receptor transcripts in murine and human macrophages: role of NF-kappaB in A(2A) adenosine receptor induction. *Biochem J*. 2005;391(Pt 3):575-580.
51. Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, Vogel SN, Salzman AL, Boons GJ, Leibovich SJ. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *The American journal of pathology*. 2003;163(2):711-721.
52. Murphree LJ, Marshall MA, Rieger JM, MacDonald TL, Linden J. Human A(2A) adenosine receptors: high-affinity agonist binding to receptor-G protein complexes containing Gbeta(4). *Mol Pharmacol*. 2002;61(2):455-462.
53. Kiriakidis S, Andreacos E, Monaco C, Foxwell B, Feldmann M, Paleolog E. VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using

- adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 4):665-674.
54. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, Libby P, Weissleder R, Pittet MJ. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* 2007;204(12):3037-3047.
55. Kohler D, Eckle T, Faigle M, Grenz A, Mittelbronn M, Laucher S, Hart ML, Robson SC, Muller CE, Eltzschig HK. CD39/ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 provides myocardial protection during cardiac ischemia/reperfusion injury. *Circulation.* 2007;116(16):1784-1794.
56. Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation.* 2003;107(10):1359-1365.
57. Stewart DJ, Hilton JD, Arnold JM, Gregoire J, Rivard A, Archer SL, Charbonneau F, Cohen E, Curtis M, Buller CE, Mendelsohn FO, Dib N, Page P, Ducas J, Plante S, Sullivan J, Macko J, Rasmussen C, Kessler PD, Rasmussen HS. Angiogenic gene therapy in patients with nonrevascularizable ischemic heart disease: a phase 2 randomized, controlled trial of AdVEGF(121) (AdVEGF121) versus maximum medical treatment. *Gene Ther.* 2006;13(21):1503-1511.
58. Kastrup J, Jorgensen E, Ruck A, Tagil K, Glogar D, Ruzylo W, Botker HE, Dudek D, Drvota V, Hesse B, Thuesen L, Blomberg P, Gyongyosi M, Sylven C. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45(7):982-988.

Acknowledgments

We thank Malou Gloesener and Loredana Jacobs for expert technical assistance, and Nicolaas Brons for his technical help with the flow cytometer. This study was in part supported by the Société pour la Recherche sur les Maladies Cardiovasculaires.

Conflict-of-interest Statement : No Disclosure

TABLE 1. Quantitative PCR primer pairs.

Gene (Genbank)	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
A2a (NM_000675)	TCTTCAGTCTCCTGGCCATC	GGGACCACATCCTCAAAGAG
A2b (NM_000676)	CTCCATCTTCAGCCTTCTGG	ACAAGGCAGCAGCTTTCATT
A3 (NM_000677)	TCATCTGCGTGGTCAAGC	CTGTAGAAGTGGATTGTGATGC
β-actin (NM_001101)	AGAAAATCTGGCACCACACC	GGGGTGTTGAAGGTCTCAA
HIF-1α (NM_001530)	AGCCGAGGAAGAACTATGAAC	ACTGAGGTTGGTTACTGTTGG
PGC-1α (NM_013261)	GGAGAGGCAGAGGCAGAAG	GCATCACAGGTATAACGGTAGG
VEGF (NM_001025366)	CAGCACATAGGAGAG	CCAGGACTTATAACCG
Murine VEGF (NM_001025250)	CTTCTCGCTCCGTAGTAG	CTCCTCTTCCTTCTCTTCC
Murine HIF-1α (NM_010431)	ATCAGCCAGCAAGTCCTTC	AATACATTGACCATATCGCTAT CC

Figure legends

Figure 1. Adenosine amplifies TLR4-induced VEGF production by macrophages. Monocytes obtained by negative selection of PBMCs were differentiated with M-CSF (50 ng/mL) for 7 days. Resulting macrophages were preincubated for 15 minutes with Ado (10 μ mol/L) before incubation for 24 hours with LPS (100 ng/mL), hyaluronan, HS (heparan sulfate), biglycan or IL-1 β at the indicated doses. VEGF concentration in conditioned medium was measured by ELISA, VEGF mRNA expression was assessed by qPCR, and intracellular VEGF was studied by FACS. (A and B) Ado and LPS stimulated VEGF secretion and VEGF mRNA expression (n=12). Data are mean \pm SD. * P <0.05 vs control, # P <0.05 vs LPS. (C and D) Ado and LPS increased intracellular VEGF expression in both monocytes (C) and macrophages (D). Upper panels are histograms showing the percentages of VEGF-expressing cells and lower panels are bar graphs of the intensity of VEGF expression. Only CD14⁺/CD45⁺ cells were considered in these analyses. A representative experiment from three independent experiments is shown. (E to H) HS, IL-1 β and biglycan were not able to induce VEGF per se. HS on Ado-treated macrophages triggered a dose-dependent production of VEGF. Hyaluronan alone induced a strong production of VEGF and Ado pre-treatment amplified this effect. Representative experiments of at least two independent experiments are shown.

Figure 2. Adenosine increases VEGF production by fibroblasts. Human primary cardiac fibroblasts and myofibroblasts were treated for 24 hours with Ado (1 to 50 μ mol/L) and EHNA (10 μ mol/L). VEGF concentration in conditioned medium was measured by ELISA. Ado dose-dependently increased VEGF production by both fibroblasts (A) and myofibroblasts (B). Data are mean \pm SD (n=3). * P <0.05 vs control, # P <0.01 vs control.

Figure 3. Both endogenous and exogenous Ado can increase VEGF production. Monocytes obtained by negative selection of PBMCs were differentiated with M-CSF (50 ng/mL) for 7 days. Resulting macrophages were preincubated for 15 minutes with Ado (10 μ mol/L), dipyridamole (DIP) and/or iodotubercidin (ITU) before incubation for 24 hours with LPS (100 ng/mL). VEGF concentration in conditioned medium was measured by ELISA. (A) DIP increased VEGF production whereas ITU had no effect. (B) Exogenous Ado exacerbated this increase. Data are mean \pm SD (n=3). * $P < 0.05$ vs LPS.

Figure 4. Adenosine inhibits TLR4-induced sFlt-1 production by human macrophages. Monocytes obtained by negative selection of PBMCs were differentiated with M-CSF (50 ng/mL) for 7 days. Resulting macrophages were preincubated for 15 minutes with Ado (10 μ mol/L) before incubation for 24 hours with LPS (100 ng/mL), HS (heparan sulfate), IL-1 β or hyaluronan at the indicated doses. sFlt-1 concentration in conditioned medium was measured by ELISA. (A) LPS induced sFlt-1 secretion and Ado inhibited this induction (n=12). Data are mean \pm SD. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs LPS. (B to D) HS, IL-1 β and hyaluronan each separately induced sFlt-1 production and Ado was able to blunt this effect only when cells were challenged with HS and IL-1 β . Representative experiments of at least two independent experiments are shown.

Figure 5. Transcriptional mechanisms involved in VEGF and sFlt-1 production. Macrophages obtained as described in Figure 1 were preincubated for 15 minutes with Ado (10 μ mol/L) before incubation for 24 hours or as indicated with LPS (100 ng/mL). HIF-1 α , PGC-1 α and VEGF mRNA expression was assessed by qPCR. HIF-1 α protein was assessed by immunoblotting of total, nuclear and cytoplasmic cellular extracts. HIF-1 α nuclear translocation was measured with the Trans-AM kit. (A) Ado and LPS both increased HIF-1 α

mRNA expression. mRNA levels were normalized to control sample. Data are mean \pm SD (n=11). * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs LPS. (B) LPS-mediated increase in HIF-1 α expression preceded that of VEGF expression. A representative kinetic of two is shown. No Ado was added in this kinetic. mRNA levels were normalized to β -actin. (C) LPS increased HIF-1 α expression in total and nuclear extracts but not in cytoplasmic extracts. Ado increased HIF-1 α expression in total and cytoplasmic extracts but not in nuclear extracts. A representative experiment of three independent experiments is shown. (D) LPS increased HIF-1 α nuclear translocation. A representative experiment of three independent experiments is shown. (E) Ado prevents the inhibition of PGC-1 α expression induced by LPS. mRNA levels were normalized to control sample. A representative kinetic of two is shown.

Figure 6. Adenosine and LPS regulate the expression of their receptors. Macrophages obtained as described in Figure 1 were preincubated for 15 minutes with Ado (10 μ mol/L) before incubation for 24 hours with LPS (100 ng/mL). Expression of AdoRs mRNAs was assessed by qPCR. Under baseline conditions, expression levels of AdoRs were as follows A2b>A3>A2a. Ado induced a 4-fold up-regulation of A3 expression. LPS highly increased A2a expression and decreased A2b and A3 expression. Ado amplified the effect of LPS on A2a. Results are normalized to A2a mRNA expression of control macrophages (n=4). Data are mean \pm SD. * $P < 0.05$ vs control, # $P < 0.05$ vs LPS.

Figure 7. Effects of Ado receptors analogs on VEGF and sFlt-1 production. Macrophages obtained as described in Figure 1 were preincubated for 15 minutes with Ado (10 μ mol/L) or agonists of A2a (C141) and A3 (IB-MECA) receptors or antagonists of A2a (SCH58261), A2b (MRS1754) and A3 (PSB10) receptors. Conditioned medium was harvested 24 hours after challenge with LPS (100 ng/mL). VEGF and sFlt-1 concentrations in conditioned

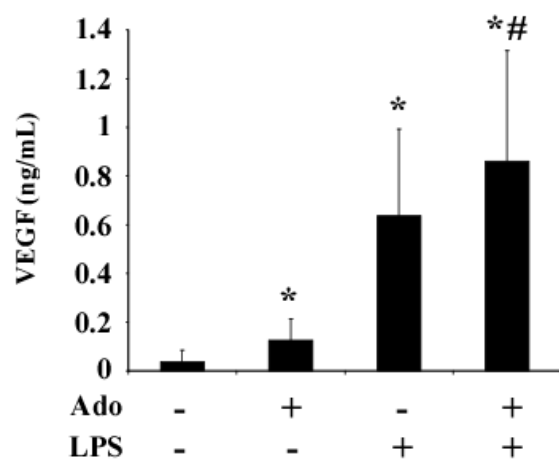
medium were measured by ELISA. The increase of VEGF expression induced by Ado was replicated by the A2a and A3 agonists (A) and inhibited by the A2a and A2b antagonists (B). The decrease of sFlt-1 expression induced by Ado was replicated by the A2a and A3 agonists (C) and partly inhibited by the A2a and A2b antagonists (D). Results are expressed as percentage vs LPS-treated cells. Representative data from at least two independent experiments are shown.

Figure 8. Overexpression of the A2a receptor in mice enhances VEGF production. Overexpression of A1 or A2a receptor was obtained in transgenic mice in a cardiac-specific and inducible manner. Un-induced transgenic mice as well as wild-type littermates were used as controls. VEGF level was measured in plasma by ELISA. VEGF and HIF-1 α mRNA expression was measured in cardiac tissue by quantitative PCR. (A) Overexpression of the A2a receptor increased the percentage of mice having a plasma level of VEGF above the detection threshold of the assay (3 pg/mL): VEGF was detected in 25% of the un-induced mice and in 75% of the induced mice. (B) Overexpression of the A2a receptor increased VEGF and HIF-1 α mRNA expression. Results are presented for each mouse separately and as mean \pm SD for each group of mice (n=4 per group for transgenic mice, n=7 for wild-type littermates). * P<0.05 vs un-induced mice. ND: not detected.

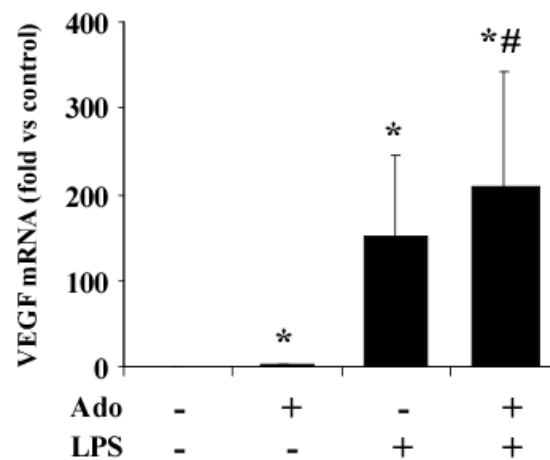
Figure 9. The pro-angiogenic effects of Ado are present in patients with acute MI. Monocytes were purified by negative selection from blood of healthy volunteers (controls, \square) and patients with acute MI (\blacksquare). In vitro differentiation was achieved with 50 ng/mL M-CSF for 7 days. Macrophages were preincubated for 15 minutes with Ado (10 μ mol/L) before LPS challenge (100 ng/mL). VEGF and sFlt-1 concentrations in conditioned medium were determined by ELISA after 24 hours. (A) Up-regulation of VEGF is present and enhanced in macrophages

from patients with MI compared with macrophages from controls. (B) Down-regulation of sFlt-1 is present in macrophages from patients with MI. Results are expressed as the ratio between cells that received Ado and cells that received its vehicle. Each square represents one patient and the means \pm SD (n=11 in each group) are displayed. * P<0.05 vs control.

A

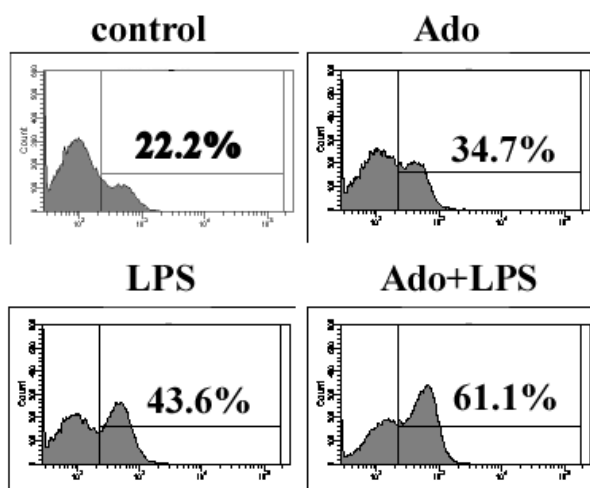


B



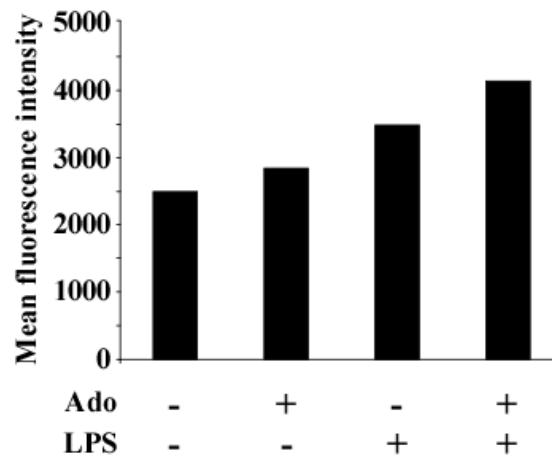
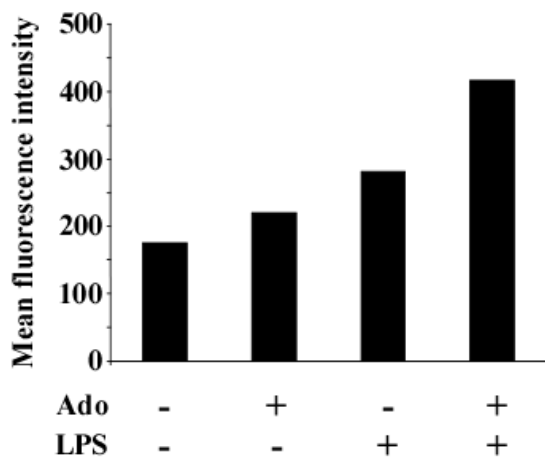
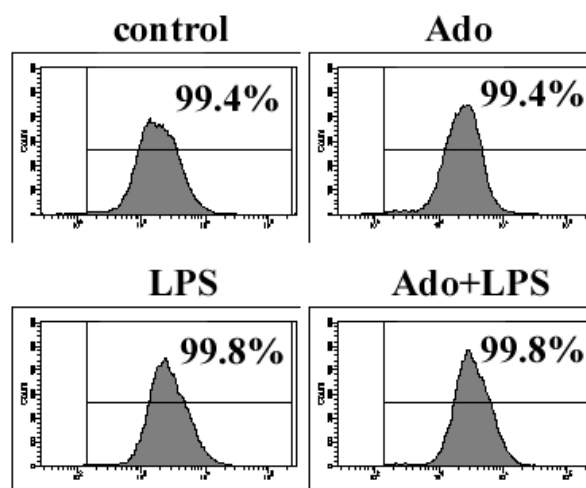
C

Monocytes



D

Macrophages



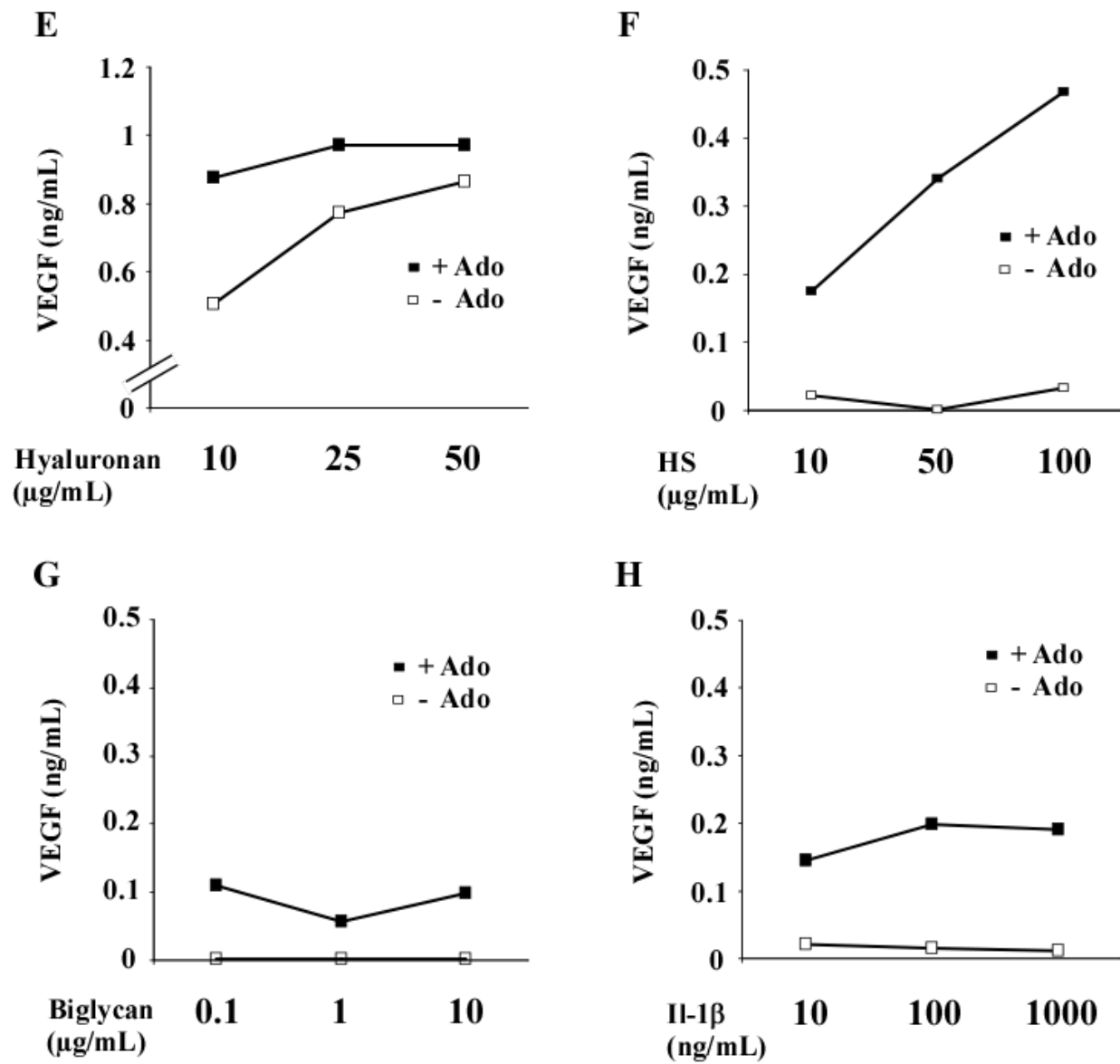
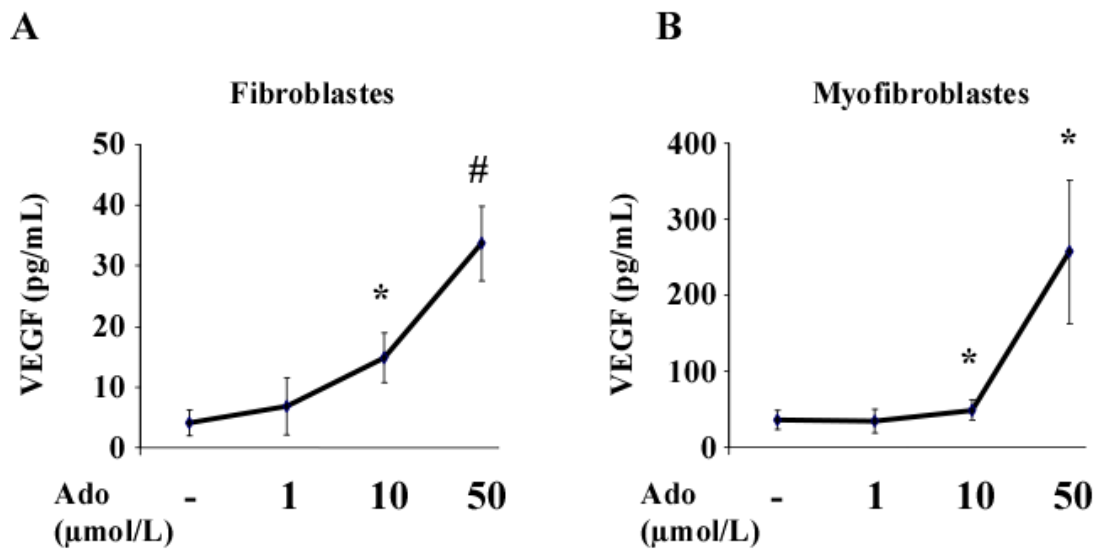


Figure 1

**Figure 2**

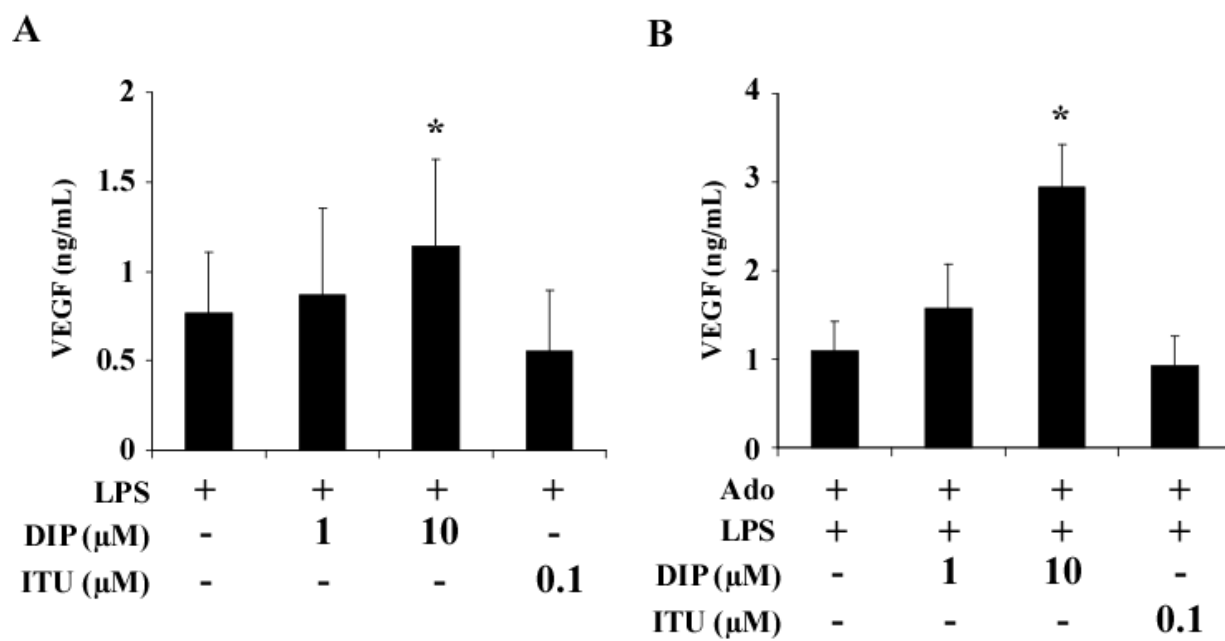


Figure 3

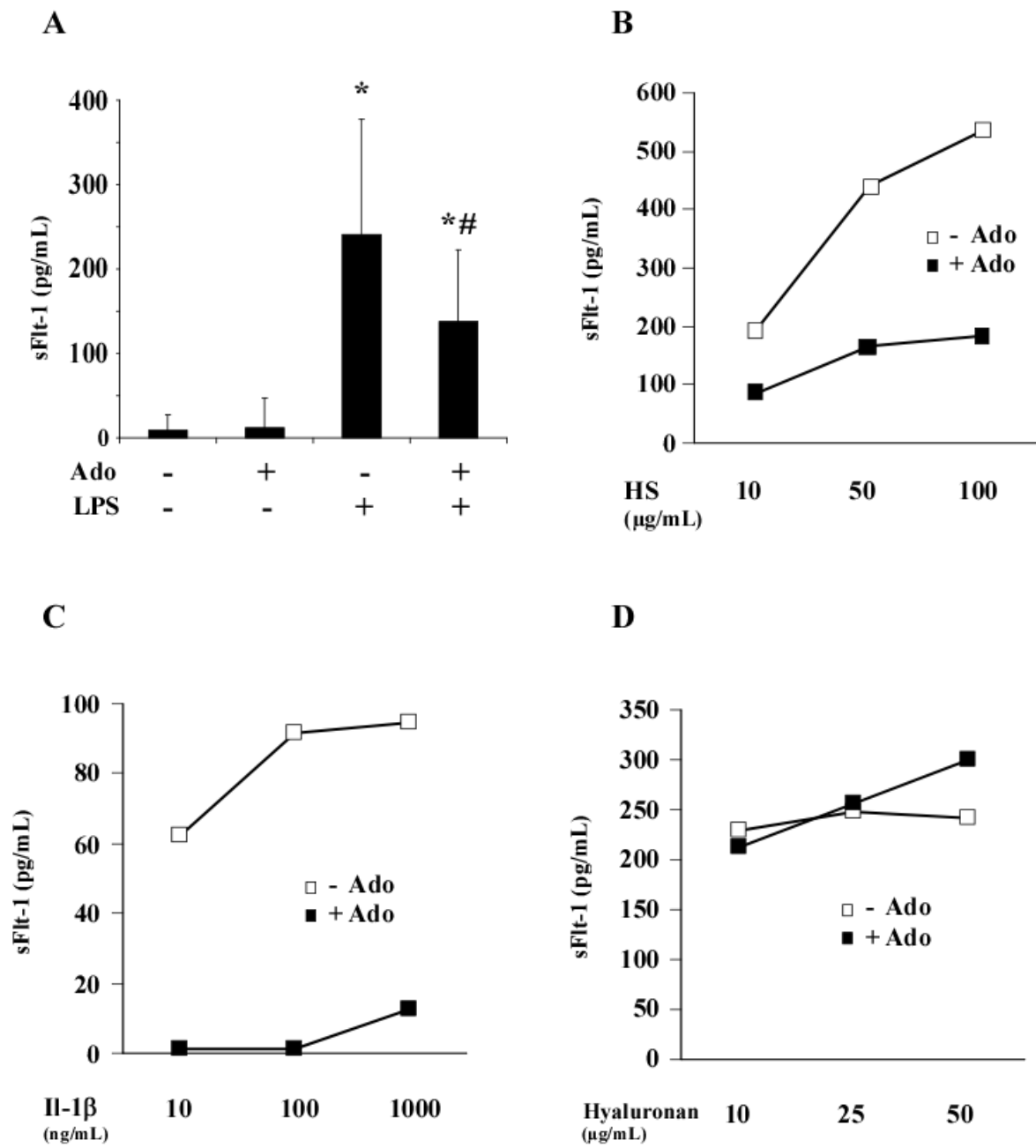


Figure 4

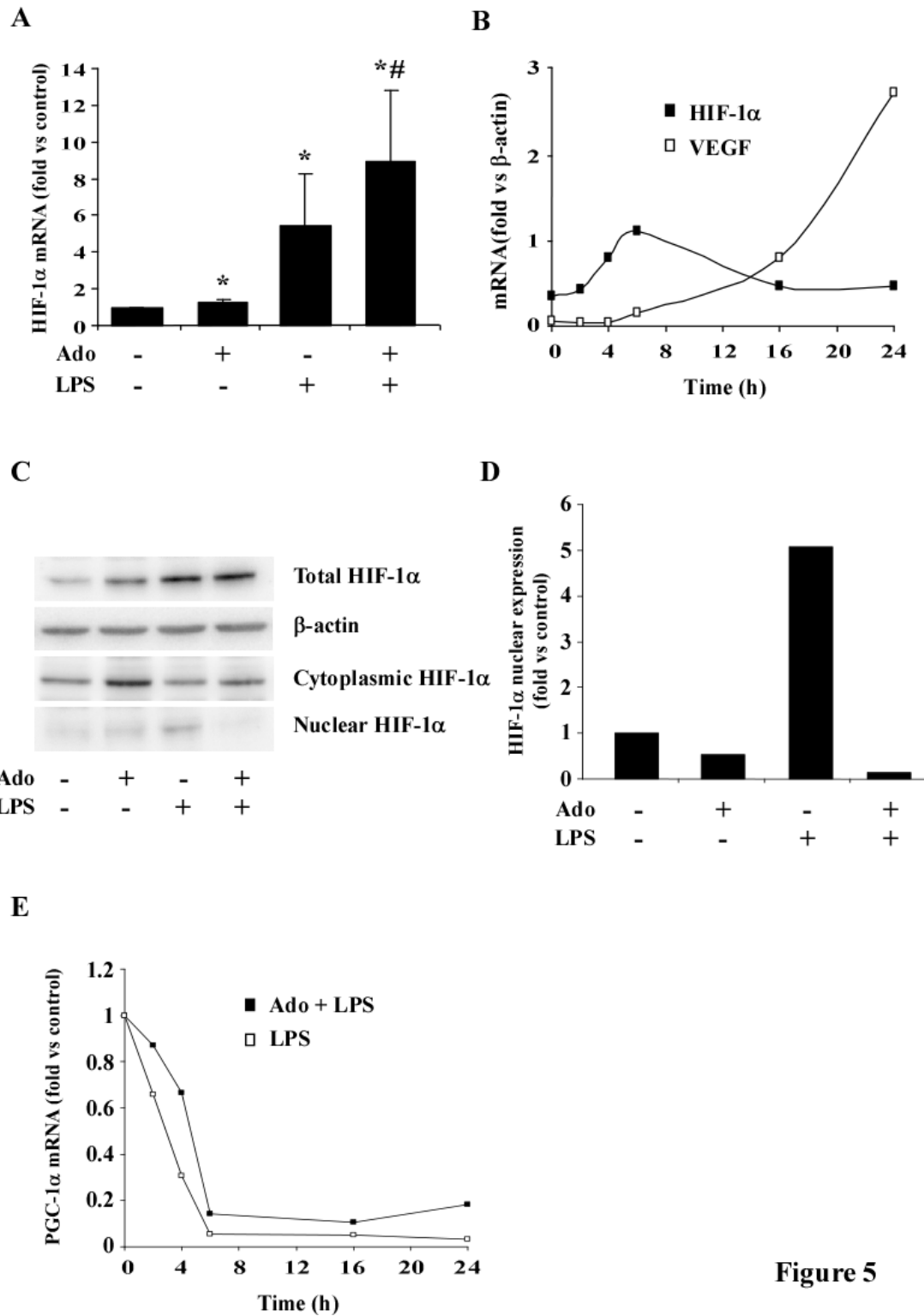


Figure 5

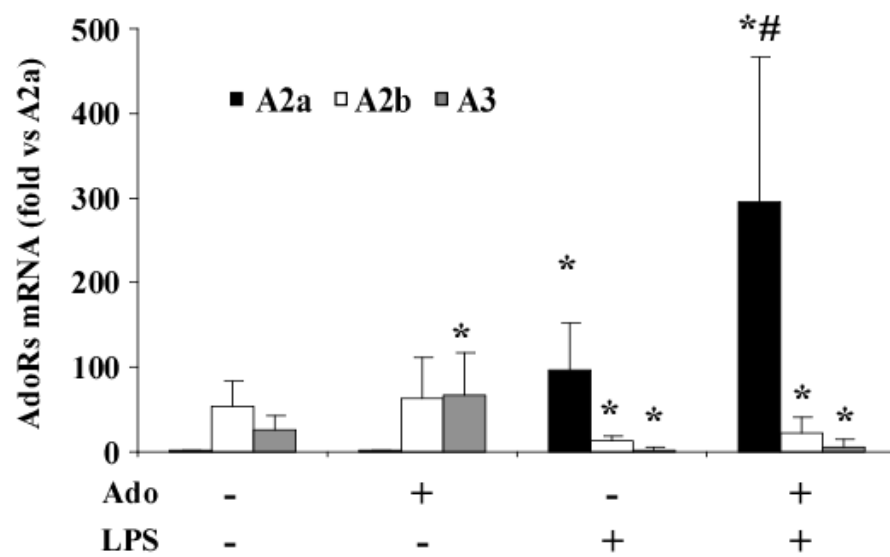


Figure 6

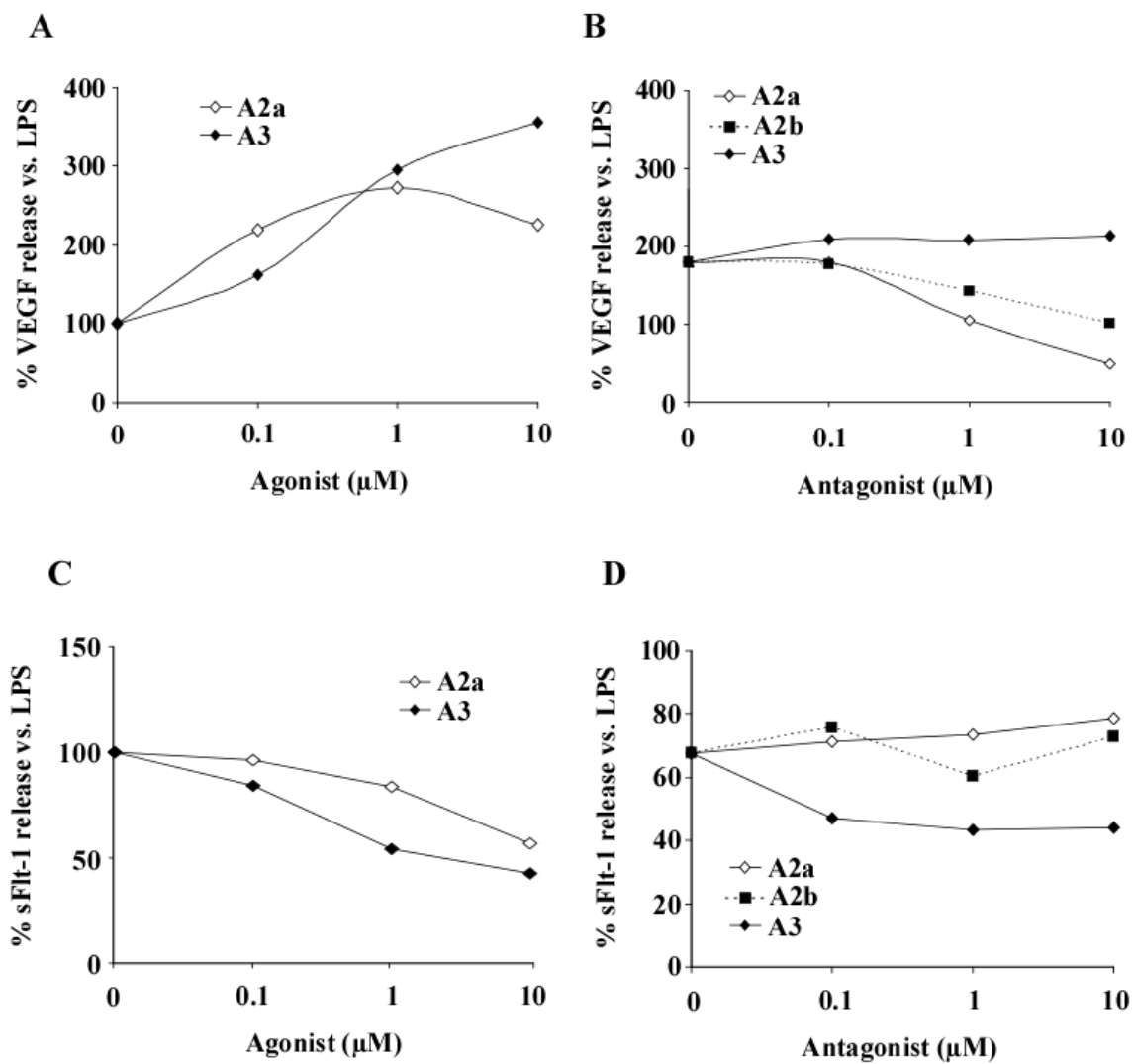


Figure 7

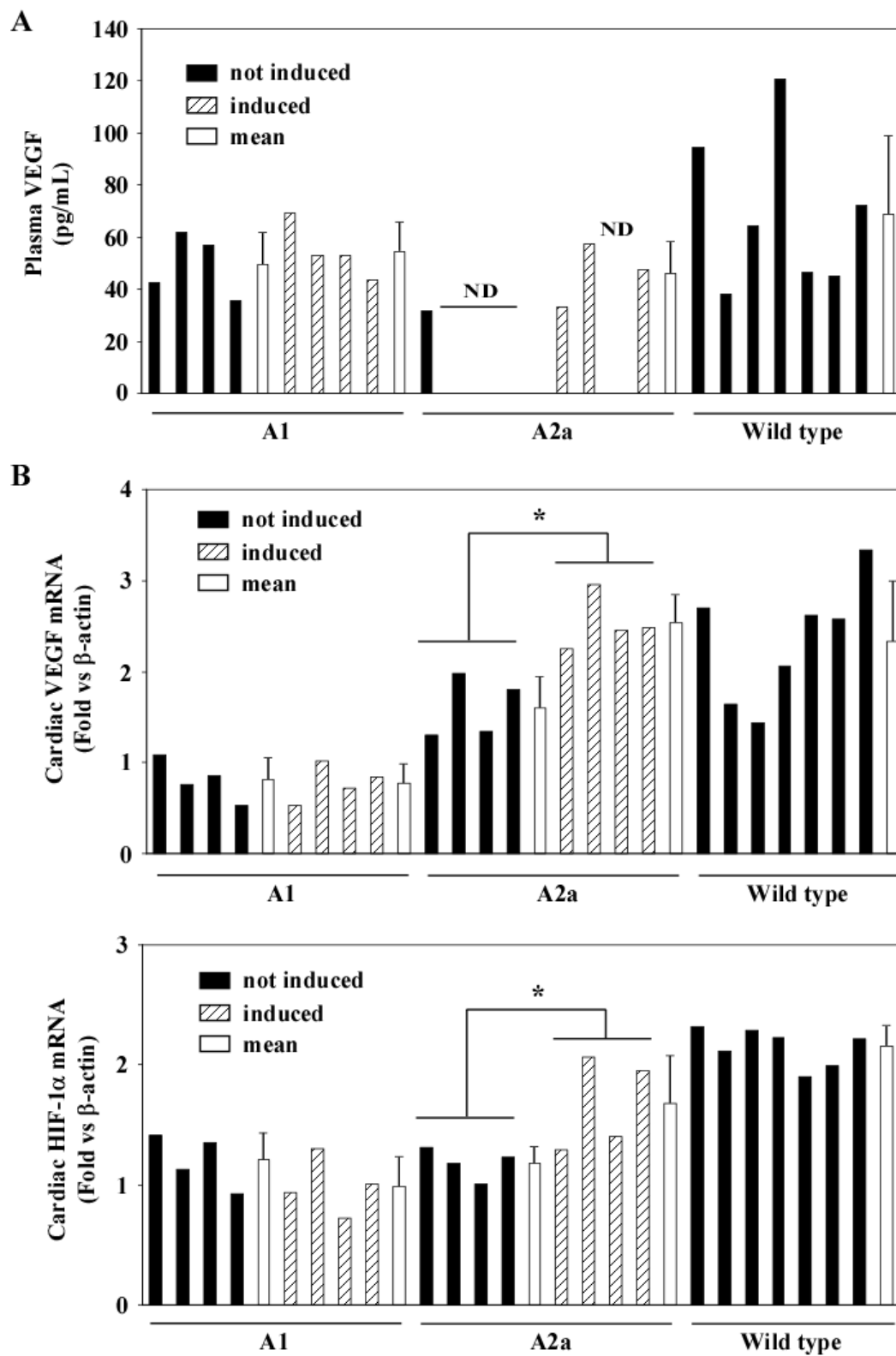
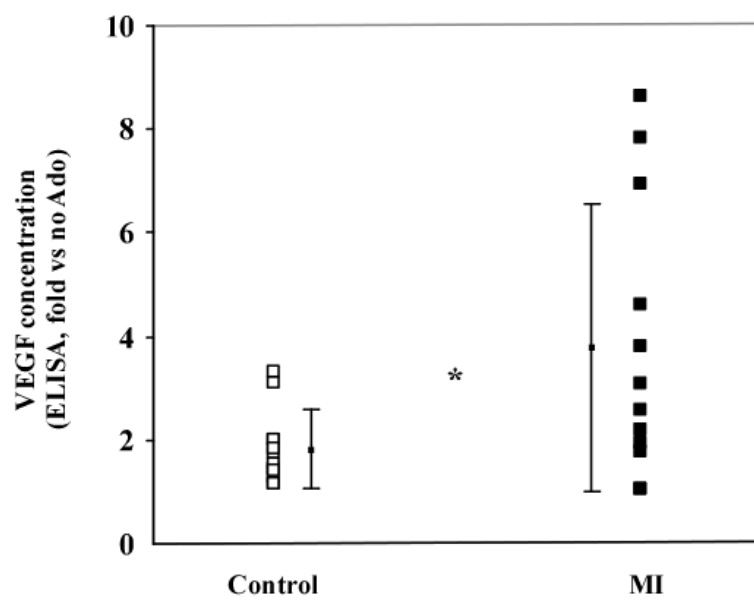
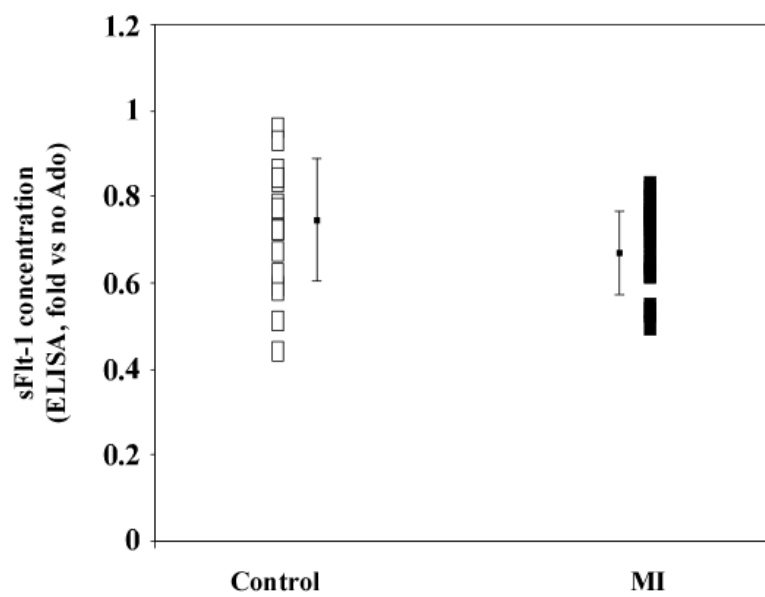


Figure 8

A**B****Figure 9**

Abstract

Effects of adenosine on metalloproteinase-9. Involvement in ventricular remodeling.

Maladaptive remodeling of the left ventricle (LV) is a leading cause of heart failure (HF) after myocardial infarction (MI). It is associated with matrix metalloproteinase (MMP)-9. Although adenosine (Ado) is known to have cardioprotective properties, its role in LV remodeling is still unclear. We hypothesized that Ado could be involved in the regulation of MMP-9. Two waves of inflammatory cells successively infiltrate the heart after MI: first neutrophils then monocytes-macrophages. On the one hand, we have shown that Ado inhibits the secretion of MMP-9 by activated primary human neutrophils. This effect is mediated by the activation of the adenosine-A2a receptor. On the other hand, we cultured human primary macrophages differentiated *in vitro* from blood monocytes. In sharp contrast to our previous observations with neutrophils, we have shown that Ado enhanced MMP-9 secretion by macrophages. This increase is probably mediated by the adenosine-A3 receptor. We have also shown that Ado improves monocytes migratory capacity and that this effect seems to be consecutive to the stimulation of MMP-9 activity. Finally, preliminary experiments suggest that Ado could have an anti-apoptotic effect on human primary monocytes. These observations thus contributed to the characterization of the effects of Ado on some key processes involved in LV remodeling, including extracellular matrix degradation and inflammatory cells apoptosis. They bring arguments for a paradigm of temporal therapeutic window and could have important implications for therapeutic strategies using Ado and/or its receptors in the treatment of MI and in the prevention of HF.

Keywords: adenosine, neutrophils, monocytes-macrophages, ventricular remodeling, matrix metalloproteinase-9.

Résumé

Etude des effets de l'adénosine sur la métalloprotéinase-9. Implication dans le remodelage ventriculaire.

Le remodelage *maladaptif* du ventricule gauche (VG) peut conduire au développement d'une insuffisance cardiaque (IC) après un infarctus du myocarde (IM). Il est lié à l'activité de la métalloprotéinase matricielle (MMP)-9. L'adénosine (Ado) est connue pour ses propriétés cardioprotectrices, toutefois son rôle dans le remodelage du VG est mal défini. Notre hypothèse est que l'Ado pourrait avoir un effet sur la MMP-9. Après IM, 2 vagues de cellules inflammatoires infiltrent séquentiellement le cœur : les neutrophiles puis les monocytes-macrophages. Nous avons montré que l'Ado inhibe la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles primaires humains activés *via* la stimulation du récepteur à l'adénosine A2a. Nous avons ensuite utilisé des monocytes primaires humains différenciés en macrophages *in vitro*. Contrairement aux résultats obtenus avec les neutrophiles, l'Ado augmente la sécrétion de MMP-9 par les macrophages. Cette augmentation semble passer *via* le récepteur à l'adénosine A3. Nos résultats suggèrent également que l'Ado améliore la capacité migratoire des monocytes *via* la stimulation de l'activité MMP-9. Enfin, des expériences préliminaires semblent indiquer que l'Ado inhiberait l'apoptose des monocytes primaires humains. Ces travaux ont contribué à la caractérisation des effets de l'Ado sur certains processus clés dans le remodelage du VG, notamment la dégradation de la matrice extracellulaire et l'apoptose des cellules inflammatoires. Ils mettent en exergue la notion de fenêtre thérapeutique temporelle et pourraient avoir d'importantes implications lors de stratégies thérapeutiques utilisant l'Ado et/ou ses récepteurs dans le traitement de l'IM et la prévention de l'IC.

Mots-clefs : adénosine, neutrophiles, monocytes-macrophages, remodelage ventriculaire, métalloprotéinase matricielle -9.