HAL
open science

Étude des effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire gauche survenant après un infarctus du myocarde

Mélanie Bousquenaud

To cite this version:

Mélanie Bousquenaud. Étude des effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire gauche survenant après un infarctus du myocarde. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0095 . tel-01749295

HAL Id: tel-01749295

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749295v1

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.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Mélanie BOUSQUENAUD

« Etude des effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire gauche survenant après un infarctus du myocarde »

18 Juillet 2012

Membres du jury :

Patrick Menu, PhD	Université de Lorraine, Nancy, France
Daniel Wagner, MD, PhD	Centre Hospitalier, Luxembourg
Pierre-Yves Marie, MD, PhD	Université de Lorraine, Nancyclotep, Nancy, France
Yvan Devaux, PhD	Centre de Recherche Publique-Santé, Luxembourg **Directeur de thèse**

Rapporteurs :

Bernard Swynghedauw, PhD, MD	Hôpital Lariboisière, Paris, France
Philippe Franken, PhD, MD	Université Sophia Antipolis, Nice, France

Laboratoire de recherche cardiovasculaire, Centre de Recherche Public-Santé
120, route d'Arlon L-1150 Luxembourg

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toute ma gratitude au Docteur Daniel Wagner pour m'avoir accueillie au sein du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire et ainsi m'avoir permis de mener à bien ma thèse de doctorat.

Je tiens ensuite à exprimer toute ma reconnaissance au Docteur Yvan Devaux pour le temps qu'il m'a consacré tout au long de ce travail et pour m'avoir fait confiance pendant ces 4 années.

Je remercie également le Professeur Pierre-Yves Marie pour sa disponibilité et son implication dans mes travaux d'imagerie cardiaque.

Je tiens ensuite à remercier toute l'équipe du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire ainsi que l'équipe du Nancyclotep.

Je remercie le Fonds National de la Recherche et le Ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de Luxembourg, pour avoir permis le financement de ce travail de thèse.

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous les membres du Centre de Recherche Public-Santé qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse.

A mon père, à Laurent, à Louis

LISTE DES TRAVAUX

Publications relatives à ce mémoire

Acipimox-enhanced (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for characterizing and predicting early remodeling in the rat infarct model
Bousquenaud M, Maskali F, Poussier S, Marie PY, Boutley H, Karcher G, Wagner DR, Devaux Y.
Int J Cardiovasc Imaging. 2011 Nov 25 (sous presse).

Serial PET Imaging of a Massive Infarct in the Rat

Bousquenaud M, Wagner DR, Marie PY, Devaux Y *(soumis)*.

Adenosine Improves Contractility in the Infarct Border Zone Through Recruitment of Endothelial Progenitor Cells
Bousquenaud M, Maskali F, Poussier S, Marie PY, Boutley H, Fay R, Karcher G, Wagner DR, Devaux Y *(soumis)*.

Monocyte chemotactic protein 3 is a homing factor for circulating angiogenic cells
Bousquenaud M, Schwartz C, Léonard F, Rolland-Turner M, Wagner DR, Devaux Y.
Cardiovasc Res 2012 (sous presse)

Publication non présentée dans ce travail

Transforming growth factor β receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction

Devaux Y, Bousquenaud M, Rodius S, Marie PY, Maskali F, Zhang L, Azuaje F, Wagner DR. *BMC Med Genomics. 2011 Dec 5;4:83.*

Communication orale

Use of 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography to characterize the early stage of cardiac remodelling

Mélanie Bousquenaud, Fatiha Maskali, Pierre-Yves Marie, Sylvain Poussier, Henri Boutley, Gilles Karcher, Daniel Wagner and Yvan Devaux

European Society of Cardiology Congress. Paris, Août 2011.

Posters

Monocyte Chemotactic Protein 3 is a new chemotactic factor for Endothelial Progenitors Cells

Mélanie Bousquenaud, Chantal Schwartz, Frédérique Léonard, Magali Rolland-Turner, Bernadette Leners, Christelle Nicolas, Yvan Devaux and Daniel Wagner

European Society of Cardiology – Heart Failure Congress. Berlin, Juin 2010.

Caractérisation par tomographie à émission de positons au 18F-Fluoro-désoxyglucose du remodelage cardiaque précoce dans le modèle d'infarctus chez le rat

Mélanie Bousquenaud, Fatiha Maskali, Pierre-Yves Marie, Sylvain Poussier, Henri Boutley, Gilles Karcher, Daniel Wagner et Yvan Devaux

Journée Claude Huriet. Nancy, Décembre 2010.

Le blocage chronique des récepteurs à l'adénosine aggrave la dysfonction ventriculaire gauche après infarctus du myocarde chez le rat

Mélanie Bousquenaud, Fatiha Maskali, Pierre-Yves Marie, Sylvain Poussier, Henri Boutley, Gilles Karcher, Daniel Wagner et Yvan Devaux

Journée Claude Huriet. Nancy, Décembre 2010.

Characterization by 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography of the early stage of cardiac remodelling in the rat infarct model

Mélanie Bousquenaud, Fatiha Maskali, Pierre-Yves Marie, Sylvain Poussier, Henri Boutley, Gilles Karcher, Daniel Wagner and Yvan Devaux

Journée ED BIOSE. Nancy, Janvier 2011.

Characterization by 18F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography of the early stage of cardiac remodelling in the rat infarct model

Mélanie Bousquenaud, Fatiha Maskali, Sylvain Poussier, Pierre-Yves Marie, Henri Boutley, Gilles Karcher, Daniel Wagner and Yvan Devaux

European Society of Cardiology – Heart Failure Congress. Gotenburg, Mai 2011.

Protective Effects of a Long-term Treatment with an Agonist of Adenosine Receptors after Acute Myocardial Infarction

Mélanie Bousquenaud, Fatiha Maskali, Sylvain Poussier, Pierre-Yves Marie, Henri Boutley, Renaud Fay PharmD, Gilles Karcher, Daniel Wagner and Yvan Devaux

European Society of Cardiology – Frontiers in CardioVascular Biology Congress. Londres, Mars-Avril 2011.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADNc ADN complémentaire

ADA Adénosine déaminase

Ado Adénosine

AHA *American Heart Association*

AK Adénosine kinase

ALDH2 Aldéhyde déhydrogénase 2

ARNm ARN messager

ARNt ARN total

ATP Adénosine triphosphate

AMP Adénosine monophosphate

AMPc Adénosine monophosphate cyclique

Pro-BNP *Pro-brain natriuretic peptide*

Bpm Battements par minute

BSA *Bovine Serum Albumine*

CADO 2-chloroadénosine

CCR1 Récepteur 1 aux cytokines de type C-C

CCR2 Récepteur 2 aux cytokines de type C-C

CCR3 Récepteur 3 aux cytokines de type C-C

CCR7 Récepteur 7 aux cytokines de type C-C

CD31 Cluster de différenciation 31

57Co Cobalt 57

CPK Créatine phosphokinase

CXCR4 Récepteur 4 aux cytokines de type C-X-C

DAB 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride déhydrate

DAPI 4',6'-diamidino-2-phénylindole

DilAcLDL Lipoprotéine acétylée de faible densité marquée à la 1,1_-dioctadecyl-3,3_,3_-tetramethylindo-carbocyanine

ENT *Equilibrative Nucleoside Transporter*

EPC *Endothelial progenitor cells*

18F Fluor 18

FC Fréquence cardiaque

FCS *Fetal Calf Serum*

FDG 18F-fluorodéoxyglucose

FE Fraction d'éjection

fMLP N-formyl-methionine-leucine-phenylalanine

HCAECs *Human Coronary Artery Endothelial Cells*

HMVECs *Human Microvascular Endothelial Cells*

HRP *Horseradish Peroxidase*

HS Héparan sulfate

HY Acide hyaluronique

IC Insuffisance cardiaque

ICE Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine

IDM Infarctus du myocarde

IL Interleukine

kDA KiloDalton

LPS LipoPolySaccharide

99m-Tc 99m Technétium

MCP3 *Monocyte Chemotactic Protein 3*

MIP3ß *Macrophage Inflammatory Protein 3ß*

MMP *Matrix metalloproteinases*

MSC *Mesenchymal Stem Cells*

PAS Pression artérielle systolique

PBMC *Peripheral blood mononuclear cells*

PBS *Phosphate buffered saline*

PCNA *Proliferating cell nuclear antigen*

PCR *Polymerase chain reaction*

PFA Paraformaldéhyde

PI Phosphate inorganique

SAH S-adénosylhomocystéine

SDF-1α *Stromal cell-Derived Factor-1α*

8-SPT 8-sulfophénylthéophylline

TEP Tomographie par émission de positrons

TGFß *Transforming growth factor ß*

TIMP *Tissue inhibitor of metalloproteinases*

TNFα *Tumor necrosis factor α*

VG Ventricule gauche

VTD Volume télé-diastolique

VTS Volume télé-systolique

vWF Facteur van Willebrand

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. L'infarctus du myocarde……25

Figure 2. Représentation schématique du remodelage ventriculaire après IDM.....27

Figure 3. Les 4 phases du remodelage ventriculaire après IDM…..……..…...30

Figure 4. Formule chimique et représentation tridimensionnelle de l'adénosine.....32

Figure 5. Voies de biosynthèse et de transport de l'adénosine endogène et exogène……..33

Figure 6. Mécanismes d'action des récepteurs à l'adénosine…….….....34

Figure 7. Formule chimique de la CADO et de la 8-SPT…….37

Figure 8. Formule chimique du PCI……...…...38

Figure 9. Structure des classes de chimiokines……...……..39

Figure 10. Les différents modes d'action des cytokines…….....…..40

Figure 11. Représentation schématique de la chimiotaxie des neutrophiles sur un site abimé……..…..…..41

Figure 12. Représentation schématique anatomique de la circulation coronaire chez le rat……...……42

Figure 13. TEP adaptée au petit animal……47

Figure 14. Formule chimique de l'acipimox…….……...…..48

Figure 15. Production de photons suite à l'annihilation des positons produits par le 18F-FDG……...……49

Figure 16. Structure chimique du 18F-FDG…….……..……..50

Figure 17. Mécanisme d'accumulation du 18F-FDG dans la cellule cardiaque……50

Figure 18. Images cardiaques obtenues au microTEP…….52

Figure 19. Cartes polaires obtenues par les logiciels GPS et QGS et représentant les valeurs segmentaires de la captation en 18F-FDG et de la contractilité du VG chez un animal témoin (*sham*) et chez un animal ayant subi une occlusion coronaire (IDM).....53

Figure 20. Le µImager™…….54

Figure 21 : **Principe de l'enregistrement au µImager™……..55**
Figure 22. **Le cyclotron de Nancy-Brabois…….……...58**
Figure 23. **Photographies de cœurs de rat 2 mois après IDM ou opération *sham*……..61**
Figure 24. **Protocole expérimental permettant d'évaluer le remodelage ventriculaire précoce après infarctus du myocarde chez le rat…….…….62**
Figure 25. **Protocole expérimental permettant d'évaluer les effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire après infarctus du myocarde chez le rat…….....63**
Figure 26. **Coupe de Matrigel™ *Plug* colorés à l'hématoxyline-éosine et montrant 4 micro-vaisseaux……...……....74**
Figure 27. **Caractérisation des EPC……..76**
Figure 28. **Activité Lactate Déshydrogénase mesurée dans les milieux de culture de neutrophiles (A) et macrophages (B) traités avec le PCI…… 143**
Figure 29. **Effets du PCI sur la production de MMP-9 in vitro……144**
Figure 30. **Analyse de la stabilité du PCI in vivo……...……145**

Tableau 1. **Classification et propriétés cardiaques des récepteurs à l'adénosine…..36**
Tableau 2. **Comparaison des 4 types d'imagerie médicale.....46**
Tableau 3. **Liste des amorces utilisées pour les RT-qPCR……..…..…82**
Tableau 4. **Kits ELISA utilisés pour mesurer les différentes protéines des milieux conditionnés…….....83**

TABLE DES MATIERES

Remerciements.....2

Liste des travaux.....4

Liste des abréviations.....7

Table des illustrations.....10

Table des matières.....12

Introduction.....16

Présentation générale du manuscrit.....23

Etude bibliographique.....24

1. Le remodelage ventriculaire après infarctus du myocarde.....24

1.1 L'infarctus du myocarde.....24

1.2 Le remodelage ventriculaire.....26

1.1.1 La mort cellulaire des cardiomyocytes 26

1.1.2 La phase inflammatoire aigüe.....28

1.1.3 La formation du tissu de granulation.....28

1.1.4 La maturation cicatricielle ou remodelage tardif.....30

2. Rôle de l'adénosine dans le remodelage ventriculaire.....31

2.1 L'adénosine.....31

2.2 Potentiel thérapeutique de l'adénosine.....34

2.2.1 Dans le cadre du remodelage ventriculaire.....34

2.2.2 Dans le cadre du recrutement cellulaire après IDM.....38

3. Evaluation du remodelage ventriculaire chez le rat par imagerie cardiaque.....41

3.1 Le modèle expérimental.....41

3.1.1 Le cœur de rat.....41

3.1.2 La technique chirurgicale d'occlusion coronaire chez le rat.....42

3.2 L'imagerie cardiaque.....43

3.2.1 Les techniques d'imagerie médicale et l'imagerie moléculaire.....43

3.2.2 L'évaluation du remodelage ventriculaire après IDM par Tomographie par Emission de Positrons au 18F-FDG.....46

***Matériels et Méthodes*.....59**

***1. Espèces animales*.....59**

1.1 Rat Wistar.....59

1.2 Souris C57/BL6.....59

***2. Protocoles expérimentaux*.....60**

2.1 Induction chirurgicale de l'infarctus du myocarde.....60

2.2 Etude du remodelage ventriculaire précoce.....61

2.3 Etude des effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire.....62

***3. Imagerie cardiaque par TEP*.....63**

3.1 Prémédication des animaux.....63

3.2 Acquisition des images.....64

3.3 Reconstruction des images.....64

3.4 Paramètres cardiaques et hémodynamiques.....65

***4. Echantillons biologiques*.....66**

4.1 Coupes histologiques.....66

4.2 Plasmas.....66

***5. Analyses histologiques*.....66**

5.1 Colorations histologiques.....66

5.1.1 Détection de la fibrose par le rouge Sirius.....66

5.1.2 Détection de la fibrose par le trichrome de Masson.....67

5.1.3 Coloration morphologique par l'hématoxyline et l'éosine.....68

5.2 Marquages immunohistologiques.....68

5.2.1 Révélation par colorimétrie.....68

5.2.2 Révélation par fluorescence.....69

5.3 µImager™.....71
5.3.1 Acquisition au µImager™.....71
5.3.2 Analyse quantitative des données issues du µImager™....72
6. Matrigel™ Plug assay.....72
6.1 Protocole expérimental.....72
6.2 Analyses histologiques des coupes de Matrigel™ *Plug*.....73
7. Culture cellulaire.....74
7.1 Cellules endothéliales progénitrices humaines (EPC).....75
7.2 Monocytes/macrophages primaires humains.....77
7.3 Neutrophiles primaires humains.....77
7.4 Cellules endothéliales primaires d'artères coronaires humaines (HCAEC)....78
7.5 Cellules endothéliales primaires microvasculaires humaines (HMVEC).....78
7.6 Fibroblastes/myofibroblastes cardiaques humains.....79
8. Test de cytotoxicité.....79
9. Chimiotaxie in vitro : Transwell™ assay.....80
10. Analyses biochimiques et moléculaires.....81
10.1 Microarrays.....81
10.2 PCR quantitative en temps réel.....81
10.3 Cytométrie en flux.....82
10.4 ELISA.....83
11. Analyses statistiques.....84

Résultats.....86

Etude n°1: Mise en place du modèle d'infarctus du myocarde chez le rat. Mise au point des techniques et analyse du remodelage ventriculaire gauche.....86

Etude n°2: Cas particulier d'un rat ayant survécu à long-terme à un infarctus du myocarde très étendu.....89

Etude n°3: L'adénosine améliore la contractilité cardiaque dans la zone bordant l'infarctus du myocarde et stimule le recrutement des cellules endothéliales progénitrices.....96

Etude n°4: La *Monocyte Chemotactic Protein 3* stimule la migration des cellules endothéliales progénitrices et induit l'angiogenèse.....139

Etude n°5 : Effets d'un agoniste A2A / antagoniste A3 des récepteurs à l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages et neutrophiles.....142

Discussion.....146

Conclusions et perspectives.....164

Bibliographie.....166

INTRODUCTION

L'infarctus du myocarde (IDM) est une nécrose ischémique du muscle cardiaque, due à la thrombose occlusive d'une artère coronaire. Cette occlusion coronaire survient le plus souvent suite à la fissuration ou à la rupture d'une plaque d'athérome coronaire. L'IDM présente un risque fatal important à court et à moyen terme mais son pronostic a toutefois été considérablement amélioré depuis 20 ans grâce aux techniques de reperfusion. Cependant, en France, l'IDM est responsable de 15% de la mortalité totale annuelle chez l'adulte[1].

La formation de l'athérome coronaire est sous la dépendance de plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire (tabagisme, hypercholestérolémie, diabète, hypertension artérielle, hérédité cardiovasculaire familiale, stress, sédentarité, surcharge pondérale, âge et sexe). L'évolution ultime, caractérisée par l'obstruction coronaire, provoque un événement ischémique aigu qui détruit une partie des cellules myocardiques en raison de la perte d'apport en nutriments et en oxygène dans le tissu. Le remodelage ventriculaire est un processus réactionnel qui débute immédiatement après la survenue de l'IDM. Il induit des changements de dimensions, de géométrie et d'épaisseur pariétale du ventricule gauche (VG)[2]. La dilatation ventriculaire, qui survient précocement mais progressivement après un IDM, permet de conserver un volume d'éjection systolique normal en dépit d'une diminution de la fraction d'éjection (FE) (remodelage adaptatif).

L'insuffisance cardiaque (IC) survient lorsque le processus adaptatif ventriculaire devient délétère. Le remodelage ventriculaire maladaptatif est observé notamment lorsqu'il y a un déséquilibre entre l'enzyme MMP-9 et son inhibiteur tissulaire TIMP-1[3]. C'est cette dérégulation qui provoque la dégradation massive de la matrice extracellulaire. La MMP-9, qui influence directement l'intensité du remodelage ventriculaire, est un facteur pronostic de l'IC[4, 5 6]. Cette maladie cardiaque est associée à une dérégulation de la réponse inflammatoire, de l'angiogenèse et du renouvellement de

la matrice extracellulaire (MEC). Chez les sujets souffrant d'IC, le cœur n'est plus capable d'assurer les besoins en oxygène et en nutriments des tissus.

La FE et les volumes ventriculaires télé-diastolique et télé-systolique (VTD et VTS) du VG sont les données métriques les plus influencées par le degré de remodelage [7-9] et sont par conséquent les paramètres cardiaques les plus couramment utilisés pour évaluer la performance cardiaque des patients. Les techniques d'imagerie moléculaire permettent de mesurer ces paramètres de façon non invasive. L'échocardiographie est la technique d'imagerie cardiaque non invasive la plus disponible et la plus utilisée aujourd'hui. Cependant, d'autres techniques non invasives, telles que l'imagerie utilisant des radionucléides comme la tomographie par émission de positons (TEP) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) jouent également un rôle important et ont des performances supérieures à l'échocardiographie pour mesurer de façon précise en 3 dimensions ces paramètres cardiaques.

L'adénosine est un nucléoside endogène ubiquitaire dont les propriétés cardioprotectrices sont partiellement connues. Elle est formée suite à la déphosphorylation de l'adénosine triphosphate (ATP) en conditions d'ischémie [10]. Libérée dans le milieu extracellulaire, elle peut agir en se liant à ses 4 récepteurs couplés aux protéines G : A1, A2A, A2B et A3[11-13]. Les nombreuses études cliniques ont montré que l'adénosine administrée pendant la reperfusion pouvait réduire la taille d'IDM ; cependant, elle n'est pas suffisante pour avoir un effet significatif sur le devenir des patients[14-16]. Les études précliniques confirment quant à elles que l'adénosine a des effets cardioprotecteurs ou délétères selon le type de récepteur qu'elle active. Les récepteurs A1 et A3 semblent aller dans le sens du remodelage délétère alors que les récepteurs A2A et A2B semblent être cardioprotecteurs[17].

Plusieurs études au sein de notre laboratoire ont montré que l'adénosine régule de nombreuses voies impliquées dans le remodelage ventriculaire. En outre, l'adénosine inhibe la production d'IL-6 et de TNF-α dans le cœur de rat lors de l'inflammation, via les récepteurs A2 et A3[18, 19], elle régule aussi la production de MMP9 par les

macrophages et neutrophiles via les récepteurs A3 et A2A[20, 21]. L'adénosine est également un acteur pro-angiogénique, puisqu'elle stimule la production de VEGF par les macrophages via son récepteur A2A.

Hypothèse et organisation de ce travail

Ce travail de thèse est basé sur de précédents résultats obtenus au laboratoire suggérant que l'adénosine régule certains acteurs clés du remodelage ventriculaire gauche post IDM. Dans ce travail, nous nous sommes proposés de tester les effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire in vivo.

Dans un premier temps, nous avons mis en place les techniques d'imagerie moléculaire et d'histologie permettant d'étudier de façon précise le remodelage ventriculaire chez le rat après IDM ; et en fonction de la taille initiale d'IDM (étude 1). Grâce à ces techniques, nous avons pu décrire le cas d'un rat ayant survécu de façon très surprenante à un IDM touchant plus de 70% du VG (étude 2).

Nous avons ensuite caractérisé les effets cardioprotecteurs d'un traitement chronique à l'adénosine sur le remodelage ventriculaire gauche post IDM (étude 3).

Ensuite, nous avons identifié une nouvelle chimiokine capable d'induire la migration des cellules endothéliales progénitrices (étude 4).

Enfin, nous avons commencé l'étude préclinique d'une molécule agoniste du récepteur A2A et antagoniste du récepteur A3 à l'adénosine (étude 5).

L'étude n°1 a donné lieu à la publication d'un article:

Acipimox-enhanced (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for characterizing and predicting early remodeling in the rat infarct model
Bousquenaud M, Maskali F, Poussier S, Marie PY, Boutley H, Karcher G, Wagner DR, Devaux Y.
Int J Cardiovasc Imaging. 2011 Nov 25 (sous presse).

L'étude n°2 a donné lieu à la publication d'un article soumis:

Serial PET Imaging of a Massive Infarct in the Rat

Bousquenaud M, Wagner DR, Marie PY, Devaux Y.

L'étude n°3 a donné lieu à la publication d'un article soumis:

Adenosine improves contractility in the infarct border zone
Bousquenaud M, Maskali F, Poussier S, Marie PY, Boutley H, Fay R, Karcher G, Wagner DR, Devaux Y.

L'étude n°4 a donné lieu à la publication d'un article:

Monocyte chemotactic protein 3 is a homing factor for circulating angiogenic cells
Bousquenaud M, Schwartz C, Léonard F, Rolland-Turner M, Wagner DR, Devaux Y.
Cardiovasc Res 2012 (sous presse)

L'étude n°5 sera finalisée par l'étude des effets d'un agoniste A2A/ Antagoniste A3 sur le remodelage ventriculaire post IDM chez la souris.

En parallèle de ces études, j'ai aussi participé à un autre projet qui a été valorisé par une publication (non présentée dans ce manuscrit):

Transforming growth factor β receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction

Devaux Y, Bousquenaud M, Rodius S, Marie PY, Maskali F, Zhang L, Azuaje F, Wagner DR.

BMC Med Genomics. 2011 Dec 5;4:83.

Contribution personnelle dans chaque étude

Ma contribution aux études 1, 2 et 3 a été de réaliser toute la partie technique des projets (chirurgie, traitements, imagerie cardiaque et analyses ex vivo).

Ma contribution à l'étude des effets de la MCP3 sur la chimiotaxie des cellules endothéliales progénitrices (étude 4) a porté sur l'étude des effets de la MCP3 sur l'angiogenèse in vivo (Matrigel *Plug* assay et histologie), sur l'étude in vitro des effets de la MIP3β, ainsi qu'en partie sur l'étude in vitro des effets de la MCP3. J'ai bénéficié d'une assistance technique pour les expériences de culture et de traitement cellulaire lors de cette étude.

Ma contribution à l'étude 5 a été de réaliser la partie technique in vitro (culture de neutrophiles et macrophages) et in vivo (injection de la drogue et prélèvements sanguins).

Ma contribution au projet TGFβR1 a porté sur l'étude de l'axe TGFβ1/TGFβR1 dans le cœur de rat après IDM et à sa corrélation avec le remodelage ventriculaire (in vivo et ex vivo).

Pour chacune de ses études, l'analyse ainsi que la rédaction des résultats a été réalisée avec l'aide de mes encadrants.

PRESENTATION GENERALE DU MANUSCRIT

Ce manuscrit est composé de cinq parties. La première partie présente une revue de la littérature concernant (1) le remodelage ventriculaire après IDM; (2) le rôle complexe de l'adénosine dans le remodelage ventriculaire, du fait de la multiplicité de ses récepteurs et de leurs effets; (3) l'évaluation du remodelage ventriculaire chez le rat par imagerie cardiaque. La deuxième partie décrit la mise au point des protocoles expérimentaux ainsi que les techniques de biologie moléculaire et cellulaire et d'imagerie cardiaque utilisées. Les résultats sont relatés dans la troisième partie du manuscrit et ils sont discutés en quatrième partie. La cinquième partie est consacrée aux conclusions et perspectives de ce travail.

Cette thèse a été menée au sein du Laboratoire de Recherche Cardiovasculaire du Centre de Recherche Public-Santé à Luxembourg sous la direction du Docteur Yvan Devaux, en collaboration avec la plateforme d'imagerie moléculaire Nancyclotep à Nancy, avec l'encadrement du Professeur Pierre-Yves Marie.

Ce travail a été cofinancé par une bourse d'Aide à la Formation-Recherche (AFR) attribuée pour 4 ans par le Fonds National de la Recherche (FNR) de Luxembourg, et par le ministère de la Culture, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche de Luxembourg.

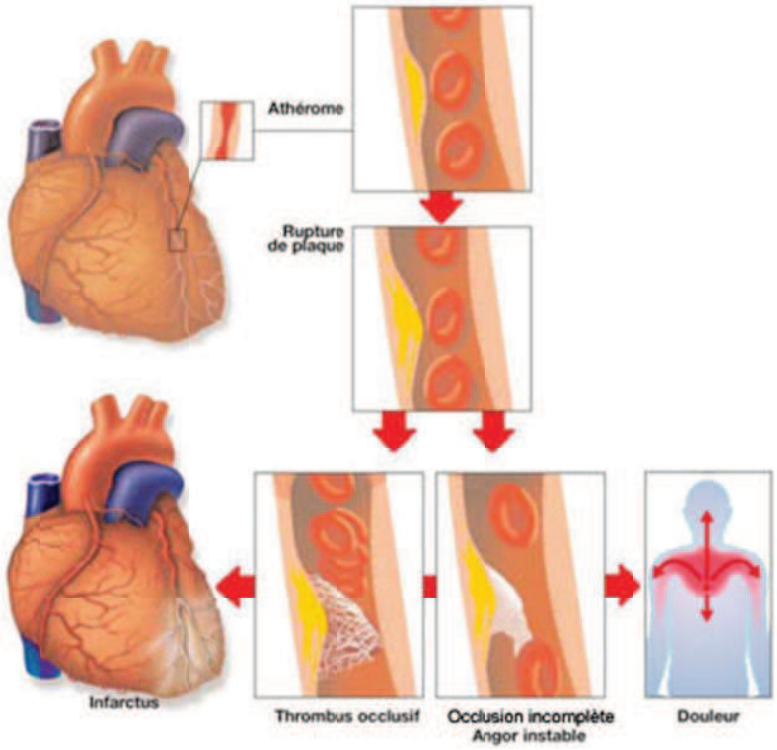
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Le remodelage ventriculaire après infarctus du myocarde

1.1 L'infarctus du myocarde

Les maladies cardiovasculaires sont la cause majeure de mortalité dans les pays développés. Selon l'AHA, elles représentaient 32% de la mortalité totale aux USA en 2003[22]. L'insuffisance cardiaque (IC) consécutive à l'IDM joue un rôle très important dans cette mortalité[23, 24]. Une étude menée en 1994 et 2000 a montré que 70% des patients développaient une IC dans les 5 ans suivants un IDM (dont 64% lors de la première année) [17]. C'est pourquoi il est d'intérêt majeur de pouvoir réduire l'extension de l'IDM ainsi que d'agir sur le processus de remodelage ventriculaire qui est la cause principale de l'évolution vers l'IC.

L'IDM est induit par la thrombose d'une artère coronaire suite à la rupture d'une plaque d'athérome[25](Figure 1). L'athérogenèse artérielle résulte d'un métabolisme lipidique déséquilibré induisant une réponse inflammatoire inadaptée[26 27]. Cette pathologie est le principal facteur de survenue de l'IDM. Suite à ce processus physiopathologique, très largement décrit par Toussaint et al. dans son ouvrage « L'athérosclérose, Physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques », la partie du myocarde alimentée par la circulation coronaire obstruée est interrompue ; résultant en un apport en oxygène et en nutriments insuffisants, pouvant mener à la mort du tissu ischémié. L'occlusion coronaire peut être incomplète, résultant en un angor instable chez le patient. L'extension initiale de l'IDM est déterminée par les dimensions du territoire vascularisé par l'artère coronaire obstruée, ainsi que par le possible développement au préalable d'une circulation collatérale.



<u>Figure 1.</u> L'infarctus du myocarde

Une plaque d'athérome se forme dans une artère coronaire. Cette plaque peut se rompre et provoquer un infarctus du myocarde, l'artère coronaire se bouche et les apports en oxygène et nutriments au myocarde alimenté par cette artère deviennent insuffisants. Si l'occlusion coronaire est incomplète, on parle d'angor instable.

(source: bilingue.iesvegadelturia.es/infarct.htm)

La reperfusion effectuée dans les heures suivants l'IDM permet d'améliorer de façon considérable le pronostic des patients [28]. Mais dans la plupart des cas, cette thérapie ne peut pas être opérée suffisamment tôt pour éviter le développement de l'IDM. Lorsque la taille d'IDM est suffisamment importante, l'apparition du remodelage ventriculaire délétère puis de l'IC sont responsable d'une dégradation du pronostic des patients. C'est pourquoi de nombreux traitements ont été testés à long-terme après IDM. Ces traitements visent à prévenir le remodelage ventriculaire délétère en inhibant les différents acteurs de ce remodelage, tels que la fibrose[29-32] et l'hypertrophie des cardiomyocytes[33-35]. Ces différentes thérapies ont aussi pour but de réduire l'extension de la zone nécrosée juste

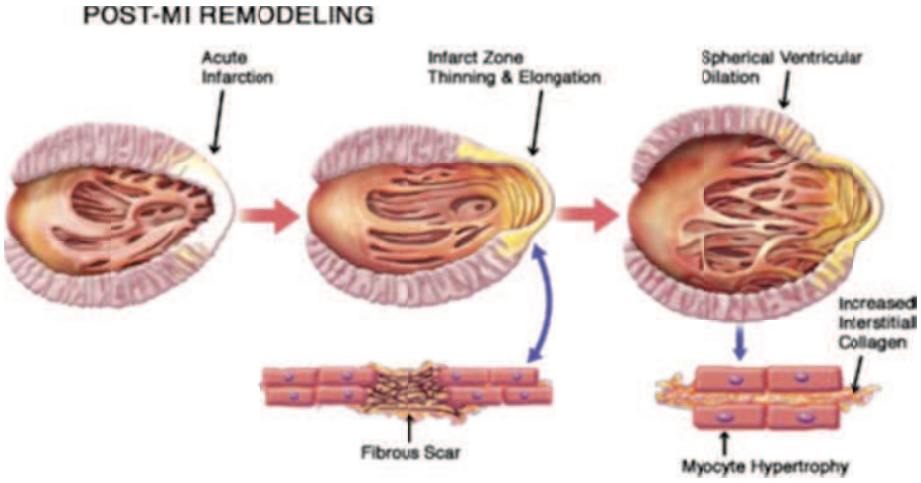
après l'IDM et de minimiser le remodelage ventriculaire délétère qui se développe dans les semaines et les mois suivants. La plupart des thérapies post IDM utilisent les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ICE) et les ß-bloquants[35-39]. Mais en dépit de ces recherches, l'incidence de la survenue de l'IC reste élevée après un IDM : 76% des patients développent une IC dans les 5 ans[23, 24] et 39% en meurent. Le développement de l'IC est donc responsable en grande partie de la mortalité après IDM[23, 24].

Toutes ces données montrent qu'il reste indispensable de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques permettant de réduire les dommages induits par l'IDM et de réduire l'incidence de la survenue ultérieure d'une IC.

1.2 Le remodelage ventriculaire

Le remodelage qualifie les changements qui résultent en un réarrangement de structures normales préexistantes. Le terme « remodelage » tel qu'il est décrit actuellement a été introduit en 1985 par Pfeffer et al. pour caractériser la dilatation du ventricule gauche (VG) chez le rat après IDM[40]. En 1990, l'expression est créée par Pfeffer et Braunwald pour caractériser les changements morphologiques induisant la dysfonction ventriculaire après IDM [41]. Le terme est depuis également utilisé pour décrire les changements moléculaires et cellulaires liés à l'IDM[2, 42].

Le remodelage ventriculaire fait référence à l'altération de l'architecture associée à une dilatation de la cavité ventriculaire, en grande partie liée à un amincissement et à une expansion de la zone d'IDM. Au niveau histologique, ce processus inclue l'hypertrophie et l'apoptose des cardiomyocytes, la prolifération des myofibroblastes et la fibrose interstitielle[43, 44] (Figure 2). Comme l'ont montré Pfeffer et Braunwald[41], l'intensité du remodelage est corrélée à l'atteinte myocardique initiale (taille et sévérité de l'IDM) ; et ce degré de remodelage joue un rôle majeur dans l'évolution ultérieure en une IC [45, 46].



<u>Figure 2.</u> Représentation schématique du remodelage ventriculaire après IDM
La phase précoce est caractérisée par l'amincissement et l'élongation de la zone d'infarctus, avant que cette zone ait été complètement transformée en cicatrice fibreuse. La dilatation ventriculaire consécutive provoque un changement de configuration (elliptique vers sphérique). Le remodelage agit ainsi en dehors de la zone d'IDM avec l'hypertrophie des myocytes associée à une augmentation de l'apoptose et du dépôt de collagène interstitiel (d'après Konstam et al. [47]).

1.2.1 La mort cellulaire des cardiomyocytes

La mort des cardiomyocytes apparaît 1 heure après l'obstruction coronaire et marque le début du remodelage ventriculaire. Elle se produit soit par apoptose génétiquement programmée, soit par nécrose, processus non programmé. La destruction de ces cellules provoque le relargage de protéines spécifiques dans le milieu extracellulaire: la myoglobine, la troponine T, la créatine phosphokinase (CPK). La présence de ces substances à des forts taux plasmatiques est d'ailleurs couramment utilisée pour diagnostiquer l'IDM[48, 49].

1.2.2 La phase inflammatoire aigüe

Pendant cette phase qui s'étend de 1 à 4 jours après l'IDM, les neutrophiles et les monocytes sont les 2 premières vagues cellulaires recrutées sur le site inflammatoire afin de débarrasser le tissu cardiaque des débris cellulaires[50, 51]. Ces cellules migrent vers le site via un gradient de cytokines chimioattractantes, les chimiokines. Ces protéines solubles sont synthétisées par les leucocytes et par les tissus abimés (cellules endothéliales et cardiomyocytes) et permettent donc d'établir une communication intercellulaire lors d'une phase inflammatoire. Les monocytes sont recrutés sur le site inflammatoire par un gradient de MCP-1 via leur récepteur CCR2. Les neutrophiles sont recrutés par plusieurs chimiokines pro-inflammatoires (IL-1α, IL-17, TNFα et CXCL1/CXCR2)[52-54].

Sur place, les monocytes se différencient en macrophages. Les cellules inflammatoires recrutées se chargent de phagocyter les cellules mortes suite à l'ischémie et elles sont également responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. Elles relarguent des MMPs, comme la collagénase MMP-8 et la gélatinase MMP-9 [55, 56], qui contribuent à la lyse de la matrice extracellulaire (MEC) préexistante afin de faciliter l'infiltration des cellules inflammatoires et la néovascularisation stimulée par des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF ou le TNF-α [57]. Les neutrophiles et les macrophages relarguent également des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1β) qui activent et recrutent d'autres cellules inflammatoires.

1.2.3 La formation du tissu de granulation

La formation du tissu de granulation ou cicatrice immature, est caractérisée par la présence de fibroblastes, macrophages, myofibroblastes, vaisseaux sanguins néoformés et protéines de la MEC. Les macrophages et neutrophiles créent un environnement riche en facteurs de croissance et en cytokines qui sont responsables du recrutement d'autres cellules inflammatoires dans la zone infarcie. Le VEGF et le TGFß-1 synthétisés par les macrophages sont en partie responsables de la néovascularisation pendant cette phase. Les myofibroblastes sont les producteurs majeurs de collagène 1 et 3 qui permettent la

cicatrisation du myocarde. Cette cicatrisation, bénéfique, se fait grâce à une fibrose de remplacement qui permet de combler la perte de tissu myocardique consécutif à l'IDM. Cette fibrose cicatricielle se distingue de la fibrose réactionnelle, secondaire à l'inflammation et très diffuse. Ce deuxième type de fibrose est délétère est fait donc l'objet de la thérapie dans le cadre du remodelage ventriculaire post IDM. Il est important de ne pas cibler la fibrose cicatricielle, car l'inhiber entraînerait la rupture, dramatique, de la paroi ventriculaire. Les myofibroblastes expriment également l'α-*smooth muscle actin* (α-SMA) qui sert à contracter fortement et à réduire la zone ischémiée endommagée. Il a été montré que la protéine matricielle SPARC (ostéonectine) avait un rôle important dans la régulation de la production et de la maturation de la MEC pendant cette phase[58, 59]. Schellings et al. ont démontré que son absence chez la souris provoquait la rupture cardiaque après IDM[60].

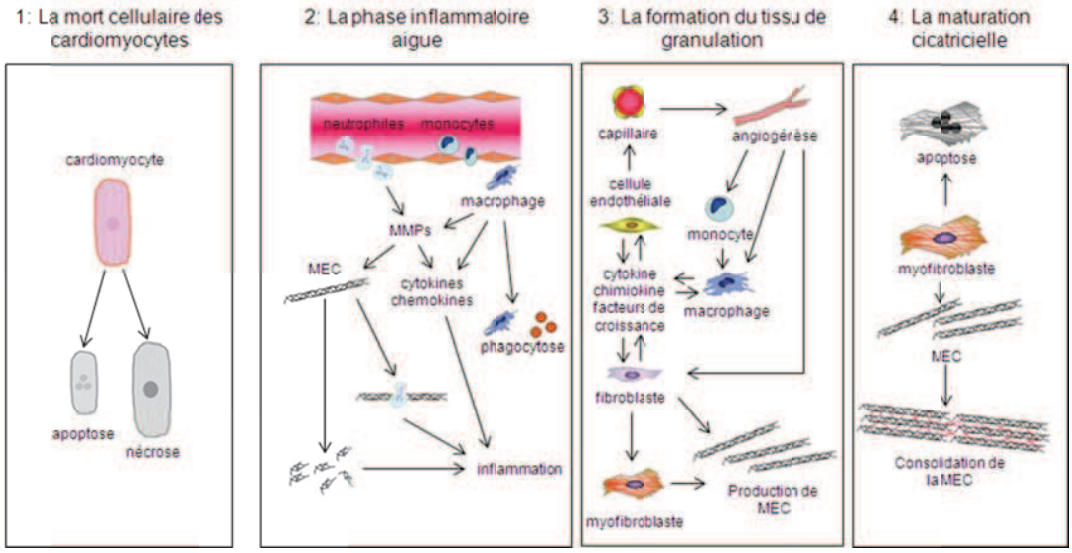
Après la mise en place de cette cicatrice immature, les cellules, exceptés les myofibroblastes, commencent à disparaître de la zone infarcie. L'arrêt de la phase inflammatoire est très important. Dans le cas contraire, le myocarde sain pourrait être sérieusement endommagé. Bien que les mécanismes responsables du passage d'un environnement pro-inflammatoire à un environnement anti-inflammatoire ne soient pas encore entièrement connus, on peut citer la mise en apoptose progressive des cellules ainsi que la présence de médiateurs solubles, tels que les cytokines anti-inflammatoires (IL-10) dans le tissu de granulation. La présence de la protéine syndecan-1 dans la zone péri-infarcie semble également avoir un rôle dans l'inhibition de cette phase inflammatoire aigue[61-63].

Lors de cette phase, les cardiomyocytes commencent à s'hypertrophier afin de maintenir la contractilité cardiaque atténuée suite à l'IDM [64], il a été montré que Timp-3 est en partie responsable de ce phénomène[65]. Cette réaction physiologique a priori bénéfique permet au myocarde de s'adapter aux nouvelles conditions de charge imposées par la perte de tissu myocardique.

1.2.4 La maturation cicatricielle ou remodelage tardif

A partir de 15 jours, la fin du processus inflammatoire marque le début de cette longue phase de remodelage qui peut conduire à la restauration de la fonction cardiaque ou à l'IC si l'inflammation devient chronique.

Le myocarde nécrosé suite à l'ischémie a été remplacé par de la fibrose cicatricielle. Les myofibroblastes sont responsables de ce dépôt de collagène dans la zone infarcie mais aussi dans le myocarde sain. La fibrose a différentes conséquences selon sa localisation: dans la zone infarcie elle est bénéfique car elle permet de préserver l'architecture myocardique ; en revanche, elle provoque la rigidité et la perte de contractilité du myocarde sain. L'IC s'installe lorsque le remodelage tardif est délétère[66]. Les 4 étapes du remodelage ventriculaire sont synthétisées dans la figure 3.



<u>Figure 3.</u> Les 4 phases du remodelage ventriculaire après IDM

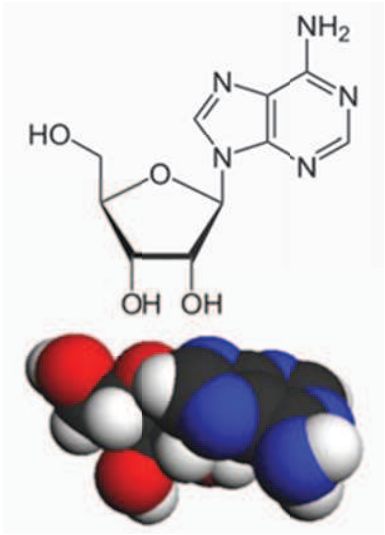
La cicatrisation cardiaque et le processus de remodelage après IDM peuvent être divisés en 4 phases : (1) la mort des cardiomyocytes ; (2) l'inflammation aigüe ; (3) la formation du tissu de granulation ; et (4) la maturation cicatricielle. La mort des cardiomyocytes commence approximativement 1 heure après l'occlusion de l'artère coronaire et peut

être le résultat de la nécrose ou de l'apoptose. Pendant la phase d'inflammation aigüe, l'influx de cellules inflammatoires, tels que les neutrophiles et monocytes, pour la phagocytose et le renouvellement des cardiomyocytes morts dans la zone infarcie et la dégradation de ma matrice extracellulaire (MEC) par les métalloprotéinases matricielles (MMPs), se produit entre 1 heure et 4 jours après IDM. Les MMPs modulent également l'activité des cytokines et des chimiokines inflammatoires. La formation de fragments matriciels exerce un effet inflammatoire potentiel. Ensuite, la formation du tissu de granulation, caractérisée par la présence de fibroblastes, macrophages, myofibroblastes, nouveaux vaisseaux sanguins et protéines matricielles, apparaît dans le cœur infarci entre 2 et 14 jours après IDM. Les fibroblastes et myofibroblastes produisent de la nouvelle MEC pour compenser la perte de la MEC préexistante. Enfin, la maturation du tissu de granulation se produit entre 14 jours et 2 mois après IDM. La cicatrice est caractérisée par une région consolidée, riche en collagène. Pendant cette phase, la plupart des myofibroblastes entrent en apoptose et disparaissent. Le temps de chaque phase dépend des espèces. Les rongeurs ont une phase inflammatoire et une réponse réparatrice accélérée par rapports aux grands mammifères (d'après Matsui et al. 2010 [50]*).*

2. Rôle de l'adénosine dans le remodelage ventriculaire

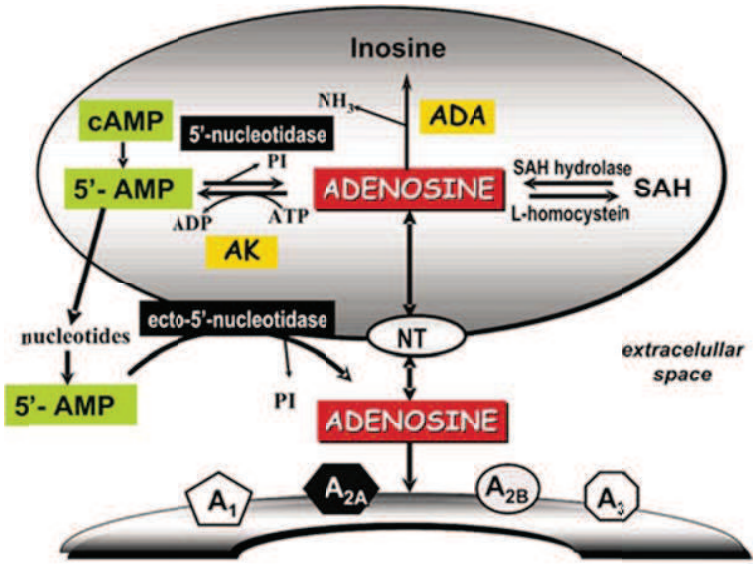
2.1 L'adénosine

L'adénosine (9-β-D-ribofuranosyl-6-aminopurine, Figure 4) est un nucléoside ubiquitaire de type purine issu du catabolisme de l'ATP.



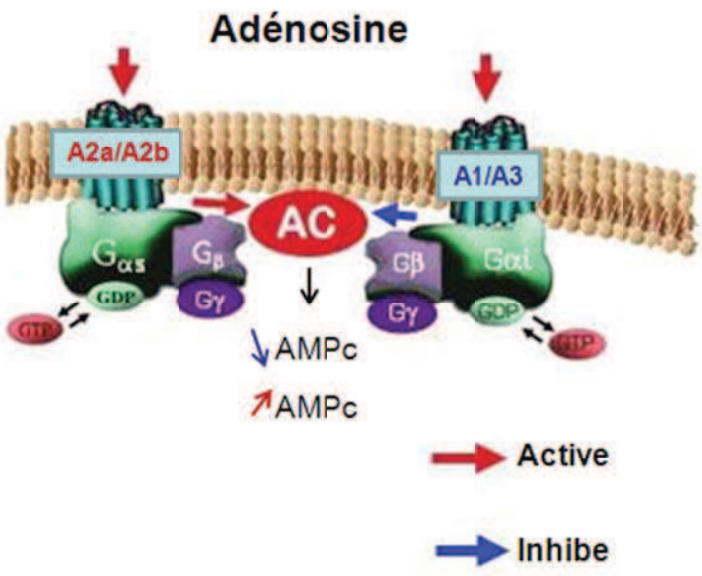
<u>Figure 4.</u> Formule chimique et représentation tridimensionnelle de l'adénosine

Elle est présente dans tout l'organisme et en particulier dans le cœur où elle a un rôle important[67]. Il existe 2 voies de synthèse de l'adénosine. En conditions physiologiques, elle est issue de l'hydrolyse de la S-adénosylhomocystéine par la SAH hydrolase[68, 69]. Lors de l'inflammation, elle est produite par déphosphorylation de l'adénosine monophosphate par la 5' nucléotidase[70, 71] (Figure 5). En conditions normales, on retrouve l'Adénosine dans le milieu extracellulaire à des concentrations de l'ordre de 30 à 300nM [72]. Après ischémie, son taux peut atteindre 100µM[73, 74]. Cette augmentation s'explique par la consommation d'ATP par les cellules présentes sur le site inflammatoire, par l'inhibition de l'adénosine kinase, par l'activation des 5'ectonucléotidases extracellulaires et du transport de l'adénosine endogène ENT (*Equilibrative Nucleoside Transporter*). L'adénosine peut ensuite être rephosphorylée en AMP par l'adénosine kinase (AK) ou dégradée en inosine par l'adénosine déaminase (ADA).



<u>Figure 5.</u> Voies de biosynthèse et de transport de l'adénosine endogène et exogène
(Source: Potential role of adenosine A2A receptors in the treatment of schizophrenia[61])

L'adénosine exerce ses fonctions à travers l'activation de 4 récepteurs couplés aux protéines G[75] qui sont tous exprimés dans le cœur[76] (Figure 6). Parmi ces récepteurs, les récepteurs A1 et A3 sont couplés à une protéine Gi qui, en inhibant l'adénylate cyclase (AC), provoque une diminution de l'AMPc. Les récepteurs A2A et A2B sont quant à eux liés à une protéine Gs qui stimule l'AC et induit l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire.



<u>Figure 6.</u> Mécanismes d'action des récepteurs à l'adénosine

(modifié d'après: www.palobiofarma.com)

2.2 Potentiel thérapeutique de l'adénosine

2.2.1 Dans le cadre du remodelage ventriculaire

Depuis la première description des effets de l'adénosine sur le cœur en 1929[77], de nombreuses études cliniques et précliniques se sont intéressées à son potentiel thérapeutique lors du remodelage ventriculaire après IDM. Funaya et al.[78] ont montré que les patients souffrant d'IC avaient un taux plasmatique élevé en Adénosine. Une autre étude a montré que les patients souffrant d'IC et présentant une mutation non-sens du gène de l'AMP déaminase ont des taux élevés en adénosine et un meilleur pronostic que les autres patients[79]. Mahaffey et al. ont montré que l'administration d'adénosine pendant la thrombolyse était capable de réduire la taille d'IDM chez des patients souffrant d'un IDM antérieur[16], mais elle n'a pas eu d'effet significatif sur la survenue de l'IC chez ces

patients. D'autres études cliniques ont montré que l'adénosine injectée au moment de la reperfusion à de fortes doses n'avait pas d'effet significatif sur l'amélioration de la fonction cardiaque des patients[15, 80, 81]. Les études cliniques soulèvent donc l'ambiguïté du rôle de l'adénosine dans le remodelage post IDM et peinent à démontrer un effet significatif de celle-ci sur la fonction cardiaque des patients.

Lors de l'ischémie myocardique, la concentration extracellulaire en adénosine augmente fortement, ce qui lui permet d'exercer de multiples actions sur le cœur. Il s'agit en particulier d'un effet dromotropique négatif qui diminue la conduction du nœud sinusal et atrioventriculaire. Il s'agit aussi d'une diminution de la fréquence cardiaque (effet chronotropique négatif), d'une vasodilatation des artères coronaires et d'une atténuation des effets métaboliques et fonctionnels des récepteurs ß-adrénergiques. Ces effets physiologiques ont pour conséquence de restaurer l'un équilibre entre les demandes et les apports en O_2 et nutriments[82].

Les effets de l'adénosine sont médiés par l'activation de ses 4 récepteurs mais chacun joue un rôle différent dans le remodelage ventriculaire[82, 83]. Villarreal et al. ont montré que les effets cardiaques de l'adénosine sont très dépendants du type de récepteur activé (Tableau 1).

Récepteur à l'adénosine	Protéine G associée	Localisation du récepteur	Effet sur le taux d'AMPc intracellulaire	Potentiel thérapeutique après IDM
A1	Gi	Cardiomyocytes	↓ AMPc	↓ Stimulation ß-adrénergique ↓ Relargage de catécholamines Antagonise les canaux calciques Cytoprotection des cardiomyocytes
A2a	Gs	Cellules endothéliales	↑ AMPc	Vasodilatation ↓ Agrégation plaquettaire ↓ Production de cytokines ↓ Formation des ROS
A2b	Gs	Cellules endothéliales	↑ AMPc	↓ Croissance et fonction des fibroblastes ^ Prolifération des cellules endothéliales ↓Activation des mastocytes vasodilatation
A3	Gi	Cardiomyocytes	↓ AMPc	Cytoprotection des cardiomyocytes

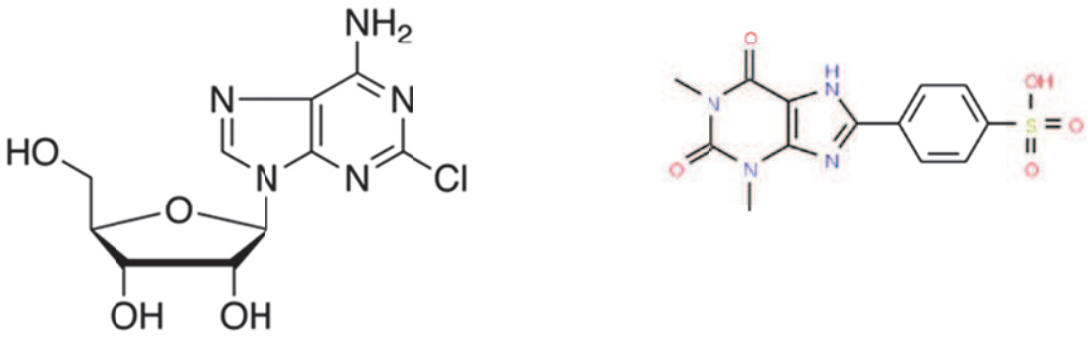
<u>Tableau 1.</u> Classification et propriétés cardiaques des récepteurs à l'adénosine (d'après Villarreal et al. 2003[83]).

Chez l'animal, le rôle de chacun des différents récepteurs à l'adénosine n'est encore pas clairement élucidé. Wakeno et al.[17] ont mis en évidence une amélioration de la fonction ventriculaire gauche globale par échocardiographie chez les rats traités pendant 3 semaines avec un agoniste du récepteur A2B après IDM. Les études sur les souris transgéniques pour les récepteurs à l'adénosine montrent des résultats très variables[84], suggérant que le récepteur A2A serait cardioprotecteur[85] alors que les récepteurs A1[86, 87] et A3[88, 89] auraient plutôt un rôle délétère dans le contexte de l'IC.

Les résultats des études précliniques sur l'adénosine suggèrent donc un rôle cardioprotecteur des récepteurs A2A et A2B alors que les récepteurs A1 et A3 semblent être impliqués dans le remodelage délétère après IDM. Cependant, ces études ne se sont pas intéressées aux effets que pouvait avoir l'adénosine administrée à long-terme lors du remodelage ventriculaire.

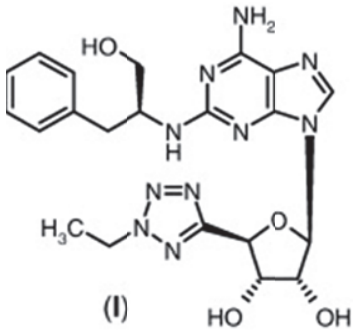
Un de nos objectifs de travail a donc été de caractériser les effets à long-terme de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire post IDM. Nous nous sommes donc intéressés

aux effets d'un agoniste à l'adénosine stable in vivo, la 2-chloroadénosine (CADO), sur le remodelage ventriculaire gauche 2 mois après IDM chez le rat. Afin de bloquer les effets de la CADO, nous avons utilisé la 8-sulfophénylthéophylline (8-SPT), qui est un antagoniste aspécifique des récepteurs à l'adénosine (Figure 7).



<u>Figure 7.</u> Formule chimique de la CADO (à gauche) et de la 8-SPT (à droite)
(Sources : www.trc-canada.com/Structures/C364000.png et www.scbt.com/pngFiles/sc-217511.png)

Un des objectifs de ce travail a également été de caractériser les effets d'un agoniste A2A/ antagoniste A3 sur la production de MMP-9 par les neutrophiles et les macrophages. En effet, l'activité MMP-9 est un déterminant majeur de la phase aigüe du remodelage ventriculaire post IDM ; et les précédentes études de notre laboratoire ont montré que cette activité était médiée par le récepteur A2A chez les neutrophiles[21] et par le récepteur A3 chez les macrophages[20]. C'est pourquoi nous avons émis l'hypothèse que cette molécule pourrait inhiber la production de MMP-9 par les macrophages et les neutrophiles et ainsi elle pourrait limiter les effets délétères connus lors de la phase inflammatoire aigue du remodelage ventriculaire post IDM. Cet agoniste A2A/ antagoniste A3 a été synthétisé par GlaxoSmithKline[90] (Figure 8).



<u>Figure 8.</u> Formule chimique du PCI[90]

2.2.2 Dans le cadre du recrutement cellulaire après IDM

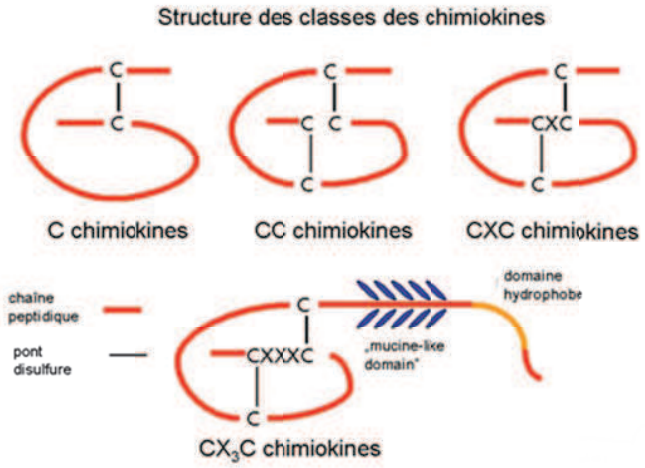
Les cellules progénitrices ont un fort pouvoir cardioprotecteur dans le cœur ischémié[91, 92]. Plus particulièrement, il a été montré que les cellules endothéliales progénitrices (EPC) étaient impliquées dans la néovascularisation du cœur ischémié[93-96].

Une étude récente a montré que l'adénosine a la capacité de stimuler l'adhésion des EPC humaines sur les cellules endothéliales microvasculaires cardiaques[97]. Notre équipe a également pu caractériser les effets de l'adénosine sur les EPC par une étude systémique[98].

La chimiotaxie est le phénomène par lequel des cellules se dirigent dans le sens d'un gradient de concentration de cytokines chimioattractantes encore appelées chimiokines.

Ces chimiokines sont de petites protéines, solubles pour la plupart. Leur taille varie de 8 à 14 kDa. Elles sont composées de 4 résidus cystéine dont la position détermine leur structure tridimensionnelle (Figure 9). Les chimiokines sont ainsi classées en 4 sous-familles en fonction de l'espacement entre 2 de leurs cystéines N-terminales. La famille C-X-C (ou alpha) où il existe 1 acide aminé entre les 2 premières cystéines ; la famille C-C (ou béta) où les 2 premières cystéines sont adjacentes ; la famille C-X3-C où

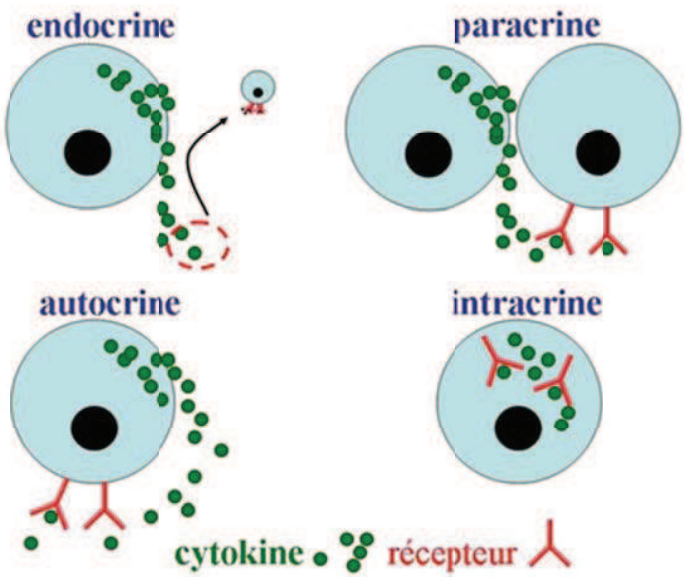
l'unique chimiokine de cette famille est la fractalkine qui possède 3 acides aminés entre les 2 premières cystéines. Enfin, l'unique membre de la dernière famille (C ou gamma) possède une seule cystéine. Toutes les chimiokines exercent leurs effets en se liant à des récepteurs couplés aux protéines G, de type C-C ou C-X-C.



<u>Figure 9.</u> Structure des classes de chimiokines.

Les familles de chimiokines ont été établies en fonction de la position des deux résidus cystéines situés en N-ter de la séquence primaire.

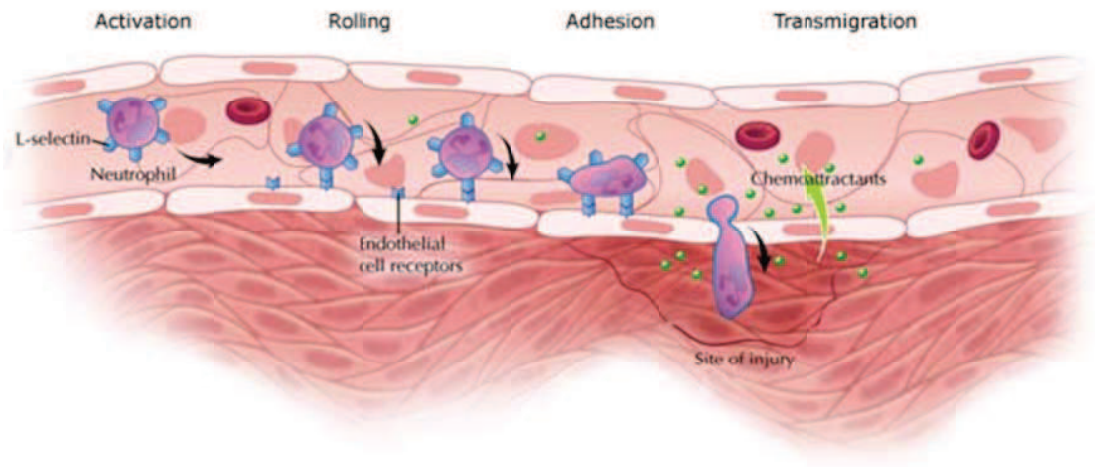
Les chimiokines peuvent agir selon différents modes (Figure 10). D'une part, elles peuvent être secrétées par une glande endocrine et exercer leurs effets à distance via la circulation systémique. D'autre part, le mécanisme par lequel elles exercent leurs effets peut être aussi paracrine et dans ce cas, la cellule se dirige vers un gradient de chimiokines secrétées par une cellule voisine. Il peut s'agir aussi d'une stimulation autocrine et alors c'est la cellule elle-même qui secrète la chimiokine qui l'attire en se liant sur ses propres récepteurs membranaires. Enfin, la chimiotaxie peut être intracrine et dans ce cas la sécrétion de cytokine est autocrine mais les récepteurs sont intracytoplasmiques.



<u>Figure 10.</u> Les différents modes d'action des cytokines
(Source : http://histoblog.viabloga.com)

Dans le cadre du remodelage ventriculaire, les premières cellules recrutées sont les neutrophiles (Figure 11) et les monocytes pendant la phase inflammatoire aigue. Elles migrent vers des gradients de chimiokines pro-inflammatoires : TNF-α, IL-8, IL-1ß, MCP1, TGFß et IL-6. Ces chimiokines sont synthétisées par les neutrophiles et macrophages, ainsi que par les cellules résidentes du tissu lésé (cellules endothéliales, cardiomyocytes).

Dans une deuxième étape, les cellules endothéliales progénitrices sont recrutées lors de la néovascularisation du tissu ischémié. Le VEGF et le TGFß-1, qui sont synthétisés par les macrophages, sont en grande partie responsables de ce processus.



<u>Figure 11.</u> Représentation schématique de la chimiotaxie des neutrophiles sur un site abimé

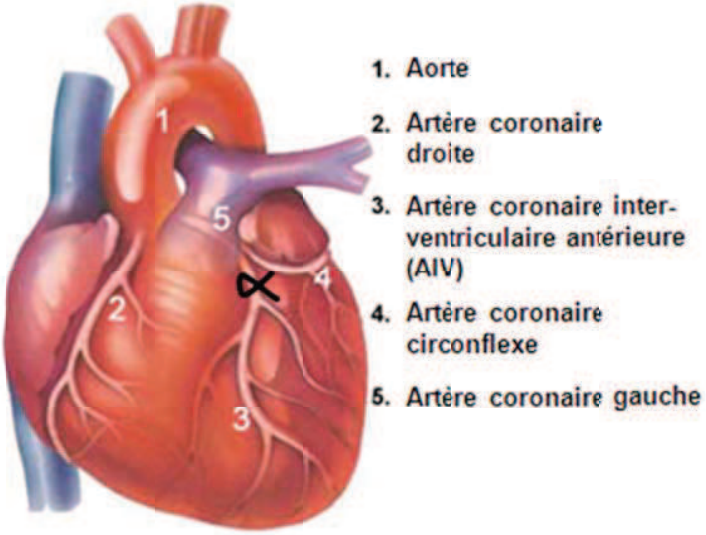
3. Evaluation du remodelage ventriculaire post IDM chez le rat par imagerie cardiaque

3.1 Le modèle expérimental

3.1.1 Le cœur de rat

Le cœur du rat se présente selon une orientation verticale dans la cavité thoracique. Chez un rat adulte de 300g, il pèse environ 250mg, mais il peut varier selon l'âge et le sexe de l'animal. Sa taille, de la base à l'apex, est de ± 1.5cm et sa largeur de ± 1cm (Figure 9). Comme chez l'homme, le cœur de rat est constitué de 2 oreillettes et 2 ventricules, et les valves sont similaires à celles du cœur humain. La fréquence cardiaque du rat est de 250 à 450 pulsations par minute et son rythme respiratoire est de 70 mouvements par minute. Pour un rat de 300g, le volume sanguin total est de 15 à 21mL.

La vascularisation du VG est principalement dépendante de l'artère coronaire gauche qui bifurque en une branche inter-ventriculaire antérieure et une branche latérale circonflexe (Figure 12). Ces 2 artères irriguent respectivement la paroi antéro-septale et la paroi apicale via le sillon interventriculaire et la paroi antérolatérale du VG. Le VD et la paroi inférieure du VG sont irriguées par l'artère coronaire droite. Cependant, il existe une très grande variabilité des territoires vascularisés par chacune des 3 artères coronaires, comme d'ailleurs chez l'homme.



<u>Figure 12.</u> Représentation schématique anatomique de la circulation coronaire chez le rat

L'endroit où est effectué le nœud de ligature est indiqué en noir.

(Modifié d'après www.amiquebec.ca/uploads/images/orig/divers/1.jpg)

3.1.2 La technique chirurgicale d'occlusion coronaire chez le rat

Le modèle d'IDM par ligature coronaire chez le rat est couramment utilisé pour étudier le remodelage ventriculaire, car il reproduit de manière très fidèle la pathophysiologie

observée chez l'homme[41, 99]. Il s'agit donc d'un modèle très précieux pour les études précliniques en recherche fondamentale et translationnelle. Dans ce modèle, l'artère inter-ventriculaire antérieure est ligaturée dans sa partie proximale (à 2-3 mm de la base de l'aorte) de façon permanente (Figure 11). La circulation artérielle coronaire présente une grande variabilité anatomique chez le rat, c'est une des raisons pour lesquelles on obtient des tailles d'IDM très variables dans ce modèle et par conséquent, des intensités de remodelage elles aussi variables[100]. Cette grande variabilité inter-individuelle impose donc la randomisation des animaux selon la taille de leur IDM lors de tout protocole expérimental.

Il faut noter 2 limitations à l'utilisation de ce modèle expérimental. D'une part, l'IDM n'est pas dû à la rupture d'une plaque d'athérome mais à l'occlusion chirurgicale brutale de l'AIV. L'IDM n'est donc pas associé aux altérations de la paroi artérielle habituellement induites par la thrombose. D'autre part, l'IDM est induit chez des animaux relativement jeunes, ce qui arrive rarement chez l'homme.

La première description de ce modèle expérimental d'IDM chez le rat a été faite en 1979 par Pfeffer et al. [99]. Dans cette étude, la relation entre la taille d'IDM et la fonction ventriculaire est largement décrite. D'autre part, cette étude a aussi montré que les animaux développent une IC lorsque l'IDM touche plus de 46% du VG. En 1986 [101], Lamas et al. ont décrit le remodelage ventriculaire post IDM chez l'homme de manière tout à fait similaire à ce qui a été observé chez le rat, avec une augmentation du volume télé-diastolique (VTD) et du volume télé-systolique (VTS) et avec une baisse de la fraction d'éjection (FE). Depuis, de nombreuses études ont démontré la corrélation entre la taille initiale d'IDM et le remodelage ventriculaire associé[43, 102-104].

3.2 L'imagerie cardiaque

3.2.1 Les techniques d'imagerie médicale et l'imagerie moléculaire

L'imagerie moléculaire est définie par la caractérisation in vivo de processus biologiques au niveau moléculaire, cellulaire, tissulaire, de l'organe ou du corps entier. L'imagerie médicale utilise des cibles moléculaires et cellulaires pour le diagnostic et le pronostic des maladies, dont les maladies cardiovasculaires. Les cibles fournissent un signal analytique dans une image en 2 ou 3 dimensions. Les premières techniques d'imagerie médicale date de la fin du XIXème siècle avec l'utilisation des rayons X. Depuis, ces techniques se sont diversifiées et améliorées au cours du XXème siècle avec l'arrivée de la scintigraphie (*Single Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) et de la tomographie par émission de positrons (TEP)), de l'échographie et enfin, de l'IRM dans les années 80. Ces techniques vont être brièvement décrites puis comparées, plus particulièrement dans le cadre de l'exploration cardiaque chez le rat. Seules certaines de ces techniques, la SPECT, la TEP et l'IRM, sont réellement des techniques d'imagerie moléculaire.

L'échocardiographie est une technique non invasive d'exploration morphologique et dynamique du cœur par ultrasons. Le traitement des données se fait par l'analyse du temps de retour des ultrasons émis, permettant d'estimer la distance séparant la sonde de l'interface explorée. Cette technique est la plus utilisée pour le suivi de la fonction du VG chez les petits animaux. Elle offre l'avantage d'un examen non invasif de courte durée et ne nécessite donc qu'une faible anesthésie. Elle permet de mesurer les diamètres du VG en fin de diastole et en fin de systole, la fraction de raccourcissement du VG et l'épaisseur de la paroi du VG. Cependant, elle ne permet pas de caractériser les différents territoires cardiaques et n'est donc pas capable de distinguer le myocarde sain du myocarde infarci après IDM. D'autre part, il s'agit d'une technique de mesure bidimensionnelle des volumes et de la fraction d'éjection. Ces paramètres ne sont pas mesurés directement, mais extrapolés à partir de mesures de diamètres ou de surfaces sur des images bidimensionnelles.

L'imagerie cardiaque par SPECT est utilisée pour étudier le métabolisme et la perfusion myocardique. La SPECT est une technique d'imagerie tomographique qui

étudie la biodistribution de radiotraceurs monophotonique qui renseigne surtout sur la perfusion tissulaire myocardique (201 Tl, Sestamibi ou tétrofosmine 99m-Tc). Cette technique a cependant tendance à surestimer l'étendue de la zone infarcie après IDM[105]. C'est pourquoi son utilisation dans l'évaluation du remodelage ventriculaire nous semble moins intéressante que celle de la TEP au 18F-FDG ; et la qualité des images est bien bonne que celle obtenue en TEP (résolution spatiale, rapport signal/bruit).

L'imagerie par TEP permet de caractériser des processus biologiques dans les tissus et dans les organes avec un minimum de procédures invasives[106]. Cette technique scintigraphique étudie la biodistribution de traceurs radioactifs émettant des positons dont l'annihilation produit 2 photons. La TEP a été introduite dans les années 60 puis elle a évolué et est devenue un outil d'imagerie incontournable en recherche clinique[107-111], en particulier avec l'usage du 18F-fluorodéoxyglucose (18F-FDG), un traceur du métabolisme glycolytique. Depuis les années 2000, les progrès ont été rapides et ont permis d'adapter la TEP au FDG à l'échelle des petits animaux[112-114]. Couramment utilisée en cancérologie, l'imagerie par TEP est aussi utilisée en cardiologie.

L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet d'obtenir de façon non invasive des images de l'intérieur de l'organisme avec une excellente résolution et avec des contrastes modulables. Elle se base sur le principe de la résonance magnétique nucléaire et nécessite par conséquent l'utilisation d'un champ magnétique. Elle a l'avantage de ne pas irradier le patient ou l'animal étudié. Cependant, son utilisation reste assez limitée en recherche préclinique cardiovasculaire, en raison de difficultés pratiques de réalisation (nécessite de réaliser au moins une dizaine de coupes en apnée, ce qui requiert des procédures d'anesthésie spéciales chez l'animal).

La comparaison de ces 4 types d'imagerie médicale est synthétisée dans le tableau 2 ci-dessous.

	Technique	Paramètres cardiaques mesurés	Mesure des paramètres cardiaques	Caractérisation de la zone infarcie	Anesthésie
Écho-cardiographie	Ultrasons	Diamètres du VG Épaisseur pariétale du VG Fraction de raccourcissement	Indirecte: extrapolation à partir d'images 2D	Non	Légère
SPECT	Radiotraceurs (201 Tl, 99m-Tc)	Volumes du VG Fraction d'éjection	Directe	Oui mais surestimation	Modérée
TEP	Radiotraceurs (18F-FDG)	Volumes du VG Fraction d'éjection	Directe	Oui	Modérée
IRM	Champ magnétique	Volumes du VG Fraction d'éjection	Directe	Oui	Spécifique

Tableau 2. Comparaison des 4 types d'imagerie médicale

3.2.2 L'évaluation du remodelage ventriculaire après IDM par Tomographie par Emission de Positrons au 18F-FDG

L'examen du cœur de rat se heurte à plusieurs difficultés d'acquisition des images, en particulier en raison de la petite taille de cet organe et de la fréquence cardiaque élévée du rat. De ce fait, l'utilisation d'appareils possédant d'excellentes résolutions spatiales et temporelles est nécessaire. La TEP adaptée au petit animal (Figure 13) répond à ces exigences. L'appareil que nous avons utilisé offre une résolution spatiale de 0,8 x 0,4 x 0,4 mm et une résolution temporelle permettant d'enregistrer des images sur des durées de 11 à 15 ms pour des fréquences cardiaques (FC) allant de 250 à 375 bpm [115].

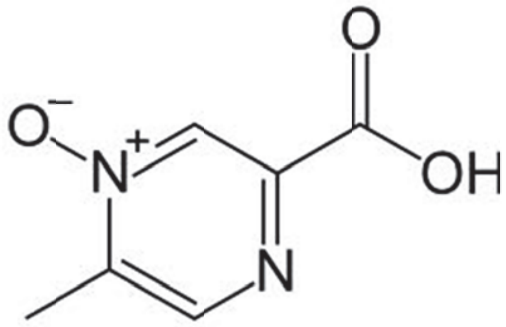
<u>Figure 13.</u> TEP adaptée au petit animal

(Source : Inveon Siemens)

Le choix de la sédation de l'animal est également un paramètre crucial. Cette sédation doit permettre d'obtenir des acquisitions dans une situation proche de l'état physiologique. L'isoflurane (en mélange gazeux à 3,5% / 1,5% air) est le plus souvent utilisé car il permet l'anesthésie de l'animal sans modifier la pression artérielle ni la fonction cardiaque stable. L'utilisation du pentobarbital est à éviter car cet anesthésique diminue la contractilité du cœur et diminue les résistances vasculaires périphériques.

De récents travaux, effectués par des membres du laboratoire, ont permis d'améliorer la qualité des images obtenues avec la TEP grâce à une prémédication des animaux avec un dérivé de l'acide nicotinique, l'acipimox (Figure 14)[113]. L'acipimox inhibe la lipolyse endogène et provoque ainsi une baisse du taux d'acides gras libres dans le sérum des animaux, ce qui limite les possibilités d'utiliser les acides gras comme substrat pour le métabolisme énergétique cardiaque. Cette prémédication permet aussi d'obtenir des images de haute qualité en facilitant la captation de glucose et donc de FDG par les cellules myocardiques[115-117]. Le conditionnement métabolique grâce à l'acipimox est couramment utilisé chez l'homme[116, 117] car elle permet aussi d'améliorer le rapport

signal/bruit[117-120]. De plus, Halbirk et al.[121] ont montré que l'administration d'acipimox chez des patients souffrant d'IC réduisait effectivement le taux d'acides gras libres circulants sans avoir d'effet sur la fonction cardiaque de ces sujets. Cette prémédication n'interfère donc pas avec la mesure des paramètres cardiaques par la TEP.

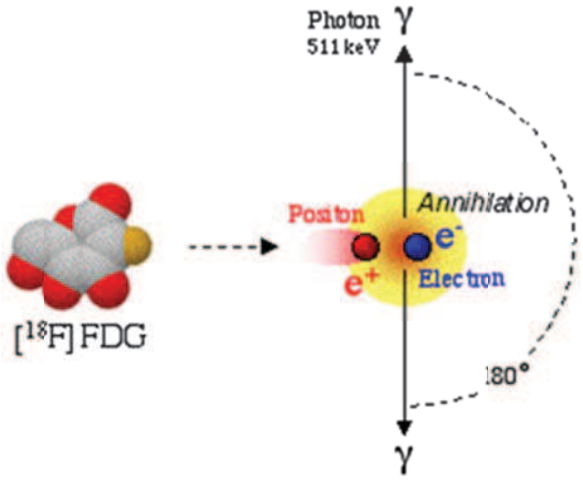


<u>Figure 14.</u> Formule chimique de l'acipimox
(source : Wikipédia)

Nous avons utilisé une caméra TEP de type Inveon de Siemens, qui est constituée d'une série de couronnes de détecteurs répartis en anneau autour de l'animal. Chaque détecteur est constitué d'un cristal scintillateur et d'un photomultiplicateur, optimisés pour l'énergie des photons gamma détectés. L'isotope utilisé est le fluor 18 qui est un radionucléide instable riche en protons. Il émet des positons qui sont annihilés avec les électrons libres du milieu pour former des photons (Figure 15). Une annihilation produit 2 photons de rayonnement γ d'une énergie de 511 kiloélectron volt (keV). Les blocs détecteurs situés autour de l'animal dans le microTEP captent ces 2 photons de 511 keV qui sont émis dans la même direction mais dans 2 sens opposés[122].

Le circuit électronique, ou circuit de coïncidence, permet de déterminer pour chaque paire de photons détectés la projection du lieu d'annihilation. Cette information est ensuite positionnée dans une matrice, ou sinogramme, qui contient l'ensemble des éléments de projection d'une coupe de l'objet. La reconstruction tomographique permet

ensuite d'obtenir la représentation en 3D des réactions d'annihilation et donc de la distribution du traceur.



<u>Figure 15.</u> Production de photons suite à l'annihilation des positons produits par le 18F-FDG

Lors des protocoles d'enregistrement par TEP qui ont été utilisés dans nos études, les animaux ont subi un protocole d'acquisition des émissions de photons γ pendant 10 minutes. Ensuite, une phase de transmission de sources externes de Cobalt 57 a été enregistrée pendant 6 minutes. Cette seconde phase permet d'appliquer des facteurs de correction pour la détermination précise des paramètres mesurés sur les images (correction d'atténuation et de diffusion).

Utilisation du 18F-fluorodéoxyglucose dans le contexte de l'infarctus du myocarde

Le fluorodéoxyglucose (FDG) est un analogue du glucose, le groupement hydroxyle du carbone 2 étant remplacé par du fluor-18 (18F-FDG) (Figure 15). La période radioactive du fluor-18 est de 120 minutes.

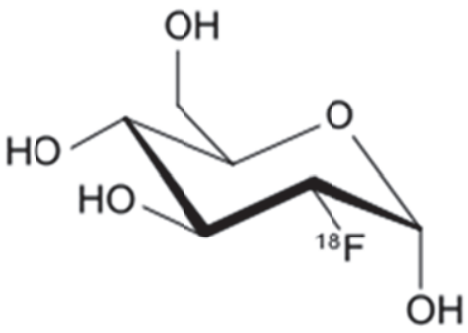


Figure 16. Structure chimique du 18F-FDG

Le 18F-FDG est capté par les cellules au même titre que le glucose, qui lui sera converti en énergie lors du métabolisme glycolytique (Figure 16). Par contre, le 18F-FDG reste bloqué dans la cellule sous forme de 18F-FDG-6 phosphate (18F-FDG-6P) et il n'entre donc pas dans le cycle de Krebs (l'hydroxyle 2 est indispensable à la métabolisation complète du glucose).

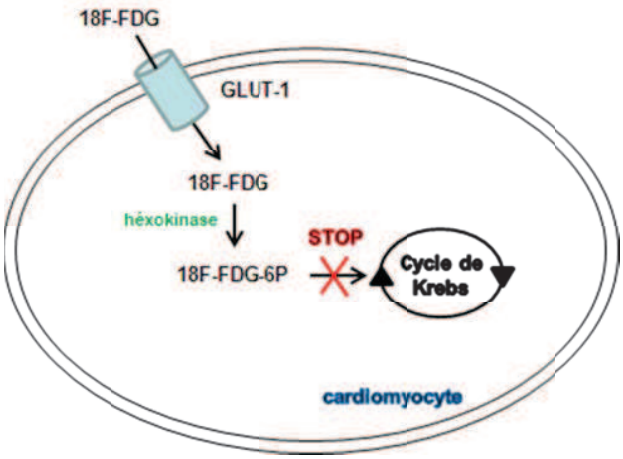


Figure 17. Mécanisme d'accumulation du 18F-FDG dans la cellule cardiaque

Cependant, la captation cellulaire du 18F-FDG est identique à celle du glucose, c'est pourquoi ce traceur est couramment utilisé pour détecter des tissus où le métabolisme glycolytique est augmenté et où, par conséquent, les captations cellulaires de glucose et de 18F-FDG sont augmentées. C'est en particulier le cas de nombreux cancers et dans les tissus inflammatoires et/ou infectés.

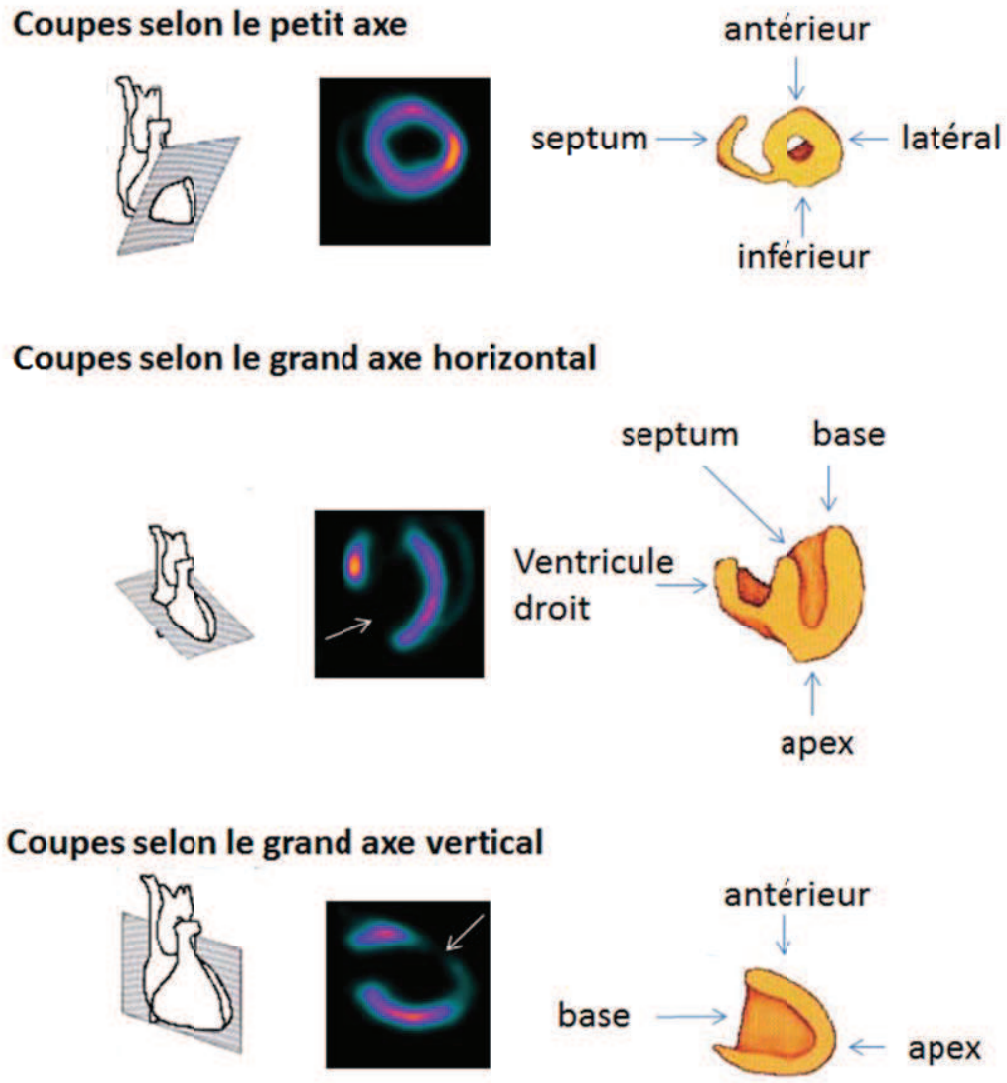
Dans le domaine de l'imagerie cardiaque chez l'homme, le FDG est surtout utilisé dans les bilans de viabilité, après un IDM, pour différencier les tissus détruits (dont la captation en FDG est diminuée) de ceux qui sont encore viables et récupérables (et dont la captation reste élevée).

Par conséquent, en utilisant le 18F-FDG comme radiotraceur pour l'examen TEP, on peut mesurer de façon non invasive l'activité glycolytique du myocarde in vivo, renseignant ainsi sur sa viabilité.

Paramètres cardiaques mesurés par la TEP au 18F-FDG

L'imagerie cardiaque par TEP au 18F-FDG permet de mesurer in vivo la distribution volumique du 18F-FDG au sein du cœur et de renseigner ainsi sur le degré de viabilité des tissus après un IDM, comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent (Figure 18).

L'enregistrement d'images synchronisées sur l'ECG permet également de mesurer plusieurs paramètres du fonctionnement ventriculaire gauche chez l'homme, mais aussi chez le rat : le VTD, le VTS, la FE ((VTD-VTS)/VTD) et les pics de remplissage et d'éjection du VG. Ces paramètres sont couramment utilisés pour évaluer le remodelage ventriculaire gauche après IDM[105, 123]

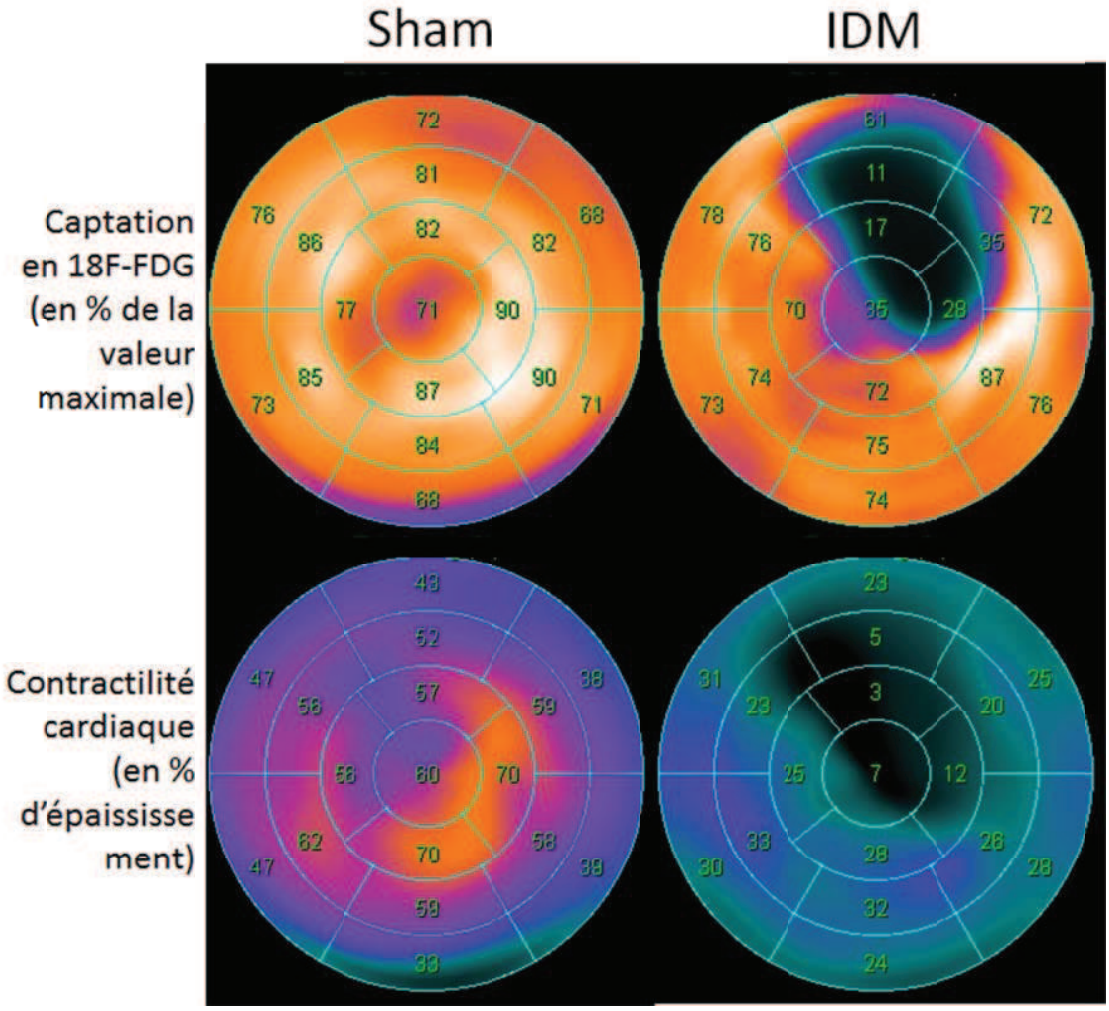


<u>Figure 18.</u> Images cardiaques obtenues au microTEP

La TEP permet d'obtenir des images en 3D du cœur en coupes selon le petit axe et selon ea grand axe horizontal et vertical. Il s'agit ici d'un exemple de rat avec IDM et où la captation antéro-apicale de 18F-FDG est effondrée (flèches noires)

L'imagerie par TEP permet également d'obtenir les valeurs segmentaires de la captation du 18F-FDG et de la contractilité cardiaque. Le paramètre de contractilité que nous avons utilisé est celui du % d'épaississement pariétal, qui est calculé selon le % d'augmentation

de l'activité pariétale entre la télé-diastole et la télé-systole. Ces paramètres segmentaires sont donnés sur des cartes représentant les 17 segments cardiaques selon la segmentation du VG préconisée par l'American Heart Association[124](Figure 19). La captation du 18F-FDG est exprimée en % du voxel ayant la plus forte activité. Chaque segment ayant une captation en 18F-FDG inférieure à 50% et classiquement considéré chez l'homme comme étant totalement nécrotique, mais aucune étude n'avait encore évalué ce paramètre dans le modèle d'IDM chez le rat. Ces résultats sont obtenus avec des logiciels spécifiques, déjà parfaitement validés pour l'imagerie cardiaque par TEP chez l'homme : QPS pour les valeurs segmentaires de captation de FDG et QGS pour les valeurs globales et segmentaires de la contraction.



<u>Figure 19.</u> Cartes polaires obtenues par les logiciels GPS et QGS et représentant les valeurs segmentaires de la captation en 18F-FDG et de la contractilité du VG chez un animal témoin (*sham*) et chez un animal ayant subi une occlusion coronaire (IDM)

Le µImager™

L'activité du 18F-FDG peut également être enregistrée sur des coupes histologiques. Le µImager™ (Figure 20) permet de quantifier la distribution des positrons émis par le 18F-FDG grâce à une méthode proche de celle utilisée en scintigraphie liquidienne (feuille recouverte d'un produit scintillant).

<u>Figure 20.</u> Le µImager™
(source : http://www.raytest.de/bio_imaging/products/products.html)

Le µImager™ est un système autoradiographique quantitatif de haute sensibilité dédié aux émissions d'électrons et de positrons (Figure 21). Les positrons émis par le tissu biologique produisent des photons lumineux dans le film scintillant. Les photons sont

ensuite enregistrés par une caméra qui permet l'obtention d'images de haute résolution (taille de voxel de 20µm) en temps réel représentant la répartition du 18F-FDG sur la coupe histologique.

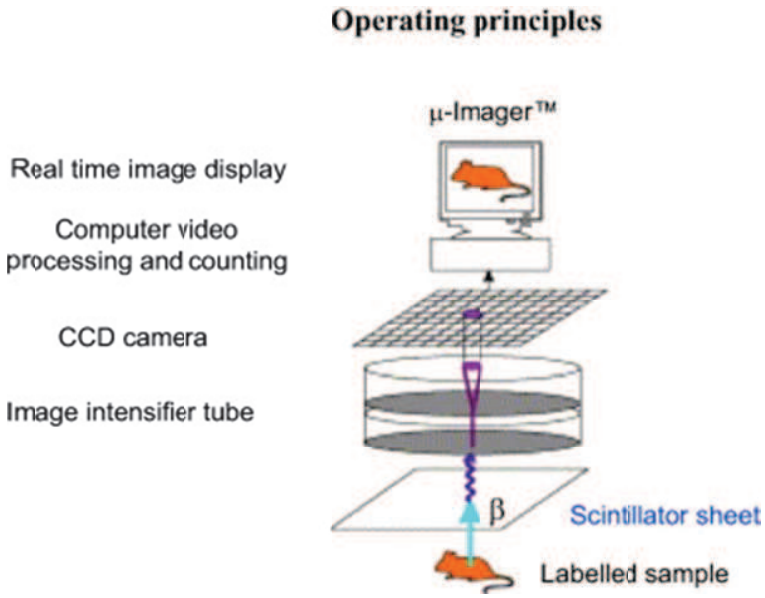


Figure 21 : Principe de l'enregistrement au µImager™ [125]

Les autres techniques d'imagerie non invasive

D'autres techniques d'imagerie non invasives, telles que l'échocardiographie, la SPECT et l'IRM, permettent également d'évaluer les séquelles d'IDM et de mesurer la fonction cardiaque chez l'homme et chez les petits animaux.

Evaluation des séquelles d'IDM et de la viabilité myocardique par les autres techniques d'imagerie non invasive

La viabilité du tissu myocardique, résultant des séquelles d'IDM, peut également être mesurée par échographie, SPECT et IRM.

L'imagerie utilisant des radionucléides (TEP et SPECT) permet de délimiter directement la zone d'IDM dans les modèles animaux[114, 126-128]. Liu et al.[126] ont montré en 2002 que la SPECT au 99mTc-Sestamibi était également un outil précis pour identifier le myocarde nécrosé chez le rat. Wu et al.[127] ont confirmé ces données chez la souris où la SPECT au 99mTc-Sestamibi s'est révélée être une technique qualitative et quantitative précise dans le contexte de l'IDM. Cependant, une étude de notre laboratoire a montré que la SPECT au Sestamibi avait tendance à légèrement surestimer la taille d'IDM chez le rat[105].

L'IRM permet aussi de caractériser et de localiser de façon précise la zone d'IDM chez le porc[129]. De plus, il a été montré que cette technique était capable de caractériser la zone bordant l'IDM chez le mini porc[130] et chez l'homme[131]. L'IRM permet en effet de caractériser très précisément le myocarde nécrosé dans les modèles animaux grâce à l'utilisation d'agents de contraste extracellulaires ou plus spécifiques du processus nécrotique[129, 132].

Evaluation de la fonction cardiaque après IDM par les autres techniques d'imagerie non invasive

L'étude de la fonction cardiaque, qui permet aussi d'évaluer l'importance du remodelage ventriculaire après IDM, peut également être mesurée avec d'autres techniques d'imagerie non invasive que la TEP au FDG (échocardiographie, SPECT et IRM).

En particulier, le remodelage ventriculaire est classiquement évalué par échocardiographie. Cependant, l'utilisation des ultrasons présente de nombreuses limitations. Les paramètres mesurés par échocardiographie résultent d'une extrapolation de mesures effectuées en 2 dimensions et ne permettent pas de délimiter directement la zone d'IDM.

D'autre part, Vanhove et al.[133] ont montré que la SPECT au Sestamibi permettait également de mesurer de façon précise avec une forte reproductibilité les paramètres de la fonction cardiaque après IDM. Dans cette étude, ils ont soumis des rats Wistar à 2 examens SPECT au 99m-Tc Sestamibi à 1 semaine d'intervalle, après induction de l'IDM. Ils ont montré que les images obtenues étaient de très bonne qualité, les volumes mesurés étaient très précis (comparés aux fantômes utilisés) et de haute reproductibilité. L'imagerie par SPECT permet donc de suivre précisément l'évolution de la fonction cardiaque des animaux.

Enfin, L'IRM permet d'évaluer la fonction cardiaque avec de très bonnes résolutions spatiale et temporelle[134-137] grâce à la mesure précise et directe des volumes ventriculaires et de la FE chez les animaux comme chez l'homme[138-141]. En 2007, Higuchi et al.[128] ont comparé la TEP au FDG à l'IRM et ils ont montré que les 2 techniques étaient capables de mesurer quantitativement la fonction cardiaque et de déterminer la zone d'IDM chez les animaux. Cependant, la TEP a l'avantage de renseigner sur l'état métabolique du myocarde[142, 143 142, 143]. L'IRM offre, quant à elle, la possibilité d'imager des cibles au niveau cellulaire telles que les cellules inflammatoires[144] et a également la capacité d'évaluer des paramètres physiologiques, comme la fonction endothéliale des artères coronaires chez l'homme[145].

Toutes ces techniques permettent donc d'estimer les séquelles d'IDM et d'étudier la fonction cardiaque, chez l'animal comme d'ailleurs chez l'homme.

Par contre, cette étude n'est possible qu'en 2 dimensions en échographie et nécessite d'extrapoler ensuite les volumes du VG en 3 dimensions.

L'analyse par IRM nécessite des enregistrements de 15 à 20 coupes en apnée et donc des procédures d'anesthésie plus lourdes.

Les techniques isotopiques que sont la SPECT et surtout la TEP, qui possède une meilleure qualité d'image (meilleur rapport signal/bruit et meilleure résolution spatiale), ont l'avantage de permettre des enregistrements sous une anesthésie légère (sans apnée)

et de pouvoir utiliser des logiciels totalement automatisés pour l'extraction des résultats (QGS et QPS). Ceci permet d'obtenir des résultats très reproductibles, de faire des enregistrements directement en 3 dimensions (pas besoin d'estimer les volumes avec des hypothèses géométriques de forme du VG comme en échographie) et d'évaluer très précisément la viabilité myocardique et donc la sévérité des séquelles de l'IDM, en particulier avec la TEP au FDG qui est une méthode de référence dans cette indication chez l'homme (comme d'ailleurs l'IRM). Les inconvénients de la TEP et de la SPECT sont de ne pas pouvoir estimer l'épaisseur des parois et la masse myocardique (à la différence de l'IRM et de l'échocardiographie), d'évaluer l'épaississement myocardique de manière indirecte (augmentation en systole de l'activité myocardique) et d'utiliser des radio-isotopes.

L'utilisation des radio-isotopes est effectivement un problème, surtout pour la TEP avec la nécessité de la présence à proximité d'un cyclotron. En effet, l'imagerie par TEP et pas SPECT nécessite l'utilisation de différents isotopes qui ont parfois des durées de demi-vie très courtes, comme le 18F-FDG (110 minutes). Un temps de trajet trop long entre le cyclotron et le lieu d'acquisition est donc difficilement envisageable. Le cyclotron de Nancy-Brabois (Figure 22) existe depuis 2002 et permet, en autre, de produire le 18-FDG que nous avons utilisé pour nos expériences.

Figure 22. Le cyclotron de Nancy-Brabois

(Source : http://www.chu-nancy.fr)

MATERIELS ET METHODES

1 Espèces animales

Les expériences ont été réalisées suivant des protocoles approuvés par la Direction Départementale de la Protection des Populations (agréments RAR1A03516811825 et 54-100).

Les animaux ont été hébergés dans une animalerie avec un cycle lumière/obscurité de 12 heures, où la lumière et la température étaient contrôlées. Ils ont eu accès à l'eau de boisson et à une nourriture standard sans restriction.

1.1 Rat Wistar

Les rats utilisés ont été des males de 10-12 semaines de la souche Wistar (Charles River, France). Cette souche de rat non consanguine est communément utilisée en recherche cardiovasculaire.

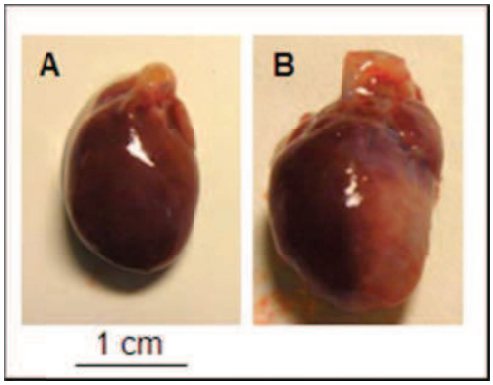
1.2 Souris C57/BL6

Les souris utilisées ont été des males de 8 semaines de la souche C57/BL6 (Charles River, France). Cette souche de souris consanguine est également très fréquemment utilisée.

2 *Protocoles expérimentaux*

2.1 Induction chirurgicale de l'infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde (IDM) a été induit chez des rats males Wistar de 10-12 semaines. L'anesthésie a été induite par un mélange gazeux d'isoflurane et d'oxygène (2-3 % / 1.5 %). L'anesthésie profonde des animaux a été vérifiée par la perte du réflexe de pincement de la patte. Les rats ont ensuite été intubés et ventilés à l'aide d'un respirateur (55 insufflations par minute, 2.5 mL, Harvard Apparatus, Holliston, USA). Le cœur a été exposé via une thoracotomie gauche au niveau du 5ème espace intercostal. Après avoir retiré le péricarde, la partie proximale de l'artère interventriculaire antérieure (IVA) a été ligaturée (à environ 2mm de la naissance de l'aorte) avec un fil de suture permanent (Prolène 7-0, Ethicon, Diegem, Belgique). De la lidocaïne a été utilisée en périopératoire (10mg/kg, Aguettant, France) comme anesthésiant local et afin de limiter la survenue de tachycardie ou fibrillation ventriculaire. Pour finir, la plaie a été suturée en couches avec du fil résorbable (Vicryl 2-0, Ethicon, Diegem, Belgique). L'intubation a été arrêtée lorsque les rats ont récupéré une respiration spontanée. Une antibiothérapie prophylactique systématique a été administrée avec l'injection intramusculaire d'amoxicilline (60mg/kg, Glaxo SmithKline, France).
Pour l'opération *sham*, les animaux ont subi le même protocole chirurgical, à l'exception de la ligature de l'IVA.



<u>Figure 23.</u> Photographies de cœurs de rat 2 mois après IDM ou opération *sham*
A. Cœur de rat après une opération *sham*. B. Cœur de rat ligaturé, le fil de ligature bleu est visible sous l'oreillette, ainsi que la partie infarcie du VG (coloration pale) située sous le nœud de ligature.

2.2 Etude du remodelage ventriculaire précoce

Vingt-six rats Wistar mâles adultes (310-380g) ont été utilisés pour ce premier protocole (Figure 24). 19 rats ont subi une ligature de l'IVA et 7 rats ont subi une opération *sham*. Les animaux ont ensuite été soumis à un examen TEP à 48 heures afin de les répartir en 3 groupes selon leur taille initiale d'IDM et évaluer leur fonction cardiaque de base. Chaque rat a ensuite subi un TEP à 15 jours après IDM pour analyser le remodelage ventriculaire précoce.

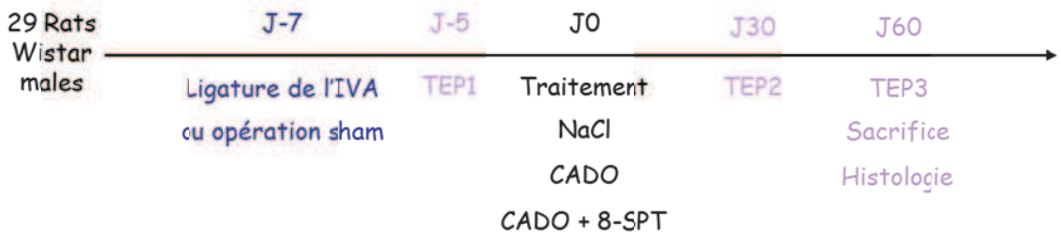
<u>Figure 24.</u> Protocole expérimental permettant d'évaluer le remodelage ventriculaire précoce après infarctus du myocarde chez le rat

A J0, J2 et J15, une prise de sang a été effectuée, dans les veines fémorales gauches et droites, et dans le cœur, respectivement. Le plasma a été aliquoté et congelé à -80°C avec des inhibiteurs de protéases pour les analyses biochimiques.
Après le dernier examen TEP, les animaux ont été sacrifiés avec une dose létale de sodium pentobarbital (200mg/kg, par voie intrapéritonéale) et le cœur a été récupéré pour les analyses histologiques.

2.3 Etude des effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire

Vingt-trois rats Wistar mâles adultes (283-335g) ont subi une ligature de l'IVA pour ce second protocole (Figure 25).
Les animaux ont ensuite été soumis à un examen TEP à 48 heures afin de les répartir dans 3 groupes de traitement en les randomisant selon leur taille initiale d'IDM: un groupe contrôle (NaCl; n=7), un groupe CADO (2-chloroadénosine, l'analogue de l'adénosine stable in vivo ; n=8); et un groupe CADO + 8-SPT (8-sulfophénylthéophylline, un antagoniste des 4 récepteurs à l'adénosine, n=8). Six rats ont subi une opération *sham*.

Le traitement a été administré pendant 2 mois à partir du 7ème jour suivant l'IDM, par voie intrapéritonéale et 2 fois par jour. Deux examens TEP supplémentaires ont été réalisés à 1 mois et 2 mois après le début du traitement afin d'évaluer la fonction cardiaque de chaque animal (Figure 25).



<u>Figure 25.</u> Protocole expérimental permettant d'évaluer les effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire après infarctus du myocarde chez le rat

A J-7 et à J60, une prise de sang a été effectuée, dans la veine fémorale gauche et dans le cœur, respectivement. Le plasma a été aliquoté et congelé avec des inhibiteurs de protéases pour de futures analyses biochimiques.
Après le dernier examen TEP, les animaux ont sacrifiés avec une dose létale de sodium pentobarbital (200mg/kg, par voie intrapéritonéale) et le cœur a été récupéré pour les analyses histologiques.

3 Imagerie cardiaque par TEP

3.1 Prémédication des animaux

Les animaux ont été mis à jeun la veille de l'examen TEP. Le jour de l'examen, ils ont reçu une prémédication orale avec 50mg/kg d'acipimox, la moitié de la dose étant donnée 1 heure avant l'injection de 18F-FDG et l'autre moitié juste avant l'injection de 18F-

FDG. Une activité de 74MBq de FDG (IBA, Nancy, France) est ensuite injectée par la voie intraveineuse sous anesthésie à l'isoflurane (3% isoflurane/ 1,5% air). L'anesthésie des animaux a été vérifiée par la perte du réflexe de pincement de la patte.

3.2 Acquisition des images

L'examen TEP a été enregistré 1 heure après l'injection de FDG sous anesthésie à l'isoflurane (mélange gazeux à 1,5% isoflurane/ 1,5% air). L'anesthésie des animaux a été vérifiée par la perte du réflexe de pincement de la patte. L'appareil utilisé a été un TEP dédié aux petits animaux (Inveon, Siemens, Knoxville, TN, USA).
L'animal a été placé sur une couverture chauffante, son ECG est monitoré grâce à 3 électrodes placées sur la face interne de ses pattes (SA Instruments Inc, Stony Brook, USA). L'acquisition a duré 10 minutes pour l'émission de ^{18}F, plus 6 minutes pour la transmission avec le ^{57}Co.

3.3 Reconstruction des images

Les images ont été reconstruites à l'aide d'un algorithme « 3-D ordered subset expectation maximization » (OSEM-3-D). Cet algorithme comprenant 4 itérations et 16 subsets. Nous avons aussi utilisé une matrice de 128 x 128, un zoom de 2,0 et une épaisseur de 0,8mm. Ces paramètres ont permis d'obtenir des voxels de 0,8 x 0,4 x 0,4 mm. Seize intervalles dans le cycle cardiaque ont été utilisés pour reconstruire les images, offrant une résolution temporelle de 11 à 15 ms pour des fréquences cardiaques allant de 250 à 375 bpm [115].

3.4 Paramètres cardiaques et hémodynamiques

La fréquence cardiaque moyenne pendant l'enregistrement TEP a été extraite des données enregistrées en « list mode ». La pression artérielle systolique (PAS) a été enregistrée 3 à 4 fois pendant l'acquisition par mesure non-invasive à la queue (AD Instruments, Powerlab, France). Seules les valeurs moyennes ont été utilisées pour dans nos analyses. Les images ont été réorientées de façon conventionnelle selon le petit axe, le grand axe vertical et le grand axe horizontal en utilisant un logiciel dédié sur une station Esoft (Siemens, Knoxville, Tennessee, USA). Le VTD, le VTS et la FE du VG ont été obtenus à partir des coupes petit-axe issues des enregistrements couplés à l'ECG, à l'aide du logiciel « Quantitative Gated SPECT » (QGS) [146, 147].

La captation en FDG est exprimée en % de celui du voxel dont l'activité est maximale dans le volume cardiaque. La valeur moyenne est déterminée dans chaque segment cardiaque, selon la classification en 17 segments établie par l'American Heart Association [148] et avec le logiciel « Quantitative Perfusion Score » (QPS).

Le logiciel QGS permet également de mesurer les valeurs segmentaires d'épaississement myocardique grâce au % d'augmentation de l'activité en systole [146], paramètre fortement corrélé au % d'épaississement myocardique en SPECT et en TEP, en raison de l'effet du volume partiel [149, 150]. Les segments ayant une captation moyenne en FDG <50% de la valeur maximale sont considérés nécrosés chez l'homme [123]. Cette valeur peut donc être utilisée pour évaluer l'étendue des séquelles inhérentes à d'IDM chez l'homme, mais aucune étude n'avait encore montré sa valeur après IDM chez le rat. Dans notre étude, nous avons caractérisé les segments infarcis en utilisant ce même critère de fixation <50% du maximum. Dans une première étude, nous avons validé ce critère par des corrélations avec les résultats obtenus sur coupes histologiques. D'autre part, nous avons défini les segments sains comme ceux étant distants d'au moins un segment des segments nécrosés, les segments intermédiaires étant les segments restants.

Dans notre étude concernant les effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire après IDM, nous avons analysé l'évolution sous traitement de la contractilité segmentaire des 17 segments de chacun des 23 rats, soit un total de 391 segments.

4 Echantillons biologiques

4.1 Coupes histologiques

Après le dernier examen TEP, les animaux ont été sacrifiés avec une dose létale de sodium pentobarbital (200mg/kg, IP), le cœur a été récupéré, rincé dans du sérum physiologique, puis rempli par un milieu de cryoconservation (Optimal Cutting Media, VWR, France). Des coupes consécutives de 8µm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat à -22°C, selon le grand axe vertical ou horizontal du coeur, en fonction du sire de la zone infarcie. Une coupe a été sélectionnée pour être immédiatement enregistrée pendant 4 heures au µImager™ (Biospace Lab, Paris, France) afin de quantifier la distribution de l'activité du FDG sur la coupe entière.

4.2 Plasmas

Le sang veineux a été prélevé dans des tubes héparinés (Vacutainer, BD, Belgique) puis immédiatement centrifugé à 900g pendant 15 minutes. Le plasma a ensuite été aliquoté avec des inhibiteurs de protéases (mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail**,** Roche Applied Science, Lennik, Belgique) puis stocké à -80°C.

5 Analyses histologiques

5.1 Colorations histologiques

Tous les réactifs utilisés pour les colorations histologiques provenaient de chez Sigma-Aldrich, sauf mention contraire.

5.1.1 Détection de la fibrose par le Rouge Sirius

Lors de l'étude de cas concernant le rat ayant survécu à un infarctus très étendu, nous avons étudié la fibrose présente dans le tissu cardiaque. Pour cela, une coupe a été traitée au Rouge Sirius qui colore les fibres de collagène et de réticuline en rouge et les cytoplasmes en jaune.
Les coupes rincées au PBS ont été colorées pendant 1 heure au Rouge Sirius, puis elles ont été rincées à l'eau du robinet. Elles ont ensuite été déshydratées par des bains successifs de 30 secondes dans de l'éthanol à 95°, puis par 2 bains d'éthanol absolu et enfin par 1 bain de toluène. Elles ont ensuite été fixées dans un milieu de montage adapté (Eukitt) et conservées à température ambiante.

5.1.2 Détection de la fibrose par le trichrome de Masson

Dans le cadre des études sur le remodelage précoce après IDM et sur la caractérisation des effets de l'adénosine sur le remodelage tardif, nous avons analysé les coupes de cœur colorées au trichrome de Masson. Cette coloration trichromique associe une coloration nucléaire par l'hématoxyline, une coloration cytoplasmique par le rouge ponceau (fuchsine acide et ponceau xylidine), un traitement par l'acide phosphomolybdique dépouillant les fibres de collagènes et une coloration par le bleu d'aniline. Les coupes ont été traitées comme suit: elles ont été rincées puis colorées 5 minutes à l'hématoxyline, ensuite elles ont été rincées puis colorées au rouge Ponceau pendant 10 minutes. Elles ont ensuite été rincées puis traitées 5 minutes à l'acide phosphomolybdique avant d'être colorées 2 minutes au bleu d'aniline. Enfin, elles ont été traitées à l'eau acétifiée 1% pendant 5 minutes puis déshydratées par des bains successifs de 30 secondes dans de l'éthanol à 70°,90°,100°, puis dans un bain de toluène. Elles ont ensuite été montées entre lame et lamelle avec de l'Eukitt et conservées à température ambiante jusqu'à analyse au microscope optique.
Le dépôt de collagène a été analysé et quantifié en omettant la fibrose des zones périvasculaires, du péricarde et de l'endocarde [151]. La fibrose de la zone bordant l'IDM (zone située entre la zone de tissu sain et la zone infarcie) a été quantifiée dans 3 champs pris au hasard sur chaque coupe de cœur, au grossissement x400. Le degré de fibrose a

été obtenu en divisant l'aire de dépôt de collagène par l'aire totale du champ analysé, grâce au logiciel ImageJ v1.42. Cette exclusion de la fibrose périvasculaire est également prise en compte dans la méthode de référence mise au point par KT. Weber pour quantifier le dépôt de collagène[152].

5.1.3 Coloration morphologique par l'hématoxyline et l'éosine

Dans le cadre de l'étude des effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire après IDM, nous avons quantifié l'angiogenèse dans les coupes de cœur des animaux. Pour cela, les coupes ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. L'hématoxyline basophile colore les noyaux en bleu. L'éosine, acide, colore les cytoplasmes en rouge. Après rinçage au PBS, les coupes sont colorées 8 minutes à l'hématoxyline. Cette coloration a été amplifiée avec un bain sous l'eau du robinet pendant 8 minutes. L'éosine a été incubée pendant 30 secondes puis les coupes ont de nouveau été rincées. Enfin, les coupes ont été déshydratées dans des bains successifs, de 30 secondes chacun, d'éthanol à 70°/90°/100° puis par un dernier bain de toluène. Enfin, les coupes ont été montées avec de l'Eukitt puis conservées à température ambiante jusqu'à analyse au microscope optique (Leica).
Le nombre de vaisseaux a été quantifié sur la totalité de chaque coupe au grossissement x100 en utilisant le logiciel ImageJ v1.42.
La surface des cardiomyocytes sectionnés de façon transversale a été mesurée de façon aléatoire sur 5 champs par coupe, pris dans les zones saines, au grossissement x100 en utilisant le logiciel ImageJ v1.42. La surface moyenne a ensuite été calculée au sein de chaque groupe expérimental.

5.2 Marquages immunohistologiques

5.2.1 Révélation par colorimétrie

Dans le cadre de l'étude du remodelage précoce à 15 jours post IDM, nous avons étudié un marqueur du remodelage ventriculaire: l'α-sarco-actinine qui est un élément majeur du cytosquelette. Pour chaque animal de l'étude, une coupe de cœur a été décongelée à température ambiante puis rincée au PBS. Les péroxydases endogènes ont été saturées avec 3% de péroxyde d'hydrogène. Les sections ont ensuite été préincubées avec une solution de BSA à 3% puis incubées toute la nuit avec l'anticorps primaire (Mouse monoclonal IgG1, EA-53, Abcam, Cambrodge, UK) dilué au 100ème. Un anticorps secondaire (Donkey anti Mouse) couplé à la péroxydase du raifort (HRP) (Jackson Immunoresearch, Oaks Drive, GB) et dilué 400 fois a été incubé pendant 1 heure à température ambiante. Après lavage, les sections ont été visualisées avec 0.05% de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride déhydrate (DAB) et les noyaux ont été colorés à l'hématoxyline. Les images ont été analysées au microscope optique au grossissement x400.

5.2.2 Révélation par fluorescence

Dans le cadre de l'étude des effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire après IDM, nous avons effectué un co-marquage immunohistologique de l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA) et d'un marqueur de cellules progénitrices, le c-Kit, pour voir si les effets cardioprotecteurs de l'adénosine passaient par une régulation de la prolifération de cellules progénitrices. Pour ce faire, les coupes de cœur congelées ont été rincées au PBS puis fixées 10 minutes au paraformaldéhyde (PFA) et perméabilisées au Triton 0.1% pendant 15 minutes. Les sites aspécifiques ont ensuite été bloqués pendant 1 heure avec une solution de PBS-3% BSA-5% sérum. Puis les anticorps primaires (Mouse monoclonal anti PCNA, IgG2a clone PC10 et rabbit polyclonal anti c-Kit, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne), dilués 50 fois dans la solution de blocage au 10ème, ont été incubés sur les coupes toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les coupes ont été rincées et les anticorps secondaires (Alexa Fluor® 532-coupled Goat anti Mouse et Alexa Fluor® 635coupled Goat Anti-Rabbit respectivement) (Invitrogen, Merelbeke, Belgique) dilué 1000 fois dans la solution de blocage au 10ème, ont été incubés 1 heure à température ambiante.

Pour étudier les effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire, nous avons également caractérisé la densité vasculaire dans le cœur après IDM. Pour cela, nous avons préalablement quantifié les vaisseaux avec une coloration à l'hématoxyline et à l'éosine (cf. 5.1 Colorations histologiques). Puis, afin de confirmer la présence d'un endothélium sur les structures analysées, nous avons effectué un marquage immunohistologique avec le CD31, marqueur endothélial. Pour cela, les coupes ont été rincées, puis fixées 10 minutes au paraformaldéhyde. Les sites aspécifiques ont ensuite été bloqués pendant 1 heure avec une solution de PBS-3% BSA-5% sérum. Puis l'anticorps primaire (Mouse monoclonal anti CD31, IgG1 clone P2B1, Abcam Cambridge, GB), dilué 400 fois dans la solution de blocage au 10ème, a été incubé sur les coupes toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les coupes ont été rincées et l'anticorps secondaire (Alexa Fluor® 488-coupled Donkey anti Mouse) (Invitrogen, Merelbeke, Belgique) dilué 1000 fois dans la solution de blocage au 10ème a été incubé à température ambiante pendant 1 heure.

Nous avons également effectué un triple marquage immunohistologique CXCR4/ALDH2/CD31, pour marquer les cellules endothéliales progénitrices (EPC). Pour cela, les coupes ont été rincées au PBS, fixées et perméabilisées au méthanol pendant 10 minutes puis elles ont été bloquées au PBS-3% BSA- 5% sérum pendant 1 heure. Les anticorps primaires utilisés étaient les suivants: Goat polyclonal anti ALDH2, dilution 1/50 (Santa Cruz Biotechnology), Mouse monoclonal anti CD31, clone P2B1, dilution 1/400 (Abcam) et Rabbit polyclonal anti CXCR4, dilution 1/300 (Abcam). Ils ont été dilués dans la solution de blocage au 10ème et incubés sur les coupes toute la nuit à 4°C. Le lendemain, les coupes ont été rincées et incubées avec les anticorps secondaires (Alexa Fluor® 488-coupled donkey anti-mouse, Alexa Fluor® 568-coupled donkey anti-goat et Alexa Fluor® 688-coupled donkey anti-rabbit (Invitrogen)), dilués 400 fois dans la solution de blocage au 10ème.

Enfin, nous avons testé les effets de l'adénosine sur l'apoptose 2 mois après IDM. Pour cela, nous avons effectué un marquage avec l'annexin-5. Les coupes ont été rincées et

fixées 10 minutes au PFA 4%. Ensuite, les sites aspécifiques ont été bloqués comme précédemment décrit, puis les coupes ont été incubées toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire (Rabbit polyclonal anti Annexin 5, Abcam) dilué 100 fois dans la solution de blocage au 10ème. Le lendemain, les coupes ont été rincées puis l'anticorps secondaire (Alexa Fluor® 635-coupled Goat Anti-Rabbit, Invitrogen) a été incubé pendant 1 heure à température ambiante, dilué 1000 fois dans la solution de blocage au 10ème.

Pour tous les marquages immunohistologiques en fluorescence :

Après l'incubation avec le(s) anticorps secondaire(s), les coupes ont été rincées puis les noyaux ont été marqués pendant 5 minutes au DAPI (Invitrogen) dilué 20 000 fois dans du PBS. Enfin, les coupes ont été rincées puis montées entre lames et lamelles avec un milieu de montage adapté (Eukitt). Les coupes ont été conservées à -20°C à l'abri de la lumière jusqu'à analyse au microscope confocal (Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510, Carl Zeiss Microscopy) au grossissement 400 à l'aide du logiciel LSM 510 META (Carl Zeiss Microscopy, Allemagne). La spécificité des marquages a été testée à l'aide de coupes contrôles dont le protocole de marquage n'inclut pas l'incubation avec les anticorps primaires.

5.3 µImager™

5.3.1 Acquisition au µImager™

Immédiatement après le dernier examen TEP, les animaux ont été sacrifiés avec une dose létale de sodium pentobarbital (200mg/kg, IP) et des coupes consécutives de 8µm ont été réalisées (cf 4.1 coupes histologiques). Une coupe incluant la zone d'infarctus chez les rats avec IDM a immédiatement été enregistrée au µImager™ pendant 4 heures (Biospace Lab, Paris, France, http://www.biospacelab.com).

5.3.2 Analyse quantitative des données issues du µImager™

Pour le protocole d'analyse du remodelage ventriculaire à 15 jours post IDM, nous avons effectué une analyse quantitative pour caractériser les segments présentant moins de 50% de captation en FDG sur les données TEP. Ce critère est couramment utilisé chez l'homme pour définir le myocarde nécrosé et donc non viable [116, 153-155]. Pour chaque rat, nous avons identifié les 7 segments visibles sur la coupe de cœur selon le grand axe vertical (d'après la division du ventricule gauche en 17 segments selon l'AHA [148]). Nous avons ensuite quantifié deux paramètres dans chacun de ces 7 segments: l'activité en FDG mesurée par le µImger™ et l'épaisseur ventriculaire moyenne mesurée en 3 endroits. Cette dernière mesure est également un index de viabilité tissulaire [100, 153, 156]. Finalement, les valeurs de ces deux paramètres, qui ont été obtenues pour chacun des segments ayant une captation en FDG <50% sur les images TEP à 15 jours, ont été exprimées en % des valeurs moyennes calculées dans les segments viables de la même coupe histologique (segments non adjacents aux segments nécrosés).

6 Matrigel™ Plug assay

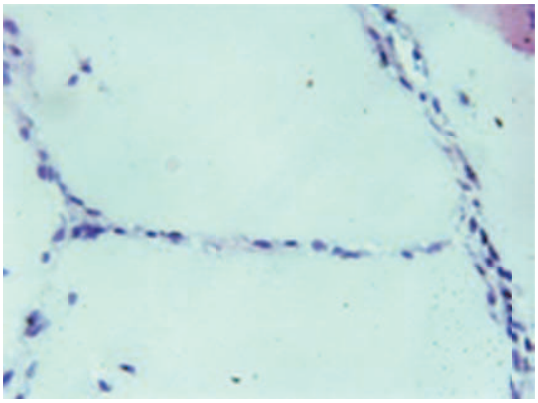
6.1 Protocole expérimental

15 souris males C57/BL6 de 8 semaines ont été utilisées (cf 1.2 souris C57/BL6).
Du Matrigel™ réduit en facteurs de croissance et très concentré (18-22 mg/mL) (BD Biosciences) a été mélangé sur glace avec 100ng/mL de MCP3 murine (Peprotech). Un volume de 500µL de ce mélange a été injecté en sous-cutané dans les 2 aines de 9 souris, qui étaient anesthésiées au préalable avec un mélange gazeux d'isoflurane (3% isoflurane/1,5% air). L'anesthésie des animaux a été vérifiée par la perte du réflexe de pincement de la patte. Du Matrigel™ contenant 50µL de NaCl a été injecté à 6 souris contrôles. Vingt unités d'héparine (Tocris Bioscience, Bristol, UK) ont été ajoutées dans chaque mélange pour éviter une coagulation.

Des anticorps anti CCR1 (33µg/souris, R&D systems Europe, Oxon Abingdon, GB) ou l'isotype contrôle (Sheep IgG) ont été injectés à certaines souris aux jours 1, 3 et 6. Le 7ème jour, les animaux ont été sacrifiés avec une dose létale de sodium pentobarbital (200mg/kg, par voie intrapéritonéale). Les *plugs* ont ensuite été retirés de l'abdomen et disséqués afin de retirer la plupart des tissus environnants. Ils ont été placés dans une solution de PBS contenant 3,7% de formaldéhyde à température ambiante pendant 48 heures. Les *plugs* ont été ensuite inclus dans la paraffine, puis des coupes de 5µm ont été effectuées.

6.2 Analyses histologiques des coupes de Matrigel™ *Plug*

Les coupes ont été déparaffinées puis colorées à l'hématoxyline et à l'éosine. Les microvaisseaux ont été quantifiés dans les sections entières à l'aide d'un microscope optique (Leica) au grossissement x 100. Les microvaisseaux visibles à une distance d'au moins 50µm du bord du *plug* (et donc du tissu natif) ont été considérés comme nouvellement formés et non comme faisant partie des vaisseaux préexistants dans le tissu natif. Un micro-vaisseau est défini comme un anneau ou une structure cylindrique contenant une couche de cellules endothéliales interne. Les micro-vaisseaux ramifiés ont été numérés à 1 de moins que le nombre de bras (par exemple: pour un micro-vaisseau en forme de « Y », on comptera 2 micro-vaisseaux et non 3) (Figure 26).



<u>Figure 26.</u> Coupe de Matrigel™ *Plug* colorés à l'hématoxyline-éosine et montrant 4 microvaisseaux

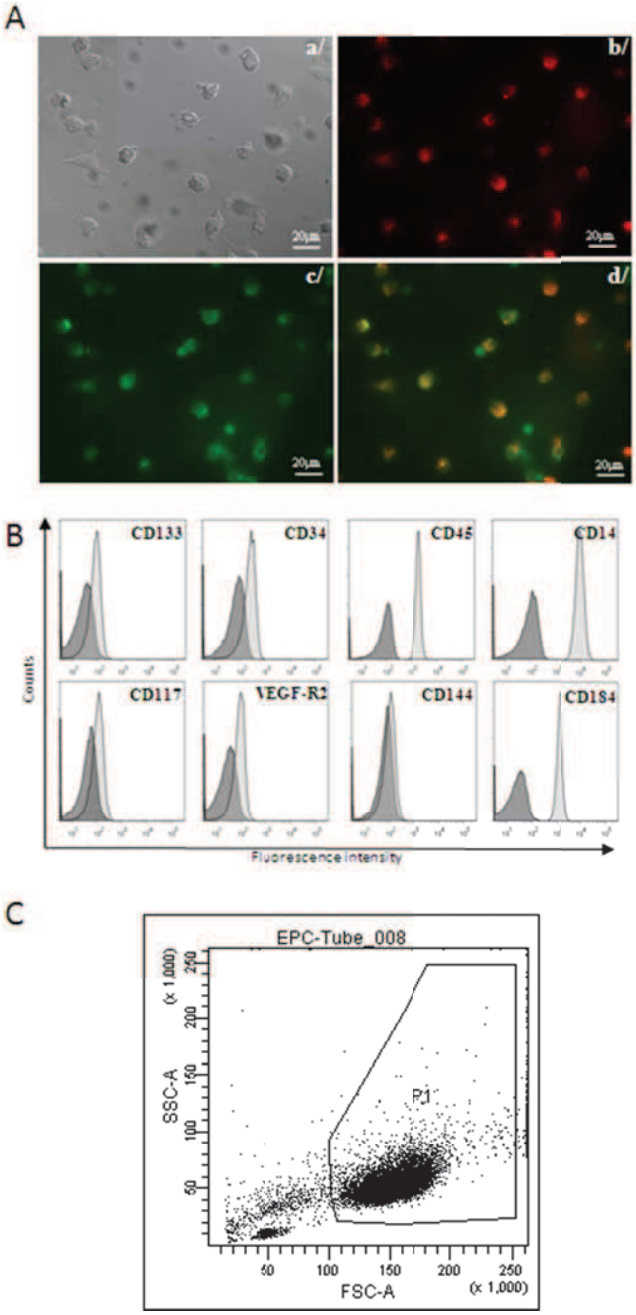
Deux coupes par plug ont été utilisées pour les analyses histologiques (1 coupe à une extrémité du *plug* et 1 coupe prise au milieu du *plug*).
Pour analyser le recrutement des cellules endothéliales responsables de la néo-vascularisation des *plugs*, nous avons effectué une coloration avec le marqueur des cellules endothéliales, le CD31 (Mouse monoclonal IgG1, P2B1, Abcam, Cambridge, UK) sur 2 coupes représentatives de chaque groupe (dilution au 200ème). Un anticorps secondaire (Goat anti Mouse) couplé à l'Alexa Fluor®488 est utilisé, dilué 300 fois. Les images sont analysées au grossissement x400 avec un microscope confocal (Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510) et à l'aide du logiciel LSM 510 META. Les noyaux sont colorés en bleu avec le DAPI.

7 Culture cellulaire

Les expériences menées sur les cellules primaires humaines (EPC, macrophages et neutrophiles) sont conformes aux principes de la déclaration d'Helsinki. Elles ont été approuvées par le comité d'éthique national luxembourgeois et un consentement a été obtenu de la part de chaque donneur.

7.1 Cellules endothéliales progénitrices humaines (EPC)

Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) ont été isolées à partir de sang veineux de volontaires sains par séparation selon un gradient de Ficoll dans des tubes Leucosep (Greiner Bio-One, Wemmel, Belgique). Les EPC ont été obtenues par une méthode précédemment décrite[157, 158]. Brièvement, 8.10^6 de PBMC ont été mises en culture dans des plaques 6 puits coatées avec de la fibronectine humaine (2,5µg/cm^2). Le milieu de culture était le milieu spécifique pour les cellules endothéliales supplémenté avec de l'extrait de cerveau bovin, du facteur de croissance endothélial recombinant humain, de l'hydrocortisone, de la gentamicine, de l'amphotéricine B et 20% de sérum de veau fétal (FCS) (Lonza, Verviers, Belgique). Après 3 jours, les cellules non adhérentes ont été retirées et les cellules adhérentes ont été gardées en culture pendant 24h. Les EPC étaient positives pour les marqueurs suivant identifiés en cytométrie en flux (CD133+/CD34+/CD45+/CD14+/CD31+/vWF+/VEGFR2+/CD144-/CD105+) et double-positives pour la lectine endothéliale-spécifique (Ulex, Europaeus) et pour la lipoprotéine acétylée de faible densité marquée à la 1,1_-dioctadecyl-3,3_,3_-tetramethylindo-carbocyanine (DilAcLDL) (Invitrogen, Merelbeke, Belgique) (Figure 27).



<u>Figure 27.</u> Caractérisation des EPC.

A. Photographies d'EPC obtenues 4 jours après la mise en culture de cellules mononucléaires du sang périphérique ((a) contraste de phase, (b) marquage DilAcLDL, (c) marquage lectine, (d) superposition des 2 marquages).

B et C. Analyse par cytométrie en flux. (A: expression des marqueurs de surface. B: profil taille/granulométrie des EPC (encadré P1))

7.2 Monocytes/macrophages primaires humains

Les monocytes primaires ont été purifiés à partir des PBMC de volontaires sains par une sélection négative grâce au kit Monocyte Isolation Kit II (Myltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Allemagne) comme précédemment décrit[20, 21]. Ils ont ensuite été différenciés en macrophages par un traitement de 7 jours avec du macrophage-colony stimulating factor (MCSF, 50ng/mL), puis ils ont été prétraités ou non avec une gamme de PCI (1pM, 100pM, 10nM, 1µM) pendant 15 minutes avant d'être activés avec de l'héparan sulfate (HS, 100µg/mL et 10ng /mL), de l'acide hyaluronique (HY, 50µg/mL), ou du lipopolysaccharide (LPS, 100ng/mL) pendant 24 heures. Les milieux de culture ont été ensuite récoltés puis conservés à -80°C avec des inhibiteurs de protéases jusqu'à analyse biochimique.

7.3 Neutrophiles primaires humains

Les neutrophiles ont été isolés du sang veineux de volontaires sains. Un gradient de Ficoll a permis de séparer les PBMC des neutrophiles. Ces derniers, situés dans le culot cellulaire obtenu après centrifugation, ont été traités au Dextran afin d'être séparés des hématies contenues également dans le culot. Le surnageant récupéré contenait les neutrophiles qui ont été mis en culture dans du milieu RPMI sans antibiotiques ni sérum, supplémenté en acides aminés essentiels et en pyruvate à raison de 500 000 cellules par puits dans des plaques 24 puits.
Après avoir été mises au repos pendant 2 heures, les cellules ont été traitées pendant 5 minutes avec différentes concentrations de PCI (10pM, 1nM, 10nM), puis elles ont été activées pendant 15 minutes avec 10^{-7}M de fMLP. Les milieux de culture ont ensuite été récoltés puis conservés à -80°C avec des inhibiteurs de protéases jusqu'à l'analyse biochimique.

7.4 Cellules endothéliales primaires d'artères coronaires humaines (HCAEC)

Les cellules endothéliales primaires d'artères coronaires humaines (HCAECs) (Lonza, Verviers, Belgique) ont été mises en culture selon les recommandations du fournisseur. Le milieu de culture spécifique des cellules endothéliales (Bullekit) contient plusieurs suppléments : de l'extrait de cerveau bovin, de l'héparine, du facteur de croissance endothélial, de l'hydrocortisone, de la gentamicine et de l'amphotéricine et du sérum de veau fœtal. Les cellules ont été reçues congelées. Elles ont été décongelées puis mises en culture à 37°c sous 5% de CO_2 et leur milieu était changé tous les 2 jours jusqu'à ce qu'elles atteignent 80% de confluence. Elles ont ensuite été trypsinisées puis ont subi les différents traitements avant que leur milieu ne soit récupéré pour être analysé.

7.5 Cellules endothéliales primaires microvasculaires humaines (HMVEC)

Les cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMVECs) (Lonza) ont été mises en culture selon les recommandations du fournisseur. Leur milieu de culture est spécifique des cellules endothéliales (Bullekit), plusieurs suppléments lui ont été ajoutés : facteur de croissance des cellules endothéliales, hydrocortisone, gentamicine et amphotéricine, 2% de sérum de veau fœtal, VEGF, facteur de croissance des fibroblastes, facteur de croissance insulinique, acide ascorbique. Brièvement, les cellules ont été décongelées puis mises en culture à 37°C sous 5% de CO_2. Le milieu des cellules était changé tous les deux jours, puis lorsque le tapis cellulaire a atteignait 80% de confluence, les cellules ont été trypsinisées puis remises en culture à la concentration désirée. Elles ont ensuite été mises sous traitement et les milieux ont été récupérés pour les analyses biochimiques.

7.6 Fibroblastes/myofibroblastes primaires cardiaques humains

Les fibroblastes cardiaques humains ont été obtenus chez TCS CellWorks Ltd (Buckingham, GB) et ont été mis en culture dans du milieu pour fibroblastes supplémenté avec des facteurs de croissance spécifiques (facteur de croissance de fibroblastes, et pénicilline/streptavidine) et 2% de sérum de veau fœtal. Avant traitement, ils ont été rendus quiescents dans du milieu de culture supplémenté avec de l'insuline (10µg/mL), de la transferrine (5,5µg/mL), de la sélénite de sodium (5pg/mL), de l'albumine bovine sérique (BSA, 0,5mg/mL) et de l'acide linoléique (4,7µg/mL) pendant 5 heures.
Les myofibroblastes ont été obtenus par différenciation des fibroblastes avec du transforming growth factor β (10ng/mL) (PeproTech) pendant 24 heures.

8 *Test de cytotoxicité*

Avant d'étudier les effets d'une nouvelle molécule sur les cellules, nous avons testé la cytotoxicité des différentes concentrations utilisées dans nos protocoles.
Pour cela, nous avons mesuré l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans les milieux de culture des cellules traitées. Lorsque les cellules sont lysées, elles relarguent cette enzyme dans le milieu extracellulaire. Nous avons utilisé le kit de révélation colorimétrique de chez Roche (Roche Applied Science, Lennik, Belgique).
Un contrôle positif était réalisé en traitant un puits de cellules avec du Triton à 2% (concentration finale) 5 minutes avant de commencer le protocole. Ce contrôle a permis d'obtenir la valeur d'absorbance correspondant à 100% de mortalité cellulaire.
Lors de la première étape, le tetrazolium est catalysé en formazan en présence de LDH. La quantité de LDH du milieu est donc directement corrélée à la quantité de formazan formé. Puis le formazan est révélé par colorimétrie. Les surnageants ont été incubés pendant 30 minutes à température ambiante avec le tetrazolium et le colorant, puis l'absorbance est lue à 492nm à l'aide d'un fluoromètre, le POLARstar Optima (BMG

LABTECH). Le taux de mortalité cellulaire est exprimé en % d'absorbance par rapport à la valeur d'absorbance mesurée dans le contrôle positif.

9 Chimiotaxie in vitro : le Transwell™ assay

Les expériences de chimiotaxie in vitro ont été réalisées dans des plaques Costar® 24 puits contenant des membranes perméables avec des pores de 5µm (Transwell™ VWR, Leuven, Belgique). Toutes les expériences ont été réalisées dans du milieu de culture endothélial sans antibiotiques et avec 5% de sérum de veau fœtal. Une suspension cellulaire d'EPC a été réalisée, contenant $1,8x10^6$ cellules/mL et 100µL de cette suspension ont été distribués dans les chambres supérieures des Transwell™.
La migration cellulaire à travers la membrane a étét mesurée après lyse cellulaire par marquage de l'ADN en utilisant le CyQUANT® Cell Prolifaration Assay Kit (Invitrogen, Merelbeke, Belgique). La fluorescence a été mesurée par excitation à 480nm et émission à 520 nm avec le logiciel POLARstar OPTIMA (BMG Labtech, Paris, France).

Pour les expériences impliquant la MCP3, les EPC, une fois suspendues à raison de $1,8x10^6$ cellules/mL, ont été en partie traitées avec un anticorps anti-CCR1 (clone 53504, R&D System) et/ou anti-CCR7 (clone 15503, R&D System) (10µg/mL) pendant 30 minutes à 37°C. Puis les cellules, traitées ou non, ont été déposées dans les chambres supérieures des Transwell™ comme précédemment décrit. Les Transwell™ ont ensuite été transférés dans les plaques 24 puits contenant un gradient de MCP3 recombinante humaine (MCP3, Peprotech) ou de Macrophage Inflammatory Protein 3ß recombinant humain (MIP3ß, Peprotech) (0 à 100ng/mL) ou du milieu conditionné de macrophages humains primaires traités avec 100µg/mL d'héparan sulfate (HS) pendant 24 heures. Après 6 heures, la migration cellulaire a été évaluée comme décrit précédemment.

10 Analyses biochimiques et moléculaires

10.1 Microarrays

L'ARN messager (ARNm) a été analysé par microarrays selon un protocole décrit précédemment [159]. L'ARN total a été extrait des cellules, quantifié avec un Nanodrop (Nanodrop products, Wilmington, USA) et sa qualité a été évaluée à l'aide d'un Bio Analyser (Agilent Technologies, Santa-Clara, USA). L'ARNm a ensuite été amplifié avec le kit Amino Allyl Message Amp® kit (Ambion, Austin, USA). L'ADN complémentaire (ADNc) a ainsi été obtenu puis marqué à la cyanine (Cy3 ou Cy5) et hybridé sur des lames de microarrays humaines reconnaissant 25 000 gènes [160]. Les lames de microarrays ont été scannées avec un scanner Axon 3000 B (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) et les données brutes ont été acquises avec le logiciel Genepix pro 6.0 (Molecular Devices). Les données sont disponibles dans la base publique Gene Expression Omnibus avec le numéro d'accès GSE26744. Les niveaux d'expression ont été comparés en utilisant le logiciel Significance Analysis of Microarrays [161]et les cartes d'expression ont été générées par les logiciels TreeView[162] et Cluster 3.0[163].

10.2 PCR quantitative en temps réel

L'ARN total (ARNt) des cellules a été isolé avec du TriReagent® en utilisant le RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les instructions du fournisseur. Une contamination éventuelle de l'ADN génomique a été éliminée avec un traitement à la DNase I (Qiagen). Une quantité d'1µg d'ARNt a été retro-transcrit en utilisant la Superscript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Les amorces ont été élaborées grâce au logiciel Beacon Designer (Premier Biosoft, Palo Alto, USA), en prenant soin de les choisir, si possible, entre 2 introns (Tableau 2). La PCR a été réalisée avec les ADNc dilués 10 fois dans un iCycler® avec le IQTM SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Nazareth Eke, Belgique). Les conditions de la PCR étaient les suivantes : 3 minutes à

95°C, 30 secondes à 95°c et 1 minute d'élongation (chacune de ces 3 étapes étant répétée 40 fois). La température optimale d'annihilation a été déterminée pour chaque paire d'amorces. L'analyse du point de fusion a été obtenue après 80 cycles de 10 secondes passant de 55°C à 95°C. Un contrôle négatif (PCR réalisée sans échantillon d'ADNc) a été inclus dans chaque expérience. La ß-actine a été choisie comme gène de référence afin de normaliser les résultats. Les niveaux d'expression ont été calculés par la méthode de quantification relative $2^{\Delta CT}$ grâce au logiciel Genex (Bio-Rad), qui prend également en compte l'efficacité des amorces, cette efficacité était déterminée au préalable pour chaque paire (Tableau 3).

Gene	Accession number	Forward primer	Reverse primer	T°C d'hybridation
CCR1	NM_001295	GACGGAAGAGT TGAGACCTAACG	AGCCCACTCCC TGAATTGTTTG	56
CCR2	NM_000648	CGAGAAGAAGA GGCATAGG	GCAGCAGTGAG TCATCC	62
CCR3	NM_001837	GGCAGATACATC CCATTCCTTCC	GCTTCATCTCCT TGGTCCTTCC	60

Tableau 3. Liste des amorces utilisées pour les RT-qPCR

10.3 Cytométrie en flux

Les cellules ont été récoltées dans une solution de dissociation cellulaire non-enzymatique et lavées 2 fois dans du PBS (Lonza) supplémenté avec 1% de BSA. Une quantité de 200 000 cellules a été traitée avec la quantité appropriée de Fc blocking reagent (Miltenyi, Utrecht, Pays-Bas) puis ces cellules ont été marquées avec les anticorps spécifiques ou les isotypes contrôles dans 50µL de PBS-1% BSA pendant 30 minutes à 4°C. Après lavage, les cellules ont été fixées avec la solution BD FACS-lysis selon les instructions du fournisseur. Tous les anticorps provenaient de chez Immunotools (Friesoythe, Allemagne), à l'exception du CD184-APC (BD Biosciences, Erembodegem,

Belgique), CCR1 (IgG2b-PE clone 53504, R&D System, Oxon, GB), CCR2 (IgG2b-Alexa 647 clone 12G5, BD Biosciences) et CCR3 (IgG2a-APC clone 61828, R&D). Afin d'exclure les cellules mortes de l'analyse, un kit LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain Kit a été utilisé selon les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Une quantité de 20 000 à 40 000 événements a été acquise à l'aide d'un cytomètre de flux BD FACSCanto™ et ces événements ont été analysés avec le logiciel FACSDiva™ (BD Biosciences). Les superpositions d'histogrammes, représentant la taille des cellules en fonction de la granulométrie, ont été obtenues à la suite d'un traitement avec le logiciel FlowJo 7.2.4.

10.4 ELISA

Les concentrations en différentes protéines des milieux conditionnés ont été mesurées avec les kits ELISA répertoriés dans le tableau 4 ci-dessous. Ces kits proviennent tous de chez R&D Systems.

Protéine mesurée	Nom du kit	Limite de détection
MCP3	CCL7/MCP3 Quantikine® Colorimetrie Sandwich ELISA	1pg/mL
MIP3β	CCL19/MIP3ß DuoSet® Colorimetric Sandwich ELISA	4pg/mL
MMP9	MMP9 Quantikine® Human (total) ELISA	156pg/mL

<u>Tableau 4.</u> Kits ELISA utilisés pour mesurer les différentes protéines des milieux conditionnés

10 Analyses statistiques

Les variables quantitatives ont été exprimées en moyenne ± déviation standard (SD). Avant toute analyse statistique, la normalité (distribution Gaussienne) de la distribution de ces variables a été testée avec le test de Shapiro-Wilk.
Pour comparer deux groupes, nous avons utilisé un t-test bilatéral pour les données Gaussiennes ou un test de Mann-Whitney pour les données non Gaussiennes. Les comparaisons entre 2 groupes appariés ont été effectuées avec un test-*t* apparié pour les données Gaussiennes, ou avec un test de Wilcoxon rank sum pour les données non-Gaussiennes. Pour comparer plusieurs groupes, un test ANOVA a été effectué pour les données Gaussiennes ou un test de Kruskal-Wallis pour les données non-Gaussiennes. En cas de significativité des tests ANOVA, des tests post-hoc ont été effectués (Dunn's ou Holm-Sidak) pour isoler les groupes qui diffèrent des autres.
Pour mesurer la corrélation entre deux paramètres, nous avons effectué un test de Pearson. Pour tous les tests, la valeur de P était considérée statistiquement significative lorsqu'elle était inférieure à 0.05.
Des analyses multivariées ont été effectuées par palier, en utilisant une régression linéaire ascendante. A chaque étape, les limites de significativité pour entrer ou retirer une variable étaient respectivement 0.05 et 0.1.
Ces tests ont été effectués à l'aide du logiciel SigmaPlot v11.0.

Pour l'étude des effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire tardif chez le rat, la contractilité segmentaire a été analysée par tests ANOVA bilatéraux répétés dans le temps, en choisissant le traitement et la localisation segmentaire comme facteurs fixes et en choisissant le rat comme facteur variable (tous les segments d'un rat reçoivent le même traitement).
Les conditions de validité de ces tests ont été minutieusement vérifiées (distribution normale des données, homoscédasticité de la variance, absence de colinéarité ou d'interactions). Ces analyses ont été conduites pour tester les effets de l'adénosine seule (comparaison du groupe contrôle avec le groupe CADO) puis pour évaluer les effets de l'adénosine associée avec la 8-SPT (comparaison du groupe contrôle avec le groupe

CADO + 8-SPT). Pour préserver le taux d'erreur α de 5%, les comparaisons ont été effectuées avec un taux de 2,5%.

Les résultats de ces analyses ont été exprimés en moyenne ± erreur standard à la moyenne (SEM).

Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel SAS R9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Une valeur de $P<0.05$ était là encore considérée statistiquement significative.

RESULTATS

Etude n°1: Mise en place du modèle d'infarctus du myocarde chez le rat. Mise au point des techniques et analyse du remodelage ventriculaire gauche.

Le territoire vascularisé par l'artère interventriculaire antérieure (IVA) présente une importante variabilité anatomique chez le rat, c'est pourquoi la ligature de cette artère coronaire induit des IDM de taille très variable malgré la bonne reproductibilité de la technique. Par conséquent, ce modèle s'accompagne d'un remodelage ventriculaire dont la sévérité est très variable[100, 164, 165].
La SPECT est souvent utilisée pour évaluer la perfusion myocardique après IDM chez le petit animal, mais avec une tendance à surestimer la zone d'IDM[105]. Chez l'homme, la TEP au 18F-FDG est une technique plus précise, en particulier parce qu'elle permet de distinguer le myocarde sain du myocarde nécrosé après IDM chez l'homme. Cependant, cette technique n'avait encore jamais été utilisée dans cette indication chez l'animal. Notre équipe a montré récemment qu'une prémédication des rats à l'acipimox, un dérivé de l'acide nicotinique qui provoque une chute des taux sériques d'acide gras libres et permet d'augmenter le rapport signal/bruit de la captation myocardique en FDG[115]. Ce conditionnement métabolique a permis d'obtenir des valeurs très précises des volumes ventriculaires gauches et de la FE. Cette précision de mesure est ainsi proche de celle obtenue chez l'homme.

Le but de cette étude a été de caractériser les séquelles d'IDM et de prédire le remodelage ventriculaire gauche précoce après occlusion coronaire chez le rat à l'aide de la TEP au FDG combinée à une prémédication à l'acipimox chez le rat après IDM.

Cette étude a montré que :

-Les segments considérés nécrotiques, avec une captation en FDG <50% en TEP, ont effectivement : 1) une captation très diminuée sur les coupes histologiques enregistrées au µImager™ : -85±10% par rapport aux segments normaux (ce pourcentage était de -75±14% en imagerie par TEP) et 2) un important amincissement pariétal (-74±9%), comparés aux segments sains. De plus, les analyses histologiques ont permis de confirmer le caractère nécrotique de ces segments. L'α-sarco-actinine, marqueur du remodelage dont l'expression reflète l'intégrité du cytosquelette, est presque absente des segments nécrosés, mais est au contraire bien présente dans les segments sains des cœurs infarcis ainsi que dans les segments des cœurs *sham*. De plus, la coloration au trichrome de Masson indique que les segments nécrosés présentent un fort dépôt de collagène, contrairement aux segments sains.

-La fonction cardiaque des rats ligaturés était déjà dégradée 48 heures après IDM. Nous avons classé les 19 rats ligaturés selon leur taille d'IDM, défini par le nombre de segments nécrosés détectés en TEP selon le critère de captation <50%. Six rats avaient un IDM de grande taille (nombre de segments nécrosés > 6, correspondant à 35% et plus du ventricule gauche), 8 rats avaient un IDM de taille modérée (de 3 à 6 segments, soit 15 à 35% du VG) et enfin 5 rats avaient un IDM de petite taille (<3 segments, soit moins de 15% du VG). Aucun segment ne présente une captation en FDG <50% chez les 7 rats *sham*. Dès l'examen réalisé à 48 heures, les rats souffrant d'IDM de grande taille et de taille modérée avaient des VTD et VTS supérieurs à ceux des rats *sham*-opérés, ainsi qu'une FE plus basse. Par contre, les rats ayant un IDM de petite taille ne présentent pas de différence avec les rats *sham*-opérés.

-Deux semaines après IDM, tous les animaux avaient pris du poids. Les rats ligaturés présentaient une augmentation des VTD et VTS et une diminution de leur fréquence cardiaque (FC). Par contre, ni leur FE ni leur pression artérielle systolique (PAS) n'étaient modifiées. Ces variations de VTD, VTS et FC étaient significativement corrélées à la taille initiale d'IDM.

-La variation du VTD entre 48 heures et 2 semaines a été utilisée comme index du remodelage ventriculaire gauche. La classification des rats en 3 groupes selon la taille d'IDM et la FC à 48 heures étaient les 2 facteurs prédictifs indépendants de cette variation ($P<0.001$ en analyse multivariée) ; et 77% de cette variation de VTD à 2 semaines pouvait être prédite par ces 2 facteurs (44% par la taille de l'IDM et 34% par la FC à 48 heures). Par conséquent, les animaux souffrant d'un IDM de grande taille et en particulier ceux ayant aussi une FC élevée à 48 heures, avaient le plus grand risque de développer une dilatation ventriculaire gauche.

Cette étude montre que la TEP au FDG, couplée à une prémédication à l'acipimox, est un outil très efficace pour caractériser et prédire le remodelage ventriculaire gauche précoce chez le rat après IDM. Elle constitue donc un outil intéressant pour de futures études précliniques utilisant le modèle d'IDM chez le rat.

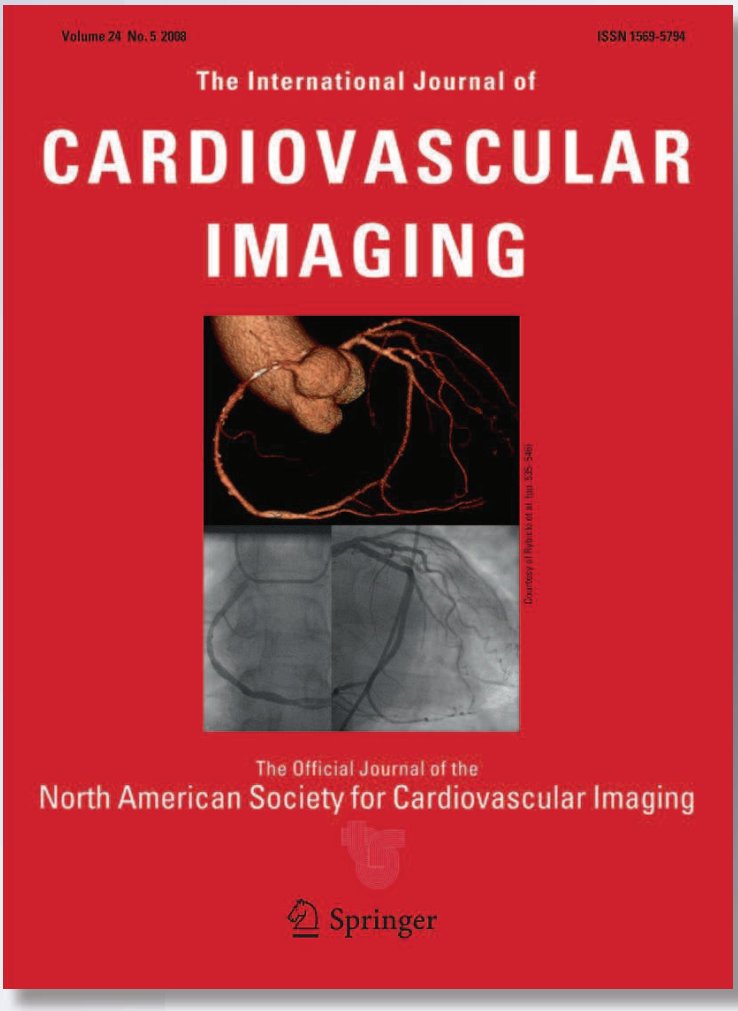
Acipimox-enhanced ^{18}F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for characterizing and predicting early remodeling in the rat infarct model

Mélanie Bousquenaud, Fatiha Maskali, Sylvain Poussier, Pierre-Yves Marie, Henri Boutley, Gilles Karcher, Daniel R. Wagner & Yvan Devaux

The International Journal of Cardiovascular Imaging
X-Ray Imaging, Echocardiography, Nuclear Cardiology Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging

ISSN 1569-5794

Int J Cardiovasc Imaging
DOI 10.1007/s10554-011-9983-2



Springer

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science+Business Media, B.V.. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Springer

Author's personal copy

Int J Cardiovasc Imaging
DOI 10.1007/s10554-011-9983-2

ORIGINAL PAPER

Acipimox-enhanced ^{18}F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for characterizing and predicting early remodeling in the rat infarct model

Mélanie Bousquenaud · Fatiha Maskali · Sylvain Poussier · Pierre-Yves Marie · Henri Boutley · Gilles Karcher · Daniel R. Wagner · Yvan Devaux

Received: 1 June 2011 / Accepted: 16 November 2011
© Springer Science+Business Media, B.V. 2011

Abstract The rat myocardial infarction (MI) model is widely used to study left ventricular (LV) remodeling. In this study, acipimox-enhanced ^{18}F-Fluorodeoxyglucose (FDG) gated-positron emission tomography (PET) was assessed for characterizing and predicting early remodeling in the rat infarct model. Nineteen Wistar rats had surgical occlusion of the left anterior descending coronary artery and 7 were sham-operated. PET was scheduled 48 h and 2 weeks later for quantifying MI area and LV function. Segments with <50% of FDG uptake had histological evidence of MI (74 ± 9% decrease in parietal thickness, fibrosis development). At 48 h, MI area was large (>35% of LV) in 6 rats, moderate (15–35% of LV) in 8 rats, limited (<15% of LV) in 5 rats and absent in the 7 sham rats. LV remodeling, assessed through the 2 weeks increase in end-diastolic volume, increased between rats with limited, moderate and large MI (+72 ± 25, +109 ± 56, +190 ± 69 μl, respectively, $P = 0.007$). This 3-groups classification allowed predicting 44% of the 2 weeks increase in end-diastolic volume, and additional 34% were predicted by heart rate at 48 h. The acipimox-enhanced FDG gated-PET technique provides efficient characterization and prediction of early remodeling in the rat infarct model.

Keywords FDF-PET · Cardiac remodeling · Myocardial infarction · Rat · Acipimox

Abbreviations

EDV	End-diastolic volume
EF	Ejection fraction
ESV	End-systolic volume
FDG	^{18}F-fluorodeoxyglucose
HR	Heart rate
LAD	Left anterior descending coronary artery
LV	Left ventricular
MI	Myocardial infarction
PET	Positron emission tomography
QGS	Quantitative gated SPECT
QPS	Quantitative perfusion score software

M. Bousquenaud · D. R. Wagner · Y. Devaux (✉)
Laboratory of Cardiovascular Research Centre de Recherche Public-Santé, Luxembourg, Luxembourg
e-mail: yvan.devaux@crp-sante.lu

F. Maskali · S. Poussier · P.-Y. Marie · H. Boutley · G. Karcher
Nancyclotep Experimental Imaging Platform, Nancy, France

P.-Y. Marie
INSERM U961, 54000 Nancy, France

D. R. Wagner
Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg, Luxembourg

Introduction

Left ventricular (LV) remodeling, with progressive dilatation and dysfunction, is the main cause of the

Published online: 25 November 2011

Author's personal copy

evolution toward heart failure after myocardial infarction (MI) in man [1]. Treatments elaborated to lower infarct size and remodeling are currently tested in rats with surgical ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD) [2–6]. This rat infarct model provides a variable extent of myocardial infarct and consequently, a variable amount of subsequent LV remodeling [2–8].

SPECT imaging of myocardial perfusion tracers has been used for quantifying rat infarct areas [5, 6, 8] but with a trend toward overestimation, areas with decreased perfusion exceeding the necrotic area revealed by histological analysis [8, 9]. In man, Positron Emission Tomography (PET) with ^{18}F-fluorodeoxyglucose (FDG) provides a precise identification of irreversibly damaged myocardium and is therefore, a reference cardiac imaging technique in this setting [9–12]. Dedicated PET systems have been developed for small animals [13, 14], and when using a pre-medication by acipimox, a nicotinic acid derivative, the cardiac FDG-PET images from rats were recently shown to provide very high signal/noise ratio and accurate determinations of LV volume and function [14].

In the rat infarct model, however, it is not known whether this acipimox-enhanced FDG-PET technique provides accurate assessment of MI severity and prediction of subsequent remodeling. In the present study, the ability of this PET technique to characterize and predict early remodeling after a surgical LAD occlusion in adult rats was assessed.

Methods

Animals and protocol

This study was conducted in accordance with the regulations of the Animal Welfare Act of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and protocols were approved by local Ethics Committee and by the Regional Veterinary Department. Twenty-six adult male Wistar rats (Charles Rivers Laboratories; 8 to 11 weeks old; 310- to 380-g body weight) were enrolled: 19 were subjected to surgical occlusion of the LAD and 7 were sham-operated. All rats were monitored in vivo by a dedicated small animal PET system [13, 14] 48 h and 2 weeks after surgery. At the end of the observation period, rats were sacrificed and histological analyses were planned to further characterize the segments showing a lower than 50% FDG uptake on PET images, a conventional and reliable criterion of non-viable myocardium in man [15–18].

Surgical procedure

As previously described [5, 6, 8, 9] rats were anesthetized by inhalation of an isoflurane/oxygen mixture. They were intubated and artificially ventilated with a rodent ventilator (Harvard Apparatus, Holliston, USA). The heart was exposed through a left lateral thoracotomy of the fifth interrib space. After pericardial incision, the proximal part of the LAD was ligated with a 7-0 Prolene suture (Ethicon, Somerville, NJ, USA) at 2–3 mm from the top of the left atrium.

Perioperative lidocaïne (10 mg/kg, Aguettant, France) was used to provide a local anaesthesia and to reduce the incidence of ventricular tachycardia and fibrillation. Finally, the chest was closed in layers with a 2-0 Vicryl suture (Ethicon, Somerville, NJ, USA). The lungs were reinflated using positive-end expiratory pressure, and the endotracheal tube was removed once spontaneous breathing had resumed. Amoxicilline was injected intramuscularly (60 mg/kg, Glaxo SmithKline, France) to avoid bacterial infections. Same protocol was applied for sham-operated rats except coronary ligation.

Acipimox-enhanced FDG-PET

Rats received an oral pre-medication of 50 mg/kg of acipimox, half of this dose being injected 1 h before FDG injection and the other half, just before FDG injection [14]. Acipimox is a potent nicotinic acid derivative, currently used for the metabolic conditioning of patients referred to cardiac FDG-PET [19, 20]. It leads to dramatic decreases in endogenous lipolysis and hence, of free fatty acid serum levels. With such pre-medication, the myocardial uptakes of glucose and FDG are much less inhibited by circulating free fatty acids, yielding high quality cardiac FDG-PET images [14, 19, 20].

An activity of 74 MBq of FDG was injected intravenously (IBA, Nancy, France) under a transient anaesthesia with isoflurane. PET was recorded 1 h later under continuous anaesthesia by isoflurane and using a dedicated small animal PET system (Inveon,

Author's personal copy

Siemens, Knoxville, TN, USA) [13]. As already described [14], animals were placed on a heating pad, they were connected to a standard ECG monitor by three electrodes placed on the inner surfaces of limb extremities (SA Instruments Inc, Stony Brook, USA). Recording times were 10 min for ^{18}F emission and 6 min for ^{57}Co transmission. Images were reconstructed with a 3-D ordered subset expectation maximization algorithm with 4 iterations, 16 subsets, 128 × 128 matrix, 2.0 zoom and 0.8 mm thickness, leading to a voxel size of 0.8 × 0.4 × 0.4 mm. Sixteen intervals were used for the ECG-triggered images, providing a temporal resolution of 11–15 ms for heart rates (HR) ranging from 250 to 375 min^{-1} [14].

The average heart rate value during the PET acquisition was extracted from the list mode recording data. Systolic blood pressure was additionally recorded 3–4 times by the tail-cuff method during the PET acquisition (AD Instruments, Powerlab, France), mean value being kept for further analyses.

Reorientation along the LV long axis was achieved with a dedicated software provided by an Esoft station (Siemens, Knoxville, Tennessee, USA). LV end-diastolic volume (EDV), LV and end-systolic volume (ESV) and LV ejection fraction (EF) were obtained from the set of contiguous ECG-triggered short-axis slices with the Quantitative Gated SPECT (QGS) software [21, 22]. FDG uptake was expressed in % of the maximal myocardial voxel value and a mean uptake value was determined in each segment from the 17-segment LV division from the American Heart Association [23] with the Quantitative Perfusion Score software (QPS) [21].

Ex vivo analysis

Immediately after the 2 weeks PET recording, LAD-occluded rats were sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital, and their hearts were excised, frozen and embedded in optimal cutting media (VWR, France). Contiguous sections (8 µm thick), orientated along the LV vertical long axis, were obtained in a cryostat at −22°C. One midventricular section was selected and immediately referred to a 4 h recording with a µIMAGER™ apparatus (Biospace Lab, Paris, France; http://www.biospacelab.com) in order to quantify the distribution of FDG activity on the overall histological section. The µIMAGER is a quantitative high-speed autoradiography system dedicated to beta-emitting isotopes (such as ^{18}F) and providing high resolution images (20 μ of voxel size in the present study) [5, 6, 8, 9]. This section was thereafter stained by collagen-specific Masson Trichrome (Dako, Leuven, Belgium) and contiguous sections were kept for immunohistochemical analyses.

A quantitative analysis was planned to characterize the segments with less than 50% of FDG uptake on the 2 weeks PET slice, a criterion corresponding to a severe MI in man (non viable myocardium) [15–18]. For this purpose, the limits of the 7 segments from the vertical long-axis view, as defined by the 17-segment LV division [23], were applied to the histological sections. Two ex vivo parameters were quantified in each of these 7 segments: FDG activity determined by the µIMAGER™ and with hand-drawn region of interests and a mean wall thickness obtained from 3 measurements and considered here as an index of viable tissue (number of cells across the wall) [7, 15, 24]. Finally, the values of these two parameters, which had been obtained in each histological segments corresponding to a <50% FDG uptake on the 2 weeks PET images, were expressed in percentages of the averaged values from remote segments of the same histological slice (those not directly adjacent).

Segments with <50% FDG uptake, as well as remote segments, were further characterized by an optical microscopic analysis of various markers involved in the remodeling process: collagen deposition with Masson trichrome, and alpha sarco-actinin, a cytoskeleton element (Mouse monoclonal IgG1, EA-53, Abcam, Cambridge, UK).

For immunohistochemical studies, endogenous peroxidases were initially saturated with 3% hydrogen peroxide (Sigma–Aldrich, Bornem, Belgium). Sections were then preincubated in 3% bovine serum albumin (Sigma–Aldrich) and incubated overnight at 4°C with 1:100 dilution of primary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies were then applied for 1 h at room temperature. After washing, sections were visualized by 0.05% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride dehydrate and counterstained with hematoxylin (Sigma–Aldrich).

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as mean ± SD. Normality assessment with the Shapiro–Wilk test preceded all statistical analyses. Comparisons between

Author's personal copy

paired data were performed with the nonparametric Wilcoxon rank sum test for non-Gaussian data and with paired *t* test for Gaussian data. One-way ANOVA for Gaussian data and Kruskal–Wallis one-way ANOVA on Ranks for non-Gaussian data were used for multi group comparisons. A Pearson Product Moment was used to assess the correlation between 2 parameters. A *P* value <0.05 was considered significant. Multivariate analyses were performed stepwise using ascending linear regression analyses. At each step, the limits for significance to enter and remove a variable were 0.05 and 0.10, respectively.

Results

Ex vivo characterization of segments with <50% of FDG uptake on PET

Among the 70 segments, which were analyzed on the histological sections of LAD-occluded rats, 20 had presumably a severe MI because of a <50% of FDG uptake on the 2 weeks PET performed just before sacrifice [15–18]. The decrease in FDG activity, which was calculated in each of these 20 segments with regard to remote segments, was equivalent when determined on μIMAGER™ sections (−85 ± 10%) and on the corresponding PET slices (−75 ± 14%). Moreover, examination of histological sections revealed a dramatic loss in parietal thickness of all these PET-defined MI segments (on average, −74 ± 9% when compared to the 50 remote segments with >50% FDG uptake). In the hearts from sham-operated animals, FDG activity assessed by PET and μIMAGER™ was homogenous and strong (Fig. 1).

As illustrated in Fig. 1, the immunohistochemical marker of remodeling alpha-sarco actinin, which loss of expression indicates cytoskeleton degradation, was poorly present in all segments with <50% of FDG uptake. In contrast, alpha-sarco actinin expression was strong in remote segments from LAD-occluded rats and in sham-operated rats. Masson trichrome

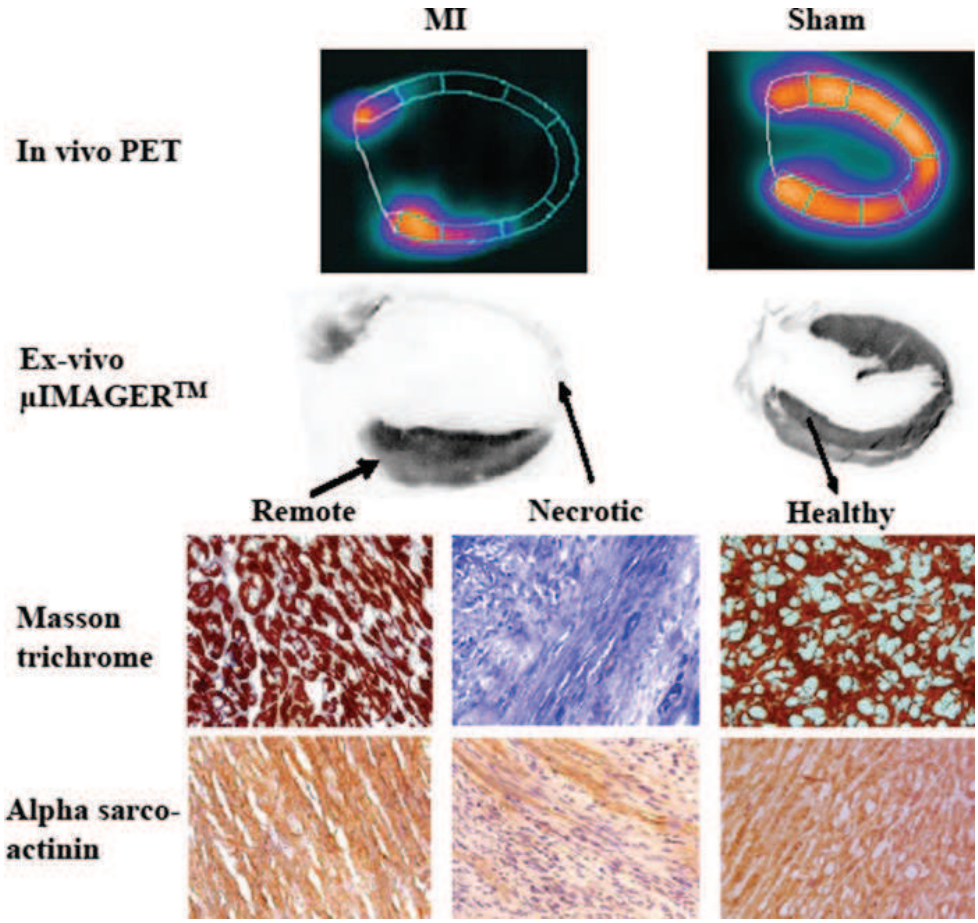


Fig. 1 Illustration of the ex vivo characterization of the segments considered to be severely necrotic at FDG-PET (<50% uptake). (1) Vertical long-axis slices (*upper half*) recorded in the same rat in vivo by FDG-PET and ex vivo by μIMAGER™. (2) Immunohistochemical data (*lower half*) showing fibrosis development (*blue color* at Masson trichrome) and the decrease in cytoskeleton elements (alpha-sarco actinin staining in *brown color*) within the MI segments. Pictures from a rat with large MI and a sham-operated rat are shown. Magnification ×40

Author's personal copy

staining attested for important collagen deposition in infarcted areas. This staining was absent in remote segments of LAD-occluded rats and in sham-operated animals.

Early assessment, 48 h after surgery (Table 1)

According to the number of severe MI segments, which were defined as those with <50% uptake at FDG-PET, the 19 LAD-occluded rats were classified into 3 groups: (1) 6 with large MI (>6 segments, corresponding to >35% of LV), (2) 8 with moderate MI (from 3 to 6 segments, corresponding to 15–35% of LV), and (3) 5 with limited MI (≤2 segments, corresponding to <15% of LV). No LV area with <50% FDG uptake was documented in the 7 sham rats. Representative examples are given in Fig. 2.

When compared with the sham-group, the groups of large and moderate MI exhibited higher values for EDV and ESV, as well as lower values for EF (Table 1). By contrast, such differences were not documented for the limited MI group.

Subsequent evolution at 2 weeks

At 2 weeks, LAD-occluded rats gained weight, to the same extent as sham-operated rats (difference between 2 weeks and 48 h: +15 ± 23 and +18 ± 12 g for LAD-occluded and sham rats, respectively). LAD-occluded rats exhibited significant increases of EDV (+125 ± 70 µl, $P < 0.001$) and ESV (+66 ± 77 µl, $P = 0.002$), and a decrease in HR (−46 ± 29 bpm, $P < 0.001$). By contrast, no change was documented for EF and systolic blood pressure.

As detailed in Table 1, the 2 weeks changes in EDV, ESV and HR were clearly affected by the initial extent of MI. In particular, EDV exhibited a step by step increase between rats with limited, moderate and large MI (+72 ± 25, +109 ± 56, +190 ± 69 µl, respectively, $P = 0.007$).

Table 1 Comparisons of main recorded variables between rats with large, moderate and limited MI and sham-operated rats

	Large MI (n = 6)	Moderate MI (n = 8)	Limited MI (n = 5)	Sham-operated (n = 7)
At 48 h				
Body weight (g)	339 ± 32	365 ± 65	347 ± 16	327 ± 6
End-diastolic volume (µl)	485 ± 68*†	454 ± 71*	402 ± 45	370 ± 32
End-systolic volume (µl)	315 ± 60*†	257 ± 78*	194 ± 73	139 ± 32
Ejection fraction (%)	35 ± 4*†	45 ± 8*	52 ± 13	63 ± 7
Heart rate (min^{-1})	425 ± 22	416 ± 28	425 ± 7	404 ± 14
Systolic blood pressure (mmHg)	110 ± 9	113 ± 10	117 ± 14	103 ± 4
At 2 weeks				
Body weight (g)	361 ± 32	371 ± 40	368 ± 18	345 ± 16
End-diastolic volume (µl)	675 ± 81*†‡	563 ± 46*†	474 ± 42	392 ± 27
End-systolic volume (µl))	435 ± 61*†‡	318 ± 44*†	202 ± 72	141 ± 28
Ejection fraction (%)	35 ± 6*†	44 ± 6*†	58 ± 12	64 ± 5
Heart rate (min^{-1})	362 ± 22	376 ± 21	390 ± 33	383 ± 24
Systolic blood pressure (mmHg)	110 ± 10	107 ± 15	108 ± 17	108 ± 1
Differences between 2 weeks and 48 h				
Body weight (g)	21 ± 16	6 ± 30	21 ± 8	18 ± 12
End-diastolic volume (µl)	190 ± 69*†‡	109 ± 56*	72 ± 25	23 ± 16
End-systolic volume (µl)	120 ± 55*†	61 ± 88	8 ± 21	2 ± 24
Ejection fraction (%)	0 ± 7	−2 ± 12	6 ± 3	2 ± 6
Heart rate (min^{-1})	−63 ± 17*	−40 ± 30	−35 ± 32	−20 ± 17
Systolic blood pressure (mmHg)	0 ± 6	−5 ± 11	−6 ± 22	4 ± 4

* $P < 0.05$ for comparisons *versus* sham rats; † $P < 0.05$ for comparisons *versus* rats with limited MI; ‡ $P < 0.05$ for comparisons *versus* rats with moderate MI

Author's personal copy

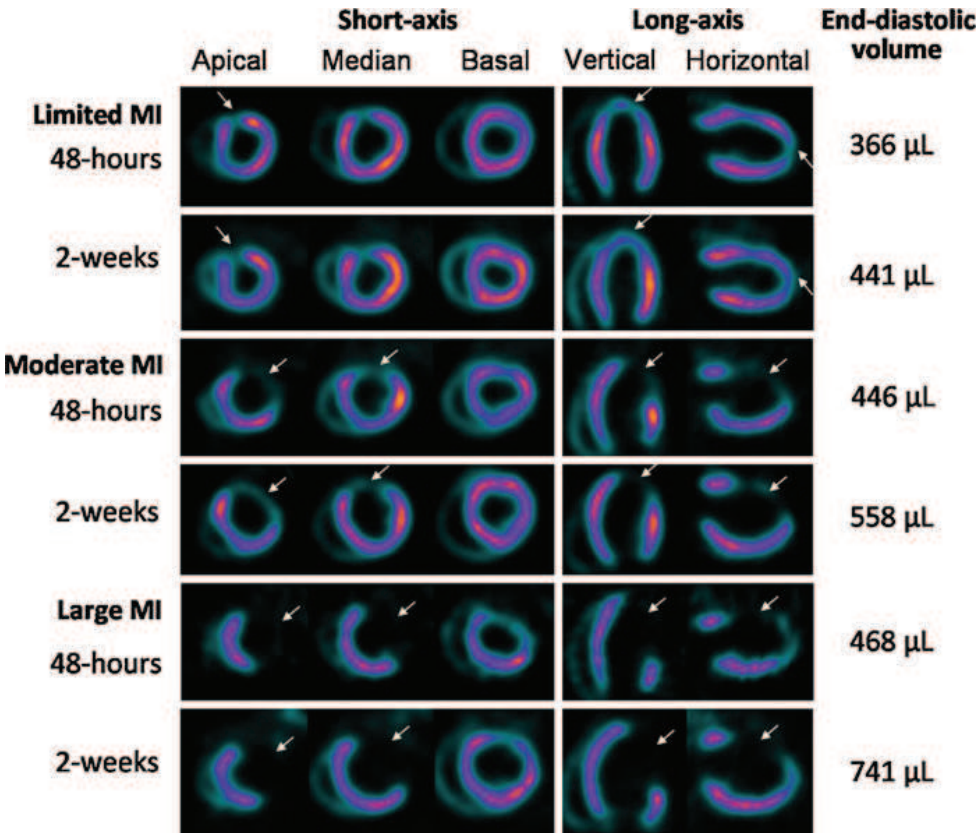


Fig. 2 Examples illustrating the difference in subsequent LV enlargement according to the initial extent of MI. End-diastolic PET images and corresponding volumes are given at 48 h and 2 weeks in 3 rats with large, moderate and limited areas of sever MI (*arrows*)

Predictors of early remodeling

The difference in EDV between 2 weeks and 48 h was used as an index of LV remodeling in the 19 rats with MI, and among the 48 h variables listed in Table 1, significant univariate predictors of this difference were: extent of MI area (in % of LV, $P = 0.007$); classification into limited, moderate and large MI ($P = 0.005$); and HR ($P = 0.003$). By multivariate analysis, only 2 parameters were selected as independent predictors: classification into limited, moderate and large MI ($P < 0.001$) and HR ($P < 0.001$). As much as 77% of the 2 weeks changes in EDV could be predicted by this 2-variables model (44% for MI classification and 34% for HR). These results are illustrated in Fig. 3a,b, where the changes in EDV documented at 2 weeks were significantly correlated with initial MI size and HR. In addition, LV remodeling was associated with the classification into limited, moderate and large MI (Fig. 3c). This classification was considered alone or in association with the information provided by HR at 48 h (above or under the median value of HR, 418 bpm.min^{-1}). Rats with large infarcts and elevated HR at 48 h had the highest risk of LV dilatation (Fig. 3d).

Discussion

Early LV remodeling could be precisely monitored and predicted in this rat infarct model, by an original acipimox-enhanced FDG-PET technique. We recently reported that this technique provides a high signal/noise ratio, with a mean myocardial-to-blood ratio as high as 10 [14], a level that is even higher than that currently documented by FDG-PET in man [19, 20]. On a high resolution ECG-triggered PET system, this acipimox-enhanced technique was also shown to provide accurate determinations of LV volume in adult rats [14].

The present study demonstrates that this technique provides an efficient identification of the areas of severe MI, in accordance with the general idea that FDG is a reference tracer in this setting [10, 11, 15–18]. Histological analyses were applied for this demonstration, giving evidence of a very low viability (dramatic parietal thinning, fibrosis development, loss in cytoskeletal elements) for all LV segments showing <50% uptake on FDG-PET, a conventional criterion of "non viable" myocardium in man [15–18]. These results are different than those previously obtained with Sestamibi pinhole-SPECT in the rat MI model where a marked MI overestimation was documented

Author's personal copy

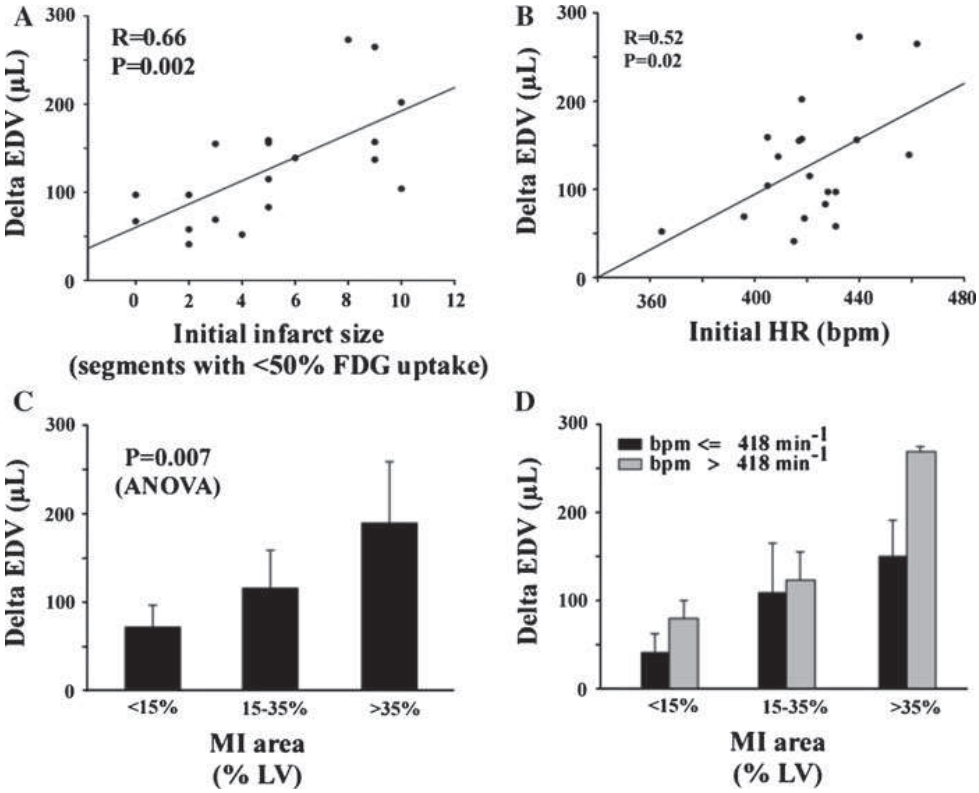


Fig. 3 Association between LV remodeling, initial infarct size and heart rate. The difference in EDV between 2 weeks and 48 h (delta EDV in µl) was correlated with initial infarct size (**a**) and initial HR (**b**). Delta EDV was associated with the classification at 48 h in limited (<15% of LV), moderate (15–35% of LV) and large (>35% of LV) MI (**c**). Rats with large infarct size and elevated HR at 48 h had the highest risk of LV dilatation (>to the median value of 418 bpm.min^{-1}; $P = 0.018$ for interaction, **d**)

[8]. In man, FDG was also shown to be superior to Sestamibi for identifying myocardial viability, especially in severely hypoperfused areas, a situation where a mismatch between a low uptake of Sestamibi and a high uptake of FDG is frequently observed [9–12, 25]. However, it has to be acknowledged that the "lump constant" [26] was not used in our analyses and that FDG could have to some extent affected the determination of viable tissues.

The initial extent of the segments' area with severe MI was determined here by FDG-PET, 2 days after LAD occlusion, and this extent was strongly predictive of the subsequent LV enlargement at 2 weeks. Some structural alterations were also documented as a part of this remodeling process in the MI area (myocardial thinning, increase in collagen deposition, decrease in cytoskeleton elements), as well as outside these areas (marker of apoptosis). In the rat infarct model, LV remodeling is known to continue after 15 days, especially in case of severe MI [8]. However, the main part of LV dilation occurs during this early phase [8], which is therefore critical with regard to the risk of subsequent heart failure.

Due to the variability in coronary anatomy and collateral circulation, occlusion of coronary artery is known to produce different infarct sizes in rats (and in man), with variable proportions of limited, moderate and large MI. In the present study, the 3-group classification in limited, moderate and large MI, which was defined according to FDG-PET results at 48 h, was a major independent predictor of the LV end-diastolic enlargement at 2 weeks. As much as 44% of this enlargement could be predicted by this variable; and an additional 34% was predicted by HR at 48 h. HR was increased at 48 h, when compared with 2 weeks, similarly to what was already documented in the rat MI model. This may be explained by an early sympathetic activation after myocardial injury [27]. It is known that this early sympathetic activation enhances LV remodeling and dilatation, and can be limited by beta-blockers [24, 28].

This study has some limitations. First, three ex vivo techniques were used to validate that the segments identified by PET as having <50% FDG uptake were necrotic: µIMAGER^{TM}, Masson trichrome and immunohistochemistry. These techniques are performed on single cardiac slices and therefore prevent determining infarct size. Second, heart rate was not recorded at baseline, dampening the significance of the observation that rats with elevated heart rate (at 48 h post

Author's personal copy

ligation) have higher risk of LV dilatation. Also, this study would have benefited from evaluation of LV function before coronary ligation to provide additional information about the acute adaptation of LV function after coronary ligation.

In conclusion, the acipimox-enhanced FDG gated-PET technique was shown to provide a highly efficient characterization and prediction of early cardiac remodeling in the rat infarct model. Therefore, this technique could constitute a useful tool for future therapeutic studies using this experimental model.

Acknowledgments This study was supported by grants from the National Funds of Research, the Society for Research on Cardiovascular Diseases, the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg, and the "Fondation de France". M.B. is recipient of a fellowship from the National Funds of Research of Luxembourg (grant # PhD-AFR 08-024).

Conflict of interest None.

References

1. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N (2000) Cardiac remodeling–concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an international forum on cardiac remodeling. J Am Coll Cardiol 35(3):569–582
2. Ceconi C, Comini L, Suffredini S, Stillitano F, Bouly M, Cerbai E, Mugelli A, Ferrari R (2010) Heart rate reduction with ivabradine prevents the global phenotype of left ventricular remodeling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 300(1): H366–H373
3. Maczewski M, Mackiewicz U (2008) Effect of metoprolol and ivabradine on left ventricular remodelling and Ca2 + handling in the post-infarction rat heart. Cardiovasc Res 79(1):42–51
4. Sun YL, Hu SJ, Wang LH, Hu Y, Zhou JY (2005) Effect of beta-blockers on cardiac function and calcium handling protein in postinfarction heart failure rats. Chest 128(3): 1812–1821
5. Tran N, Franken PR, Maskali F, Nloga J, Maureira P, Poussier S, Groubatch F, Vanhove C, Villemot JP, Marie PY (2007) Intramyocardial implantation of bone marrow-derived stem cells enhances perfusion in chronic myocardial infarction: dependency on initial perfusion depth and follow-up assessed by gated pinhole SPECT. J Nucl Med 48(3):405–412
6. Tran N, Poussier S, Franken PR, Maskali F, Groubatch F, Vanhove C, Antunes L, Karcher G, Villemot JP, Marie PY (2006) Feasibility of in vivo dual-energy myocardial SPECT for monitoring the distribution of transplanted cells in relation to the infarction site. Eur J Nucl Med Mol Imag 33(6):709–715
7. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Bulkley BH (1985) Global cardiac remodeling after acute myocardial infarction: a study in the rat model. J Am Coll Cardiol 5(6):1355–1362
8. Maskali F, Franken PR, Poussier S, Tran N, Vanhove C, Boutley H, Le Gall H, Karcher G, Zannad F, Lacolley P, Marie PY (2006) Initial infarct size predicts subsequent cardiac remodeling in the rat infarct model: an in vivo serial pinhole gated SPECT study. J Nucl Med 47(2):337–344
9. Maskali F, Poussier S, Marie PY, Tran N, Antunes L, Olivier P, Plenat F, Maitrejean S, Zannad F, Karcher G (2005) High-resolution simultaneous imaging of SPECT, PET, and MRI tracers on histologic sections of myocardial infarction. J Nucl Cardiol 12(2):229–230
10. Segall G (2002) Assessment of myocardial viability by positron emission tomography. Nucl Med Commun 23(4): 323–330
11. Slart RH, Bax JJ, van Veldhuisen DJ, van der Wall EE, Dierckx RA, Jager PL (2006) Imaging techniques in nuclear cardiology for the assessment of myocardial viability. Int J Cardiovasc Imag 22(1):63–80
12. Gewirtz H (2011) Cardiac PET: a versatile, quantitative measurement tool for heart failure management. JACC Cardiovasc Imag 4(3):292–302
13. Visser EP, Disselhorst JA, Brom M, Laverman P, Gotthardt M, Oyen WJ, Boerman OC (2009) Spatial resolution and sensitivity of the Inveon small-animal PET scanner. J Nucl Med 50(1):139–147
14. Poussier S, Maskali F, Tran N, Person C, Maureira P, Boutley H, Karcher G, Lacolley P, Regnault V, Fay R, Marie PY (2010) ECG-triggered 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of the rat heart is dramatically enhanced by acipimox. Eur J Nucl Med Mol Imag 37(9):1745–1750
15. Schmidt M, Voth E, Schneider CA, Theissen P, Wagner R, Baer FM, Schicha H (2004) F-18-FDG uptake is a reliable predictory of functional recovery of akinetic but viable infarct regions as defined by magnetic resonance imaging before and after revascularization. Magn Reson Imag 22(2):229–236
16. Baer FM, Voth E, Schneider CA, Theissen P, Schicha H, Sechtem U (1995) Comparison of low-dose dobutamine-gradient-echo magnetic resonance imaging and positron emission tomography with [18F]fluorodeoxyglucose in patients with chronic coronary artery disease. A functional and morphological approach to the detection of residual myocardial viability. Circulation 91(4):1006–1015
17. Brunken R, Tillisch J, Schwaiger M, Child JS, Marshall R, Mandelkern M, Phelps ME, Schelbert HR (1986) Regional perfusion, glucose metabolism, and wall motion in patients with chronic electrocardiographic Q wave infarctions: evidence for persistence of viable tissue in some infarct regions by positron emission tomography. Circulation 73(5):951–963
18. Gould KL, Yoshida K, Hess MJ, Haynie M, Mullani N, Smalling RW (1991) Myocardial metabolism of fluorodeoxyglucose compared to cell membrane integrity for the potassium analogue rubidium-82 for assessing infarct size in man by PET. J Nucl Med 32(1):1–9
19. Knuuti MJ, Yki-Jarvinen H, Voipio-Pulkki LM, Maki M, Ruotsalainen U, Harkonen R, Teras M, Haaparanta M, Bergman J, Hartiala J et al (1994) Enhancement of myocardial [fluorine-18]fluorodeoxyglucose uptake by a nicotinic acid derivative. J Nucl Med 35(6):989–998

Author's personal copy

20. Bax JJ, Visser FC, Poldermans D, Van Lingen A, Elhendy A, Boersma E, Sloof GW, Visser CA (2002) Safety and feasibility of cardiac FDG SPECT following oral administration of Acipimox, a nicotinic acid derivative: comparison of image quality with hyperinsulinemic euglycemic clamping in nondiabetic patients. J Nucl Cardiol 9(6): 587–593
21. Germano G, Kiat H, Kavanagh PB, Moriel M, Mazzanti M, Su HT, Van Train KF, Berman DS (1995) Automatic quantification of ejection fraction from gated myocardial perfusion SPECT. J Nucl Med 36(11):2138–2147
22. Germano G, Kavanagh PB, Berman DS (1997) An automatic approach to the analysis, quantitation and review of perfusion and function from myocardial perfusion SPECT images. Int J Card Imag 13(4):337–346
23. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, Pennell DJ, Rumberger JA, Ryan T, Verani MS (2002) Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the cardiac imaging committee of the council on clinical cardiology of the American heart association. Int J Cardiovasc Imag 18(1): 539–542
24. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B (1988) Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. Circulation 78(1):186–201
25. Marshall RC, Tillisch JH, Phelps ME, Huang SC, Carson R, Henze E, Schelbert HR (1983) Identification and differentiation of resting myocardial ischemia and infarction in man with positron computed tomography, 18F-labeled fluorodeoxyglucose and N-13 ammonia. Circulation 67(4):766–778
26. Tokugawa J, Ravasi L, Nakayama T, Schmidt KC, Sokoloff L (2007) Operational lumped constant for FDG in normal adult male rats. J Nucl Med 48(1):94–99
27. Mill JG, Vassallo DV, Leite CM (1991) Time course of changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats. Braz J Med Biol Res 24(8):855–858
28. Parrish DC, Gritman K, Van Winkle DM, Woodward WR, Bader M, Habecker BA (2008) Postinfarct sympathetic hyperactivity differentially stimulates expression of tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter. Am J Physiol Heart Circ Physiol 294(1):H99–H106

Etude n°2: Cas particulier d'un rat ayant survécu à long-terme à un infarctus du myocarde très étendu.

Chez l'homme comme dans le modèle d'IDM chez le rat, il a été montré que 50% du VG était indispensable à la survie après IDM[99, 166].
Dans cette étude, nous reportons le cas d'un rat ayant survécu 2 mois après un IDM touchant les parois antérieure, latérale et inférieure du ventricule gauche, soit 72% de ce dernier.

Cette étude a montré que :

-Chez ce rat, 12 segments cardiaques sur 17 (soit 72% du VG) présentent une captation en FDG inférieure à 50%, critère standard utilisé pour identifier les segments nécrosés du myocarde non viable [123].

-Ces segments nécrosés sont entièrement akinétiques, laissant seulement intacts les 5 segments septaux.

-La FE à 48 heures est très dégradée (17%) et diminue encore à 2 mois (9%).

-Le VTD augmente fortement entre 48 heures et 2 mois.

-On note une dilatation du VD libre (non septal), ainsi qu'une baisse progressive de la contractilité de la paroi libre du VD et du septum non infarci.

-Les colorations histologiques au Rouge Sirius et à l'hématoxyline/éosine montrent un fort dépôt de collagène ainsi que le recrutement de cellules inflammatoires dans la zone infarcie.

Cette étude relate le cas exceptionnel d'un rat ayant survécu à un infarctus épargnant uniquement la paroi septale du VG. Dans ce cas, la préservation et l'adaptation de la fonction du VD pourrait avoir eu un impact très favorable sur l'évolution de cet animal et par conséquent sur sa survie (lorsque la dysfonction du VG est sévère, la présence d'une dysfonction du VD associée constitue un élément très péjoratif pour le pronostic).

Serial PET Imaging of a Massive Infarct in the Rat

Short title: Imaging of a Massive Infarct

Mélanie Bousquenaud, MSc; Daniel R. Wagner, MD, PhD; Fatiha Maskali, PhD; Pierre-Yves Marie, MD, PhD; Yvan Devaux, PhD

From the Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public-Santé, Luxembourg, Luxembourg (M.B., D.R.W., Y.D.); Nancyclotep experimental imaging platform, CHU-Nancy and Lorraine University, Nancy, France (F.M., P-Y.M.); INSERM, U961, Nancy, France (F.M., P-Y.M.); Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg, Luxembourg (D.R.W.).

Correspondence to: Yvan Devaux, PhD, Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public Santé, 120 route d'Arlon, L1150 Luxembourg, E-mail yvan.devaux@crp-sante.lu

Acute left ventricular (LV) dysfunction, as well as subsequent LV remodeling, are major causes of death after myocardial infarction. The minimal amount of intact LV myocardium, which is required for survival, is still debated. Initial autopsy studies have reported that death from shock was associated with myocardial infarctions greater than 40% of the left ventricle, but there is evidence that survival remains possible for infarction greater than 50% of the left ventricle in human,[1] as well as in the rat infarct model.[2] To our knowledge, survival has not been documented for infarctions involving the anterior, inferior and lateral wall leaving intact only the septal wall.

As a part of an experimental protocol and using previously described methods,[3, 4] an adult male Wistar rat (292g, 9 weeks old) underwent a permanent ligation of the left anterior descending coronary artery and was subsequently referred to ^{18}F-Fluorodesoxyglucose- Positron Emission Tomography (FDG-PET) exams, which were performed at 48 hours, 1 month and 2 months. The animal was sacrificed immediately after the 2-month FDG-PET exam for ex-vivo analyses.

The 3 FDG-PET exams were analyzed using the 17-segment LV division and as many as 12 out of the 17 segments (72%) had a lower than 50% of FDG uptake, a criterion that is conventionally used for defining necrotic segments (non-viable myocardium)[3] (Figure 1). These 12 necrotic segments were also totally akinetic on the ECG-triggered FDG-PET images (see the movie images in the online supplement), leaving intact only the 5 septal segments. LV ejection fraction, determined with the QGS software, was severely decreased at 48 h (17%) and further decreased at 2-month (9%). There was a marked enhancement in LV end-diastolic volume between 48 h (737 μL) and 2-month (1015 μL). A progressive hypertrophy of the right ventricular free wall was

also documented between 48-hours and 2-months, as well as a decline in the contractility of the non-infarcted septal wall and right ventricular segments (see movie images). In addition, the necrotic LV segments had evidence of intense collagen deposition, as attested by Sirius red staining, and recruitment of inflammatory cells, as attested by hematoxylin and eosin staining (Figure 2).

It is not clear how this rat survived after such a massive infarct leaving intact only the septal wall. In these conditions, the overall right ventricle was totally preserved, a point that is likely to have a favorable impact on outcome.

Acknowledgments

The authors acknowledge the assistance of Henri Boutley, Sylvain Poussier, Mickael Lhuillier, and Gilles Karcher. M.B. is recipient of a fellowship from the National Fund for Research of Luxembourg.

Disclosures

None

References

1. McCallister BD, Jr., Christian TF, Gersh BJ, Gibbons RJ. Prognosis of myocardial infarctions involving more than 40% of the left ventricle after acute reperfusion therapy. Circulation. 1993;88:1470-1475.

2. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circ Res. 1979;44:503-512.

3. Bousquenaud M, Maskali F, Poussier S, Marie PY, Boutley H, Karcher G, Wagner DR, Devaux Y. Acipimox-enhanced (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for characterizing and predicting early remodeling in the rat infarct model. Int J Cardiovasc Imaging. 2011. In press.

4. Poussier S, Maskali F, Tran N, Person C, Maureira P, Boutley H, Karcher G, Lacolley P, Regnault V, Fay R, Marie PY. ECG-triggered (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of the rat heart is dramatically enhanced by acipimox. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010;37:1745-1750.

Figure 1. FDG-PET images recorded at 48-hours, 1-month and 2-months after ligation of the left anterior descending coronary artery. Short- and long-axis slices and polar maps are shown. Corresponding movie clips are available in the online-only supplement. Left ventricular end-diastolic volume (EDV) and ejection fraction (EF) are indicated. Color scale represents the percentage of FDG uptake according to the maximal voxel value.

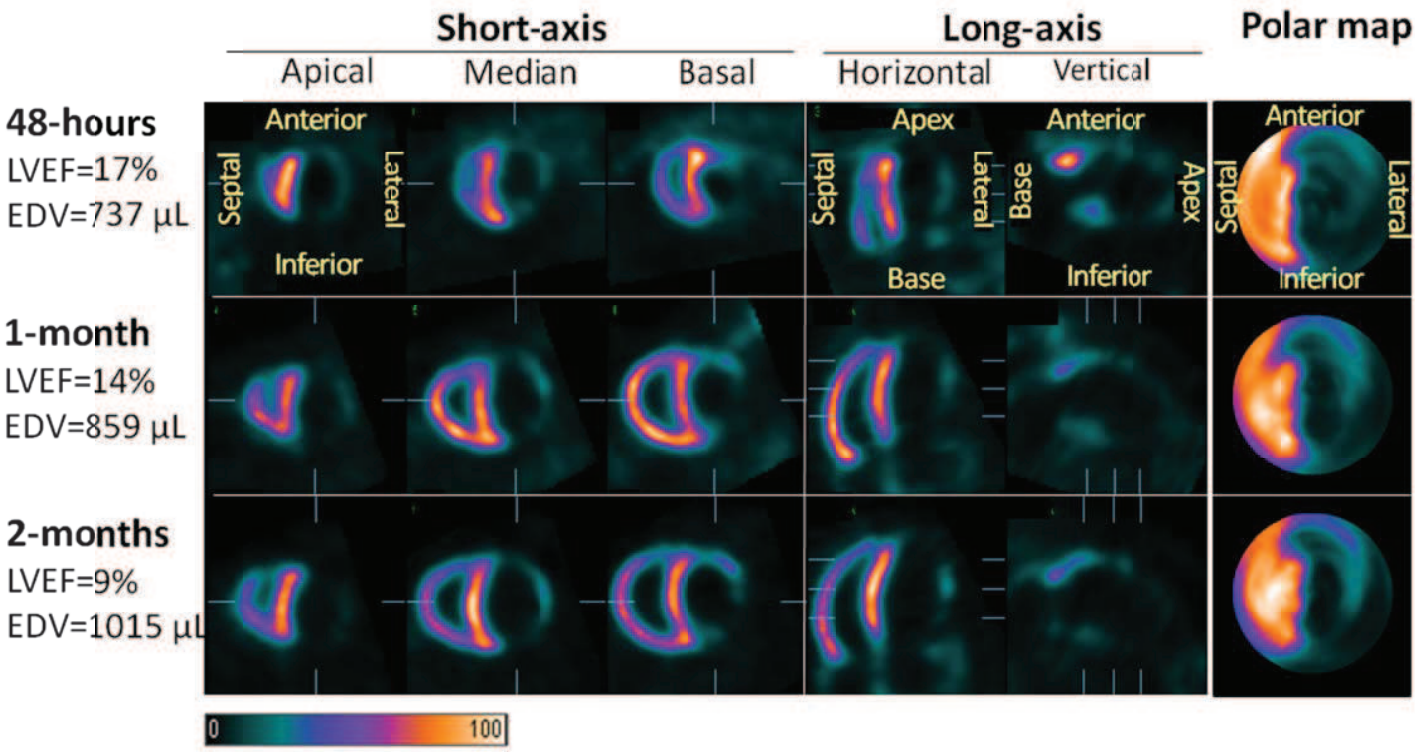
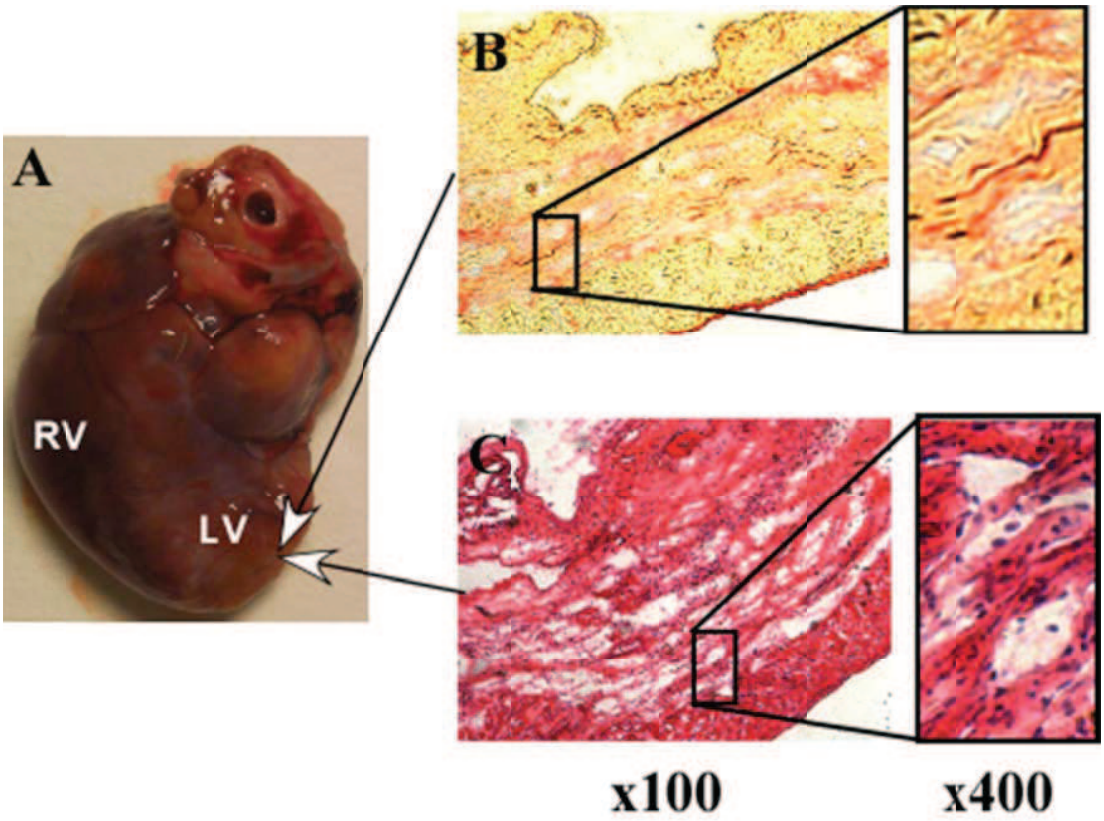


Figure 2. Morphology (A), Sirius red staining (B) and hematoxylin and eosin staining (C) of the heart 2 months after coronary ligation. LV: left ventricle; RV: right ventricle.



Etude n°3: L'adénosine améliore la contractilité cardiaque dans la zone bordant l'IDM et stimule le recrutement des cellules endothéliales progénitrices

En dépit des thérapies de reperfusion, le remodelage ventriculaire gauche survient dans une proportion importante de patients ayant subi un IDM, et ce remodelage peut être responsable de l'évolution vers l'IC. La recherche de nouvelles cibles pharmacologiques capables de prévenir ou de réduire le remodelage ventriculaire gauche est donc d'un intérêt majeur. Dans ce contexte, la zone bordant l'IDM pourrait constituer une région cible intéressante. On sait en effet que l'IDM provoque une hypokinésie de la zone bordant l'IDM, et ceci malgré un flux sanguin transmural normal[167].
D'autre part, l'élongation des cardiomyocytes dans la zone bordant l'IDM pourrait être responsable d'une dysfonction mitochondriale et de l'apoptose de ces cellules[168, 169]. En effet, l'injection de cellules souches dans la zone bordant l'IDM réduit l'apoptose et améliore la densité vasculaire et la contractilité cardiaque chez le porc[170]. Des résultats similaires ont été obtenus suite à la coexpression de VEGF et d'angiopoietin-1 dans la zone bordant l'IDM [171]. Ces études ne sont pas extrapolables à l'homme, c'est pourquoi il est indispensable de poursuivre les études précliniques et cliniques dans ce domaine.
Les effets cardioprotecteurs d'un agoniste A2B ont été montrés sur le rat après IDM dans une récente étude[17]. Mais l'amplitude de ces effets dans la zone bordant l'IDM n'avait pas encore été étudiée.
Le but de cette étude a été de caractériser les effets d'un traitement chronique par l'adénosine en post IDM en utilisant la FDG-TEP.

Les résultats suivants ont été obtenus :

-Les animaux ont été répartis de façon homogène dans 3 groupes expérimentaux (NaCl, CADO, CADO + 8-SPT), selon le nombre de segments cardiaques nécrosés identifiés par TEP à 48 heures (tous les animaux ligaturés ont au moins 1 segment nécrosé ayant une captation en FDG <50%). Au sein de chaque groupe, les rats souffrent

en moyenne d'un IDM touchant 35% du VG, ce qui correspond à 6 segments cardiaques. Sept rats forment le groupe contrôle (NaCl), 8 forment le groupe CADO (analogue stable de l'adénosine *in vivo*), et 8 rats sont inclus dans le groupe CADO + 8-SPT (CADO avec la 8-SPT, un antagoniste aspécifique des récepteurs à l'adénosine).

-Dans les 2 mois suivants l'IDM, tous les rats présentaient les signes d'un remodelage cardiaque, avec une augmentation du VTD et du VTS (environ +50%). Leur FC, PAS et taille d'IDM restaient stables.

-Comparés aux animaux contrôles, les rats traités avec la CADO présentaient une une FC plus faible à 1 mois (338±35bpm vs 374±31bpm, $P<0.05$) et à 2 mois (338±33bpm vs 383±22bpm, $P<0.05$) après l'IDM. Chez les animaux du groupe CADO, on observait une tendance non significative à la réduction des volumes ventriculaires et à une amélioration de la FE à 1 mois (VTD : 576±111µL vs 600±95µL ; VTS : 324±106µL vs 353±67µL ; FE : 45±9 vs 42±2%) et 2 mois. (VTD : 637±151µL vs 692±132µL ; VTS : 379±149µL vs 432±120µL ; FE : 42±8 vs 38±5%).

-La contractilité segmentaire, évaluée par le % d'épaississement du myocarde entre la systole et la diastole, a été analysée dans la zone infarcie, dans la zone bordant l'IDM et dans la zone saine des 23 rats. Quarante-trois segments étaient nécrosés avec une captation en FDG <50%, 109 segments étaient sains et distants d'au moins 1 segment des segments nécrosés et 239 segments étaient considérés comme appartenant à la zone intermédiaire et bordant l'IDM. Sur le TEP effectué à 48 heures, la contractilité segmentaire présentait une diminution progressive entre la zone saine (40±9%), la zone bordant l'IDM (23±13%) et la zone infarcie (12±4%) ($P<0.001$).

-Chez les animaux contrôles, la contractilité segmentaire présentait une détérioration progressive à 1 mois et 2 mois après IDM. Cette détérioration s'observait en dehors des segments infarcis, dans les zones saine et bordant l'IDM. En revanche, cette détérioration n'était pas conservée chez les rats du groupe CADO. Dans chacun des 2 groupes (contrôle et CADO), il n'y avait pas d'évolution de la contractilité segmentaire dans les segments infarcis. En analyse multivariée, l'évolution de la contractilité segmentaire des rats CADO était globalement améliorée par rapport aux rats contrôles, avec une interaction significative de la localisation dans la zone saine, bordant l'IDM ou

infarcie (p=0.03 (P=0.03). La contractilité cardiaque était donc améliorée par le traitement CADO, mais cette amélioration dépendait donc de la localisation du segment par rapport à la zone d'IDM, avec une nette prédominance dans les zones saine et bordant l'IDM. Par contre, aucune différence dans l'évolution de la contractilité segmentaire n'était observée entre le groupe contrôle et le groupe 8-SPT.

-Les analyses ex vivo ont aussi montré que la CADO stimulait le recrutement et la prolifération de cellules progénitrices dans la zone bordant l'IDM du cœur. Ceci a été observé grâce à un co-marquage des coupes histologiques avec PCNA, un marqueur de prolifération cellulaire et c-Kit, un marqueur des cellules progénitrices. Pour caractériser ces cellules, nous avons fait un triple marquage des coupes avec CD31, un marqueur des cellules endothéliales ; CXCR4 et ALDH2, deux marqueurs des cellules endothéliales progénitrices[172-177]. Les vaisseaux sanguins ont aussi été quantifiés dans la zone bordant l'IDM des cœurs de tous les animaux de chaque groupe expérimental. Le groupe CADO présentait une augmentation du nombre vaisseaux dans la zone bordant l'IDM (+65% par rapport aux contrôles). Ces observations suggèrent qu'il existe un accroissement de l'angiogenèse dans la zone bordant l'IDM avec le traitement CADO et que cet effet pourrait au moins en partie être lié à un recrutement des EPC. D'autre part, ces observations disparaissent totalement dans le groupe 8-SPT, ce qui suggère que l'angiogenèse serait bloquée par la 8-SPT.

-Nous avons aussi observé que les rats du groupe CADO avaient une plus faible fibrose dans les zones saines, mais cette observation n'était pas statistiquement significative. En revanche, les rats du groupe 8-SPT présentaient une fibrose significativement plus importante en dehors des zones infarcies (8 fois plus que dans le groupe CADO, $p<0.0001$).

-La surface des cardiomyocytes était aussi diminuée dans le groupe CADO par rapport au groupe contrôle, témoignant d'une diminution de l'hypertrophie à l'échelle cellulaire, alors que cet effet disparaissait dans le groupe 8-SPT.

-Par contre, le traitement à la CADO ne semblait pas avoir d'effet notable sur l'apoptose des cellules cardiaques, évaluée par un marquage à l'Annexin-5.

Ainsi, cette étude montre que la stimulation à long terme des récepteurs à l'adénosine a des effets cardioprotecteurs dans la zone bordant l'IDM et dans les zones situées à distance de l'IDM. Ces effets pourraient impliquer la stimulation de l'angiogenèse par recrutement des EPC circulantes, et la diminution de la fibrose et de l'hypertrophie cellulaire.

Adenosine Improves Contractility in the Infarct Border Zone Through Recruitment of Endothelial Progenitor Cells

Short title: adenosine treatment after myocardial infarction

Mélanie Bousquenaud MSc,[a] Fatiha Maskali PhD,[b] Sylvain Poussier PhD,[b] Pierre-Yves Marie MD, PhD,[b,c] Henri Boutley BSc,[b] Renaud Fay PharmD,[d] Gilles Karcher MD, PhD,[b] Daniel R. Wagner MD, PhD,[a,e] Yvan Devaux PhD[a].

From the [a]Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public-Santé, Luxembourg; [b]Nancyclotep experimental imaging platform, Nancy, F-54000 France; [c]INSERM, U961, Nancy, F-54000 France; [d]INSERM, Centre d'Investigation Clinique CIC-P 9501, Nancy, F-54000 France, [e]Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg.

Corresponding author:

Yvan Devaux, PhD, Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public Santé, 120 route d'Arlon, L1150 Luxembourg, Phone +352 26970300, Fax +352 26970396, E-mail: yvan.devaux@crp-sante.lu

ABSTRACT

Background–The infarct border zone has become a target for new therapies such as stem cell injections. We sought to determine the effect of the pro-angiogenic nucleoside adenosine on the infarct border zone.

Methods and Results–Wistar rats underwent left anterior descending (LAD) ligation. One week after myocardial infarction (MI), animals were randomized into 3 groups: NaCl (Control; n=7), 2-chloroadenosine (CADO, stable analogue of adenosine; n=8) or CADO with 8-sulfophenyltheophilline, an antagonist of adenosine receptors (8-SPT; n=8). ECG-triggered ^{18}F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) was performed 2 days post MI and at 1 and 2 months. The change in myocardial thickening between 2 days and 2 months was improved in the CADO group compared to the Control group (+1.6±0.8% vs -2.3±0.8%, respectively, $p<0.001$). CADO limited contractile dysfunction in remote segments (-4.0±1.0% vs. -10.4±1.3%, $p<0.001$) and had no effect in the MI area. In the infarct border zone, CADO robustly improved myocardial contraction (change in myocardial thickening between 2 days and 2 months: +5.6±0.8% vs. +1.5±0.8% for CADO group and Control group, respectively, $p<0.001$). CADO stimulated the recruitment of c-Kit+/CD31+/CXCR4+/ALDH2+ cells in the border zone and this was associated with increased angiogenesis. All these effects were blunted by 8-SPT.

Conclusions–After MI, the long-term administration of adenosine improves segmental contractility in the infarct border zone through recruitment of endothelial progenitor cells and enhanced angiogenesis.

KEYWORDS: adenosine; acute myocardial infarction; segmental contractility; endothelial progenitor cells; gated cardiac PET.

Despite reperfusion therapies, left ventricular (LV) remodeling occurs in many patients after acute myocardial infarction (MI) and is associated with heart failure (HF) [1]. This has stimulated efforts to develop new pharmacological strategies to prevent or reverse LV remodeling. LV remodeling is defined as a complex sequence of changes in left ventricle geometry and function [2, 3] involving progressive LV dilatation, cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis, ultimately leading to loss of contractile function and LV dysfunction. Increased wall stress in the infarct border zone has been implicated among the factors which contribute to LV remodeling [4, 5].

It has been known for many years that acute MI leads to hypokinesis in the border zone [6]. It is also known that the extent of the border zone characterized by cardiac magnetic resonance imaging provides incremental prognostic value beyond LV volumes and ejection fraction (EF) [7].

Overstretching of the cardiac myocytes in the border zone is associated with mitochondrial dysfunction and apoptosis. Injection of stem cells into the border zone has been shown to reduce apoptosis and to enhance vascular density and contractile performance in pigs [8]. Coexpression of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 in the infarct border zone of pigs has shown similar results [9]. However, while those therapeutic approaches are fascinating, they are clinically not widely applicable. So far, an effective treatment of the border zone is lacking.

Data suggest that circulating progenitor cell therapies after MI improve cardiac function [10-12]. Endothelial progenitor cells (EPC) have the potential to stimulate angiogenesis and endothelial repair by homing to sites of endothelial damage [13]. Thus,

improving the recruitment and homing of EPC to the infarct border zone is a promising therapeutic approach.

Adenosine is an ubiquitous, endogenous nucleoside that modulates physiological functions in various organs and plays important roles within the cardiovascular system [14]. It can signal through four subtypes of G protein-coupled receptors [15], all of which are expressed in the heart [16]. Cardioprotective properties of adenosine have been characterized, particularly during ischemic pre-conditioning. However, the protective effects of adenosine in the context of LV remodeling have received less attention.

In a rat infarct model, chronic administration of adenosine after MI improved global cardiac function measured by echocardiography and reduced fibrosis in remote areas [17]. A recent study in transgenic swine showed that over-expression of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase -1 (CD39), which induces adenosine production from ATP, reduced infarct size [18]. Whether adenosine has an effect on the infarct border zone is unknown. Therefore, the aim of the current study was to determine the effect of chronic administration of adenosine on the infarct border zone.

METHODS

This study was performed in accordance with the regulations of the Animal Welfare Act of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85–23, revised 1996) and protocols were approved by the Regional Veterinary Department ("Direction Départementale de la Protection des Populations"), agreements RAR1A03516811825 and 54-100.

Animal model and experimental design

Twenty-three adult male Wistar rats (Charles Rivers Laboratories; 282- to 335-g body weight at the beginning of the study) were enrolled. All animals were housed on a 12h light-dark cycle in a room with temperature and humidity control, and with *ad libitum* access to tap water and standard rodent food. Permanent occlusion of the left anterior descending (LAD) coronary artery was performed in 23 rats as previously described [19, 20]. Rats were anesthetized by inhalation of an isoflurane/oxygen mixture (2–3%/1.5 v/v), and were intubated and ventilated with a rodent ventilator (Harvard Apparatus, Holliston, USA). The heart was exposed through a left lateral thoracotomy of the fifth intercostal space. After pericardial incision, the proximal part of the LAD (2 to 3 mm from the top of the left atrium) was ligated with a 7-0 Prolene suture (Ethicon, Somerville, NJ, USA). Perioperative lidocaïne (10mg/kg, Aguettant, France) was used to provide a local anaesthesia and to reduce the incidence of ventricular tachycardia and fibrillation. Finally, the chest was closed in layers with a 2-0 Vicryl suture (Ethicon, Somerville, NJ, USA), the lungs were re-inflated using positive-end expiratory pressure, and the endotracheal

tube was removed once spontaneous breathing had resumed. Amoxicilline was injected intramuscularly (60mg/kg, Glaxo SmithKline, France) to avoid bacterial infections. Mortality of the procedure was 50%.

Two days after surgery, rats were assessed by ECG-triggered ^{18}F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography (FDG-PET) and divided in 3 groups depending on the number of infarcted segments (≤ 3, 4-to-5 or ≥ 6). In each of the 3 groups, rats were randomly assigned to treatment with NaCl (Control group; n=7) or 2-chloroadenosine (2 $mg.kg^{-1}.d^{-1}$), a stable analogue of adenosine, which was given alone (CADO group; n=8) or with 8-sulfophenyltheophilline (10 $mg.kg^{-1}.d^{-1}$), an antagonist of adenosine receptors (8-SPT group; n=8). NaCl, CADO and 8-SPT (Sigma-Aldrich, Bornem, Belgium) were administered intraperitoneally twice daily for 2 months, starting 7 days after the date of the LAD occlusion. The double randomization of the rats assured that treatments were evenly distributed among the different levels of LV dysfunction post injury.

^{18}F-Fluorodeoxyglucose PET

Two days, 1 month and 2 months after surgery, LV function and infarct size were assessed *in vivo* by FDG-PET, a reference imaging technique in this setting. As already described in details elsewhere, [20, 21] rats received an oral pre-medication of 50 mg/kg of acipimox, a potent nicotinic acid derivative yielding high quality cardiac FDG-PET images. 74 MBq of ^{18}F-FDG (IBA, Nancy, France) were injected intravenously under a transient anaesthesia with isoflurane. A 16-minute recording was started one hour later on

a high resolution dedicated small animal PET system (Inveon, Siemens, Knoxville, TN, USA) and under continuous anaesthesia by isoflurane. Images were reconstructed in 16 cardiac intervals with a 3-D ordered subset expectation maximization algorithm leading to a voxel size of 0.8 x 0.4 x 0.4 mm.

FDG uptake was determined on the set of collapsed short-axis slices in each segment from the 17-segment LV division from the American Heart Association [22] with the QPS software.[23] LV end-diastolic volume (EDV), LV end-systolic volume (ESV) and EF were obtained from the set of contiguous ECG-triggered short-axis slices with the QGS software.[23, 24] The QGS software was also used for assessing segmental values of myocardial thickening on the 17-segment LV division and according to the % of systolic increase in myocardial counts, [23] a parameter that is strongly linked to the % of myocardial thickening with both myocardial-SPECT and -TEP imaging techniques[25, 26].

As previously described,[20] all segments for which the average FDG uptake was lower than 50% of the maximal voxel value, were considered as predominantly necrotic, and the percentage of such segments was used to assess the extent of MI areas. For the segmental analysis of contractility, we also identified the segments for which FDG uptake was lower on the entire segments areas and thus, without any > 50% area, on the baseline FGD-PET exam. These segments were considered as totally necrotic and were classified as MI segments. For this segmental analysis, the remote segments were defined as those which were not adjacent to any segments involving < 50% uptake areas, and the remaining segments were called border zone segments.

The average heart rate value during PET acquisition was extracted from the list mode recording data. Systolic blood pressure was calculated as the mean value of 4 recordings by the tail-cuff method during the PET acquisition (AD Instruments, Powerlab, France).

Histological analyses

Rats were sacrificed 1 to 2 days after the last PET acquisition with an overdose of sodium pentobarbital. Hearts were excised, snap frozen in liquid nitrogen, fixed and embedded in optimal cutting media (VWR, France). Contiguous sections (8µm), orientated along the vertical or horizontal long axis of the LV (depending on infarct location), were obtained in a cryostat at -22°C and stored at -80°C until analysis.

Immunohistochemical stainings were performed for PCNA (proliferating cell nuclear antigen; mouse monoclonal antibody clone PC10, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, DE), CD31 (endothelial marker; mouse monoclonal antibody clone P2B1, Abcam, Cambridge, UK), c-Kit (progenitor marker; rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology), aldhehyde dehydrogenase 2 (ALDH2, endothelial progenitor marker; polyclonal goat antibody, Santa Cruz Biotechnology), CXCR4 (endothelial progenitor marker; rabbit polyclonal antibody, Abcam) and annexin-5 (apoptosis marker; rabbit polyclonal antibody, Abcam). Alexa Fluor®532-coupled goat anti-mouse antibody, Alexa Fluor®635-coupled goat anti-rabbit antibody, Alexa Fluor®488-coupled donkey anti-mouse antibody, Alexa Fluor®568-coupled donkey anti-goat antibody and Alexa Fluor®688-coupled donkey anti-rabbit antibody were used as secondary

antibodies. Technical controls without primary antibody were performed for each marker to ensure staining specificity. DAPI was used to reveal nuclei. Images were recorded on a confocal microscope (Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510, Carl Zeiss Microscopy, Germany) with a 400x magnification using the LSM 510 META software (Carl Zeiss Microscopy, Germany).

The degree of fibrosis in heart sections was assessed by Masson trichrome staining. The collagen volume fraction was measured while omitting fibrosis of the perivascular, epicardial and endocardial areas [27]. Fibrosis area in the border zone was measured in 3 random fields per heart section (400x magnification) by dividing the area of collagen to the total area and using ImageJ v 1.42 software (http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html).

Hematoxylin and eosin staining was performed to assess vascularization and cross-sectional area of cardiomyocytes in heart sections. The number of vessels was counted in the whole section of each animal (100x magnification). For each section, at least 5 cardiomyocytes sectioned transversely were randomly chosen and their area was quantified using ImageJ v 1.42 software. The average area was calculated for each experimental group.

Statistical analysis

Analyses were performed using the SAS R9.3 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) and the two-tailed significance level was set to $p<0.05$.

Pairwise comparisons of quantitative variables between CADO or 8-SPT group and Control group were carried out using Mann-Whitney test and corresponding variables were expressed with mean ± standard error of the mean (SEM).

Segmental contractility was analysed over time by using repeated measures mixed ANOVA: 1) with treatment group and segment location as fixed factors and 2) with rat as a random factor nested within the "treatment" variable (all segments from a single rat received the same treatment). The results of these analyses were expressed as adjusted means ± SEM. Validity conditions of the models were thoroughly checked (normality of residuals, homoscedasticity, and absence of collinearity or interaction). These global analyses were conducted for assessing first, the effect of CADO alone (CADO vs. Control) and thereafter, the effect of CADO associated with 8-SPT (8-SPT vs. Control). In order to preserve the overall 5% alpha error rate, the comparisons of CADO or 8-SPT vs. Control were carried out at the 2.5% level.

RESULTS

Early FDG-PET imaging and randomization

On the baseline FDG-PET scans recorded 2 days after LAD occlusion, necrotic segments were observed in all 23 animals. Infarct area was large (>35% of LV) in 9 rats, moderate (21 to 35% of LV) in 10 rats and limited (≤20% of LV) in 4 rats. Animals were randomized in 3 experimental groups: Control (n=7), CADO (n=8) and 8-SPT (n=8). Randomization assumed that different degrees of LV dysfunction were equally distributed among the 3 treatment groups. As shown in Tables 1 and 2, rats from each of the 3 groups had similar infarct size and were comparable with respect to LV volumes, EF, heart rate, blood pressure and body weight.

Hemodynamic and cardiac parameters

The time course of body weight, heart rate, blood pressure and cardiac parameters is shown in Tables 1 and 2. Over the course of the study, all rats exhibited LV remodeling with significant increases in EDV and ESV (approx. + 50%).

When compared to Controls, CADO-treated rats had a lower body weight and a lower heart rate (Table 1). However, blood pressure was not affected by CADO treatment. In the CADO group, LV volumes were reduced but this did not reach statistical significance. Similarly, the EF was mildly increased in the CADO group and this was not statistically significant.

Segmental contractility

Seventeen segments were analyzed in each animal, with a total of 391 segments. On 2-days PET scans, 43 segments were totally necrotic (MI segments, <50% FDG-uptake), 109 were considered as remote segments (at least 1 segment away from segments with <50% FDG-uptake) and the 239 remaining segments were considered as border zone. We observed a continuous decline in myocardial thickening, between remote (40±9%), border zone (23±13%) and MI (12±4%) segments ($p<0.001$).

Representative FDG-PET images of a Control and CADO rat, obtained at 48 hours, 1 month and 2 months, are shown in Figure 1. Myocardial thickening of the Control rat was progressively impaired outside the MI area, within the inferior, septal and lateral areas. Myocardial thickening was preserved in the CADO rat. As expected, the MI areas remained unaltered during follow-up in both animals with a marked decrease in FDG signal at both end-diastole and end-systole. Analyses of variance revealed that the time course of segmental contractility was enhanced in CADO-treated rats, compared to Control rats, with a significant interaction by segment location (remote, border zone or MI area) ($p=0.03$). In contrast, no difference was seen when 8-SPT rats were compared to Control rats using the same model.

Changes in segmental contractility over time were compared between the 3 groups (Figure 2). The main observation is that segmental contractility of CADO-treated rats was preserved during follow-up (Figure 2A). Indeed, the mean difference in the % of myocardial thickening between 48-hours and 1-month was 0.9±0.7% in the Control

group and 3.8±0.7% in the CADO group ($p<0.01$). At 2 months, Control rats showed dyskinesis (-2.3±0.8%) whereas contractility was preserved in CADO-treated rats (+1.6±0.8%, $p<0.001$). The protection induced by CADO was lost when rats were treated with 8-SPT (-4.1±0.7%) (Figure 2A).

After 1 month (Figure 2B), we observed that the effect of CADO on segmental contractility varied with segment location. It was marked in remote segments (2.1±1.0% vs. -4.8±1.2%, $p<0.001$), moderate in border zone segments (+7.0±0.7% vs. +2.7 ±0.7%, $p<0.001$) and absent in MI segments (+2.4±1.8% vs. +4.8±1.6%). Similarly, after 2 months, CADO improved segmental contractility in remote segments (-4.0±1.0% vs. -10.4±1.3%, $p<0.001$) and in the infarct border zone (+5.6±0.8% vs. +1.5±0.8%, $p<0.001$). No effect was detected in the MI area (Figure 2C).

Recruitment of progenitor cells and angiogenesis in the border zone

The effect of CADO on the recruitment of progenitor cells was evaluated. Cardiac sections immunostained with PCNA, a marker of cell proliferation; and c-Kit, a marker of progenitor cells, revealed an enhanced recruitment and proliferation of progenitor cells in the border zone from CADO-treated rats (Figure 3).

To phenotypically characterize these cells, we stained cardiac sections with CD31, CXCR4 and ALDH2, three markers of EPC. These experiments showed that CADO treatment stimulated the recruitment of $CD31^{+}/ALDH2^{+}/CXCR4^{+}$ cells in the border zone, a phenotype characteristic of EPC (Figure 4). This effect was blunted by 8-SPT.

Then, we assessed whether this enhanced recruitment of endothelial progenitors resulted in improved angiogenesis. CADO-treated rats exhibited an enhanced number of blood vessels within the border zone, indicating that EPC recruitment indeed favored revascularization of the infarct border zone (+65% when compared to controls, P=0.03) (Figure 5). This angiogenic effect was prevented by 8-SPT.

Fibrosis and cardiomyocytes hypertrophy

We examined the extent of fibrosis outside the MI areas (Figure 6). Chronic administration of CADO appeared to reduce fibrosis in remote areas but this was not statistically significant. However, administration of 8-SPT highly increased collagen deposition in remote areas (8-fold increase compared to CADO group, P<0.001).

In addition, cardiomyocyte cross sectional area in healthy parts of the heart was lower in the CADO than in the Control group, and this effect was blunted by 8-SPT (Figure 7).

Cardiac cell apoptosis

The effect of CADO on apoptosis was assessed with annexin-5 immunostaining of cardiac sections. Annexin-5 was detected in the border zone from both vehicle and CADO-treated rats. No difference was noticed, indicating that CADO had no effect on cardiac apoptosis (Figure 8).

DISCUSSION

With better tissue characterization using MRI and PET and new treatment modalities such as stem cell therapy, the infarct border zone has become an interesting new target after MI. This is the first report which shows that adenosine improves angiogenesis and contractility in the infarct border zone.

We used permanent ligation of the LAD coronary artery in rats with acipimox-enhanced FDG-PET imaging. Acipimox is a potent nicotinic acid derivative used for metabolic conditioning of patients referred to cardiac FDG-PET.[28, 29] With this pre-medication, myocardial uptake of FDG is less inhibited by circulating free fatty acids, resulting in high quality cardiac FDG-PET images.[21, 28, 29] We have recently shown that acipimox-enhanced cardiac FDG-PET provides an accurate characterization of infarct size and LV remodeling in the experimental model of LAD-occlusion[20]. In the present study, the PET exam performed 48 hours after surgery allowed to randomize the animals into 3 treatment-groups according to initial infarct size, which is a main determinant of LV remodeling[20].

Our results are in line with Wakeno et al. who observed better LV dP/dt and global fractional shortening 3 weeks after CADO treatment in LAD-occluded rats [17]. We also confirmed that adenosine appears to reduce fibrosis in remote areas.

The major finding of our study is that treatment with CADO has beneficial effects on segmental contractility in the infarct border zone. This effect was totally blunted by the addition of the antagonist of adenosine receptors, 8-SPT. The exact mechanism by

which the stimulation of adenosine receptors improves contractility in the border zone remains to be fully defined. We observed a mild effect of CADO on heart rate and no effect on systolic blood pressure. This is unlikely to explain the effect observed in the infarct border zone. Previous experiments from our group have shown that adenosine regulates multiple pathways involved in LV remodeling, such as inflammation [30, 31], angiogenesis [32-34], and extracellular matrix turnover [35, 36]. In the post-mortem analyses of the present study, we confirmed the pro-angiogenic properties of adenosine in the border zone of the infarct. This effect is presumably consecutive to enhanced recruitment of endothelial progenitors.

Fazel et al.[37] have shown that activation of c-Kit is necessary for bone marrow progenitor cell mobilization after ischemic cardiac injury. Moreover, Fazel et al. observed that mice with c-Kit dysfunction develop cardiac failure after MI. In the neonatal rat heart, cardiovascular precursor cells have been identified using c-Kit expression [38]. Our data clearly showed a stimulation of the recruitment of c-Kit^{+} cells to the infarct border zone in the presence of CADO. The endothelial phenotype of these progenitors was confirmed by co-expression of CD31, ALDH2 and CXCR4. Transplantation of bone marrow cells with high ALDH activity improves revascularisation of ischemic limbs and cord blood progenitors with high ALDH activity improve vascular density after acute MI [39, 40]. Therefore, the increased expression of ALDH2 observed in cardiac sections from CADO-treated rats indicates a stimulation of the recruitment of EPC with high regenerative potential. In LAD-occluded control rats, we did not observe significant staining for ALDH2 and CXCR4, suggesting that EPC recruitment is weak in these

animals. Thus, our data suggest that adenosine stimulates the recruitment of EPC to the heart following ischemic injury.

The improvement in contractility in the border zone may also be consecutive to improved mitochondrial function and reduced apoptosis of cardiac myocytes. Indeed, mitochondria play a central role in apoptosis and TNF-α can damage the mitochondrial membrane potential, thereby triggering apoptotic pathways. Since we have shown that adenosine limits the release of TNF-α by several cell types including cardiac myocytes [31, 41], it was tempting to speculate that adenosine may reduce apoptosis of cardiac myocytes. However, we did not observe a significant reduction of apoptosis in CADO-treated rats. Simonis et al.[42] have shown that CADO reduces cardiomyocyte apoptosis when administrated before the onset of MI or 3 hours thereafter. In our protocol, in which CADO treatment started 7 days post MI, the cardioprotective effect of adenosine may be different. Furthermore, our results strongly support the notion that a substantial amount of myocytes in the infarct border zone are viable and may benefit from therapeutic intervention.

Hypertrophy is a compensatory mechanism during post-infarction remodeling that may result in hyper-function of the left ventricle [43, 44]. In this study, although cardiomyocyte hypertrophy was inhibited in the CADO group, LV volumes were not significantly decreased by CADO-treatment and changes of EF failed to reach statistical significance. This may be explained by the relatively low number of animals.

It is interesting to note that the effect of adenosine in the border zone reported here is very similar to the effects observed by Wang et al [8] after injection of multipotent

progenitor cells into the border zone of pigs. In clinical trials, adenosine has so far been administered in the acute phase [45-47]. These trials failed to demonstrate a significant protective effect of adenosine. From our results, it can be speculated that a chronic administration of adenosine or adenosine analogues may have the potential to limit wall stress at the border zone and improve outcome after MI.

Angiotensin-converting-enzyme (ACE) inhibitors and ß-blockers are currently standard medications to limit remodeling post MI. Although their effect on global function and contractility in remote areas is well documented, this is not the case for their effect on the border zone. Indeed, ß-blockers may only have a limited effect in the border zone because of multiple defects in the membrane ß-adrenergic receptor complex in the infarcted heart [48].

In conclusion, we have shown that chronic administration of an adenosine analog improves segmental contractility in the infarct border zone. This effect appears to involve endothelial progenitor cells. Further studies are required to determine the therapeutic potential of this observation.

Sources of fundings

This study was in part supported by the Society for Research on Cardiovascular Diseases and the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg. MB is recipient of a fellowship from the National Fund for Research of Luxembourg (grant # PhD-AFR 08-024).

Disclosures

There are no conflicts of interest with any of the authors.

REFERENCES

1. Wolk MJ, Scheidt S, Killip T. Heart failure complicating acute myocardial infarction. Circulation. 1972; 45:1125-1138.

2. Jessup M, Brozena S. Heart failure. N Engl J Med. 2003; 348:2007-2018.

3. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. J Am Coll Cardiol. 2000; 35:569-582.

4. Hu Q, Wang X, Lee J, Mansoor A, Liu J, Zeng L, Swingen C, Zhang G, Feygin J, Ochiai K, Bransford TL, From AH, Bache RJ, Zhang J. Profound bioenergetic abnormalities in peri-infarct myocardial regions. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006; 291:H648-657.

5. Guccione JM, Moonly SM, Moustakidis P, Costa KD, Moulton MJ, Ratcliffe MB, Pasque MK. Mechanism underlying mechanical dysfunction in the border zone of left ventricular aneurysm: a finite element model study. Ann Thorac Surg. 2001; 71:654-662.

6. Homans DC, Asinger R, Elsperger KJ, Erlien D, Sublett E, Mikell F, Bache RJ. Regional function and perfusion at the lateral border of ischemic myocardium. Circulation. 1985; 71:1038-1047.

7. Yan AT, Shayne AJ, Brown KA, Gupta SN, Chan CW, Luu TM, Di Carli MF, Reynolds HG, Stevenson WG, Kwong RY. Characterization of the peri-infarct zone by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality. Circulation. 2006; 114:32-39.

8. Wang X, Jameel MN, Li Q, Mansoor A, Qiang X, Swingen C, Panetta C, Zhang J. Stem cells for myocardial repair with use of a transarterial catheter. Circulation. 2009; 120:S238-246.

9. Tao Z, Chen B, Tan X, Zhao Y, Wang L, Zhu T, Cao K, Yang Z, Kan YW, Su H. Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011; 108:2064-2069.

10. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher

AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. N Engl J Med. 2006; 355:1222-1232.

11. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebekk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Grogaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. N Engl J Med. 2006; 355:1199-1209.

12. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. N Engl J Med. 2006; 355:1210-1221.

13. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. Circ Res. 2004; 95:343-353.

14. Headrick JP, Peart JN, Reichelt ME, Haseler LJ. Adenosine and its receptors in the heart: Regulation, retaliation and adaptation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. 2011; 1808:1413-1428.

15. Fredholm BB, Ijzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Muller CE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors--An Update. Pharmacol Rev. 2011; 63:1-34.

16. Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003; 285:H1797-1818.

17. Wakeno M, Minamino T, Seguchi O, Okazaki H, Tsukamoto O, Okada K, Hirata A, Fujita M, Asanuma H, Kim J, Komamura K, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Long-term stimulation of adenosine A2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. Circulation. 2006; 114:1923-1932.

18. Wheeler DG, Joseph ME, Mahamud SD, Aurand WL, Mohler PJ, Pompili VJ, Dwyer KM, Nottle MB, Harrison SJ, d'Apice AJ, Robson SC, Cowan PJ, Gumina RJ. Transgenic swine: Expression of human CD39 protects against myocardial injury. J Mol Cell Cardiol. 2012; 52:958-961.

19. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circ Res. 1979; 44:503-512.

20. Bousquenaud M, Maskali F, Poussier S, Marie PY, Boutley H, Karcher G, Wagner DR, Devaux Y. Acipimox-enhanced (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for characterizing and predicting early remodeling in the rat infarct model. Int J Cardiovasc Imaging. 2011.

21. Poussier S, Maskali F, Tran N, Person C, Maureira P, Boutley H, Karcher G, Lacolley P, Regnault V, Fay R, Marie PY. ECG-triggered (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of the rat heart is dramatically enhanced by acipimox. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2010; 37:1745-1750.

22. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, Pennell DJ, Rumberger JA, Ryan T, Verani MS. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: a statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. Circulation. 2002; 105:539-542.

23. Germano G, Kiat H, Kavanagh PB, Moriel M, Mazzanti M, Su HT, Van Train KF, Berman DS. Automatic quantification of ejection fraction from gated myocardial perfusion SPECT. J Nucl Med. 1995; 36:2138-2147.

24. Germano G, Kavanagh PB, Berman DS. An automatic approach to the analysis, quantitation and review of perfusion and function from myocardial perfusion SPECT images. Int J Card Imaging. 1997; 13:337-346.

25. Marie PY, Djaballah W, Franken PR, Vanhove C, Muller MA, Boutley H, Poussier S, Olivier P, Karcher G, Bertrand A. OSEM reconstruction, associated with temporal fourier and depth-dependant resolution recovery filtering, enhances results from sestamibi and 201Tl 16-interval gated SPECT. J Nucl Med. 2005; 46:1789-1795.

26. Slart RH, Bax JJ, van Veldhuisen DJ, van der Wall EE, Dierckx RA, de Boer J, Jager PL. Prediction of functional recovery after revascularization in patients with coronary artery disease and left ventricular dysfunction by gated FDG-PET. J Nucl Cardiol. 2006; 13:210-219.

27. Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, Kangawa K. C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2005; 45:608-616.

28. Knuuti MJ, Yki-Jarvinen H, Voipio-Pulkki LM, Maki M, Ruotsalainen U, Harkonen R, Teras M, Haaparanta M, Bergman J, Hartiala J, Wegelius U, Nuutila P. Enhancement of myocardial [fluorine-18]fluorodeoxyglucose uptake by a nicotinic acid derivative. J Nucl Med. 1994; 35:989-998.

29. Bax JJ, Visser FC, Poldermans D, Van Lingen A, Elhendy A, Boersma E, Sloof GW, Visser CA. Safety and feasibility of cardiac FDG SPECT following oral administration of Acipimox, a nicotinic acid derivative: Comparison of image quality with hyperinsulinemic euglycemic clamping in nondiabetic patients. J Nucl Cardiol. 2002; 9:587-593.

30. 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.

31. 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.

32. Ernens I, Leonard F, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 392:351-356.

33. Leonard F, Devaux Y, Vausort M, Ernens I, Rolland-Turner M, Wagner DR. Adenosine modifies the balance between membrane and soluble forms of Flt-1. J Leukoc Biol. 2011; 90:199-204.

34. Azuaje F, Leonard F, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR. Proof-of-principle investigation of an algorithmic model of adenosine-mediated angiogenesis. Theor Biol Med Model. 2011; 8:7.

35. 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. Circ Res. 2006; 99:590-597.

36. 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. Cardiovasc Res. 2008; 80:246-254.

37. Fazel SS, Chen L, Angoulvant D, Li SH, Weisel RD, Keating A, Li RK. Activation of c-kit is necessary for mobilization of reparative bone marrow progenitor cells in response to cardiac injury. Faseb J. 2008; 22:930-940.

38. Tallini YN, Greene KS, Craven M, Spealman A, Breitbach M, Smith J, Fisher PJ, Steffey M, Hesse M, Doran RM, Woods A, Singh B, Yen A, Fleischmann BK, Kotlikoff MI. c-kit expression identifies cardiovascular precursors in the neonatal heart. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106:1808-1813.

39. Capoccia BJ, Robson DL, Levac KD, Maxwell DJ, Hohm SA, Neelamkavil MJ, Bell GI, Xenocostas A, Link DC, Piwnica-Worms D, Nolta JA, Hess DA. Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. Blood. 2009; 113:5340-5351.

40. Sondergaard CS, Hess DA, Maxwell DJ, Weinheimer C, Rosova I, Creer MH, Piwnica-Worms D, Kovacs A, Pedersen L, Nolta JA. Human cord blood progenitors with high aldehyde dehydrogenase activity improve vascular density in a model of acute myocardial infarction. J Transl Med. 2010; 8:24.

41. 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.

42. Simonis G, Wiedemann S, Joachim D, Weinbrenner C, Marquetant R, Strasser RH. Stimulation of adenosine A2b receptors blocks apoptosis in the non-infarcted myocardium even when administered after the onset of infarction. Mol Cell Biochem. 2009; 328:119-126.

43. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. Circulation. 1990; 81:1161-1172.

44. Goldman S, Raya TE. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. J Card Fail. 1995; 1:169-177.

45. Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, DiCarli MF, Leesar MA, Browne KF, Eisenberg PR, Bolli R, Casas AC, Molina-Viamonte V, Orlandi C, Blevins R, Gibbons RJ, Califf RM, Granger CB. 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.

46. 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.

47. Desmet W, Bogaert J, Dubois C, Sinnaeve P, Adriaenssens T, Pappas C, Ganame J, Dymarkowski S, Janssens S, Belmans A, Van de Werf F. High-dose intracoronary adenosine for myocardial salvage in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction. Eur Heart J. 2011; 32:867-877.

48. Steinberg SF, Zhang H, Pak E, Pagnotta G, Boyden PA. Characteristics of the beta-adrenergic receptor complex in the epicardial border zone of the 5-day infarcted canine heart. Circulation. 1995; 91:2824-2833.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Representative examples of FDG-TEP images recorded in a CADO rat (upper panel) and in a Control rat (lower panel) at 48 h, 1 month and 2 months from MI. Horizontal and vertical long-axis slices are shown at both end-diastole (ED) and end-systole (ES) and the myocardial thickening may be assessed through the increase in myocardial signal between ED and ES. The myocardial thickening of the Control but not of the CADO rat is progressively impaired outside the MI area (white arrows), within the inferior (I), septal (S) and lateral (L) areas. The MI areas remain unaltered during follow-up in the two rats with a dramatic decrease in FDG signal at both ED and ES (red arrows).

Figure 2. CADO treatment improves segmental contractility in the healthy heart after MI. The evolution of segmental contractility in the 3 experimental groups is expressed as the change from 48 h to 1 month and 2 months of the percentage of myocardial thickening. A. Global evolution of segmental contractility (i.e. whole heart). B and C. Evolution of segmental contractility after 1 month and 2 months according to segment location (MI, border zone or remote area). Data are adjusted mean ± SEM. *$p<0.01$; **$p<0.001$.

Figure 3. CADO treatment improves the recruitment of progenitor cells in the border zone 2 months after MI. Immunostainings of PCNA (red) and c-Kit (pink) are shown. Nuclei are stained in blue by DAPI. Representative pictures obtained in border zone are shown. Magnification: x400.

Figure 4. CADO treatment improves EPC recruitment to the border zone. Immunostainings of CD31 (green), ALDH2 (red) and CXCR4 (pink) in cardiac sections obtained 2 months after MI are shown. Nuclei are stained in blue by DAPI. Merge: overlay of CD31, ALDH2 and CXCR4 stainings. Arrows indicate blood vessel membrane. Representative pictures obtained in border zone are shown. Magnification: x400.

Figure 5. CADO treatment stimulates angiogenesis. Upper panel: representative cardiac sections at 2 months showing the border zone stained with hematoxylin and eosin. Arrows indicate blood vessels. Lower panel: quantitative analysis of the number of vessels in the border zone of the infarct. Magnification: x100. Results are mean ± SEM. * $p<0.05$; ** $p<0.001$.

Figure 6. 8-SPT treatment aggravates cardiac fibrosis. Upper panel: cardiac sections of non-infarcted areas of the left ventricle stained with Masson Trichrome. Representative pictures from the 3 experimental groups are shown. Magnification: x400. Lower panel:

quantitative analysis of collagen volume fraction in non-infarcted areas. Results are mean ± SEM. **p<0.001.

Figure 7. CADO treatment limits cardiomyocyte hypertrophy. Upper panel: representative histological sections stained with hematoxylin and eosin in remote areas showing cardiomyocytes hypertrophy. Lower panel: quantitative analysis of cross-sectional area of cardiomyocytes from remote areas. Cardiomyocytes hypertrophy was decreased in CADO-treated rats compared to Control rats. Results are mean ± SEM. au: arbitrary units. *p<0.005; **p<0.001. Magnification: x400.

Figure 8. CADO treatment and apoptosis in the border zone. Annexin-5 immunostaining appears in pink and nuclei appear in blue. Representative sections are shown. Magnification: x400.

Table 1. Body weight, heart rate and blood pressure in the 3 experimental groups.

	Control (n=7)	**CADO** (n=8)	**8-SPT** (n=8)
48 hours			
Body weight (g)	312 ± 25	307 ± 35	307 ± 20
Systolic blood pressure (mmHg)	104 ± 3	107 ± 8	102 ± 7
Heart rate (bpm)	419 ± 14	403 ± 38	422 ± 21
1 month			
Body weight (g)	353 ± 22	332 ± 30	332 ± 27
- change from 48 h	41 ± 15	25 ± 14	25 ± 22
Systolic blood pressure (mmHg)	106 ± 4	106 ± 4	104 ± 4
- change from 48 h	2 ± 4	-2 ± 8	2 ± 7
Heart rate (bpm)	374 ± 31	338 ± 35 *	335 ± 48
- change from 48 h	-45 ± 36	-66 ± 69	-87 ± 60
2 months			
Body weight (g)	402 ± 12	363 ± 26 *	376 ± 45
- change from 48 h	90 ± 22	56 ± 29	69 ± 43
Systolic blood pressure (mmHg)	104 ± 4	104 ± 3	104 ± 5
- change from 48 h	0 ± 5	-3 ± 6	2 ± 10
Heart rate (bpm)	383 ± 22	338 ± 33 *	353 ± 39
- change from 48 h	-36 ± 27	-66 ± 44	-68 ± 36

* $P<0.05$ for unpaired comparisons vs. Control group.

Table 2. Cardiac parameters in the 3 experimental groups.

	Control (n=7)	**CADO** (n=8)	**8-SPT** (n=8)
48 hours			
Extent of MI area (% of LV)	35 ± 6	32 ± 15	32 ± 21
EDV (µL)	412 ± 61	397 ± 57	441 ± 66
ESV (µL)	239 ± 48	230 ± 43	257 ± 74
EF (%)	42 ± 7	42 ± 6	42 ± 7
1 month			
Extent of MI area (% of LV)	32 ± 9	29 ± 14	33 ± 23
- change from 48 h	-3 ± 7	-3 ± 4	1 ± 7
EDV (µL)	600 ± 95	576 ± 111	666 ± 175
- change from 48 h	188 ± 76	179 ± 120	225 ± 160
ESV (µL)	353 ± 67	324 ± 106	428 ± 185
- change from 48 h	114 ± 61	94 ± 112	171 ± 149
EF (%)	42 ± 2	45 ± 9	38 ± 12
- change from 48 h	0 ± 8	3 ± 10	-5 ± 7
2 months			
Extent of MI area (% of LV)	30 ± 11	26 ± 15	32 ± 27
- change from 48 h	-5 ± 9	-7 ± 8	0 ± 9
EDV (µL)	692 ± 132	637 ± 151	780 ± 232
- change from 48 h	280 ± 113	241 ± 158	339 ± 212
ESV (µL)	432 ± 120	379 ± 149	530 ± 210
- change from 48 h	193 ± 99	149 ± 145	273 ± 174
EF (%)	38 ± 5	42 ± 8	34 ± 10
- change from 48 h	-4 ± 6	0 ± 8	-9 ± 6

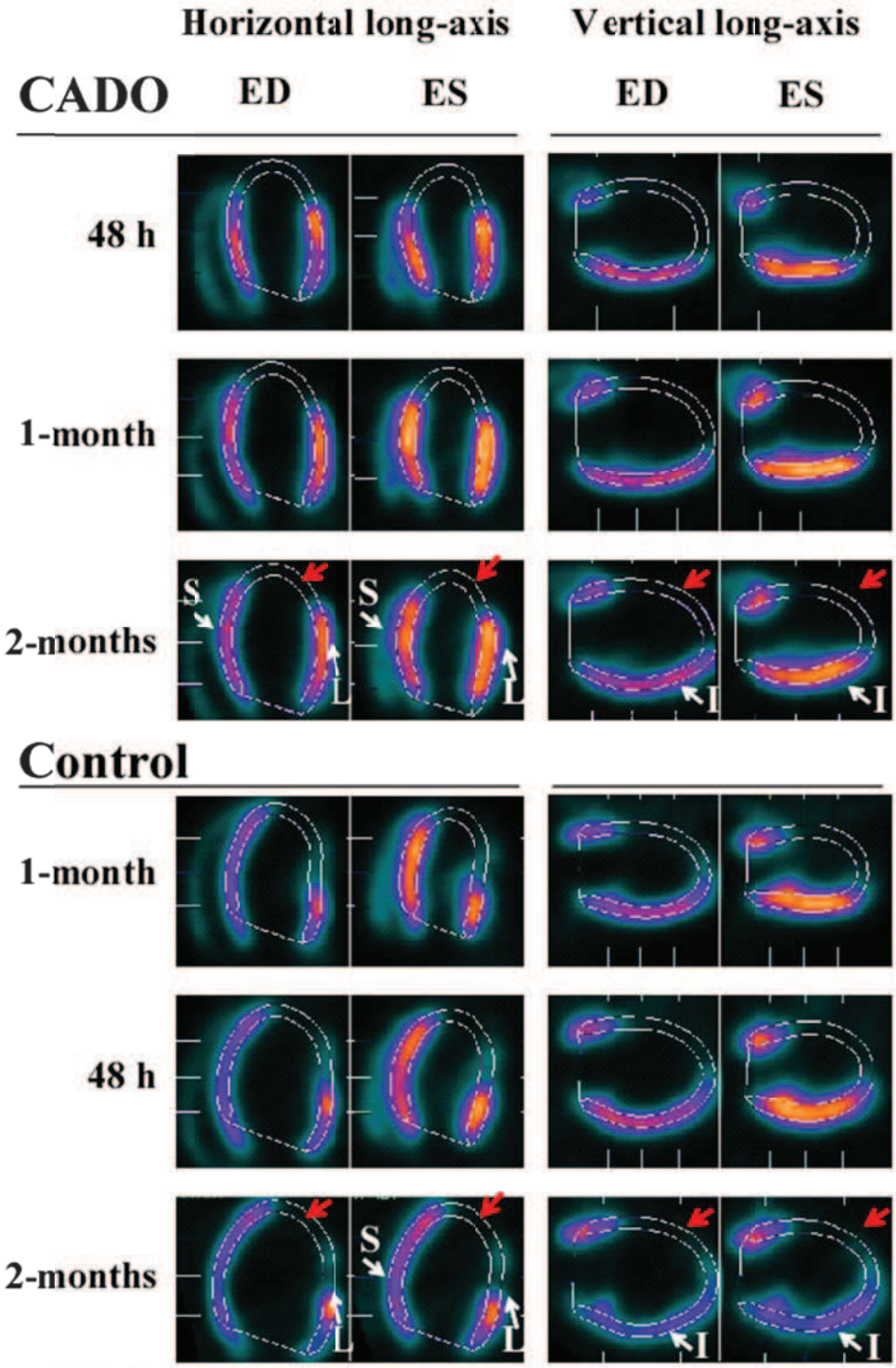

Horizontal long-axis
Vertical long-axis
CADO
ED
ES
ED
ES
48 h
1-month
2-months
S
L
S
L
I
I
Control
1-month
48 h
2-months
S
L
L
I
I

Figure 1

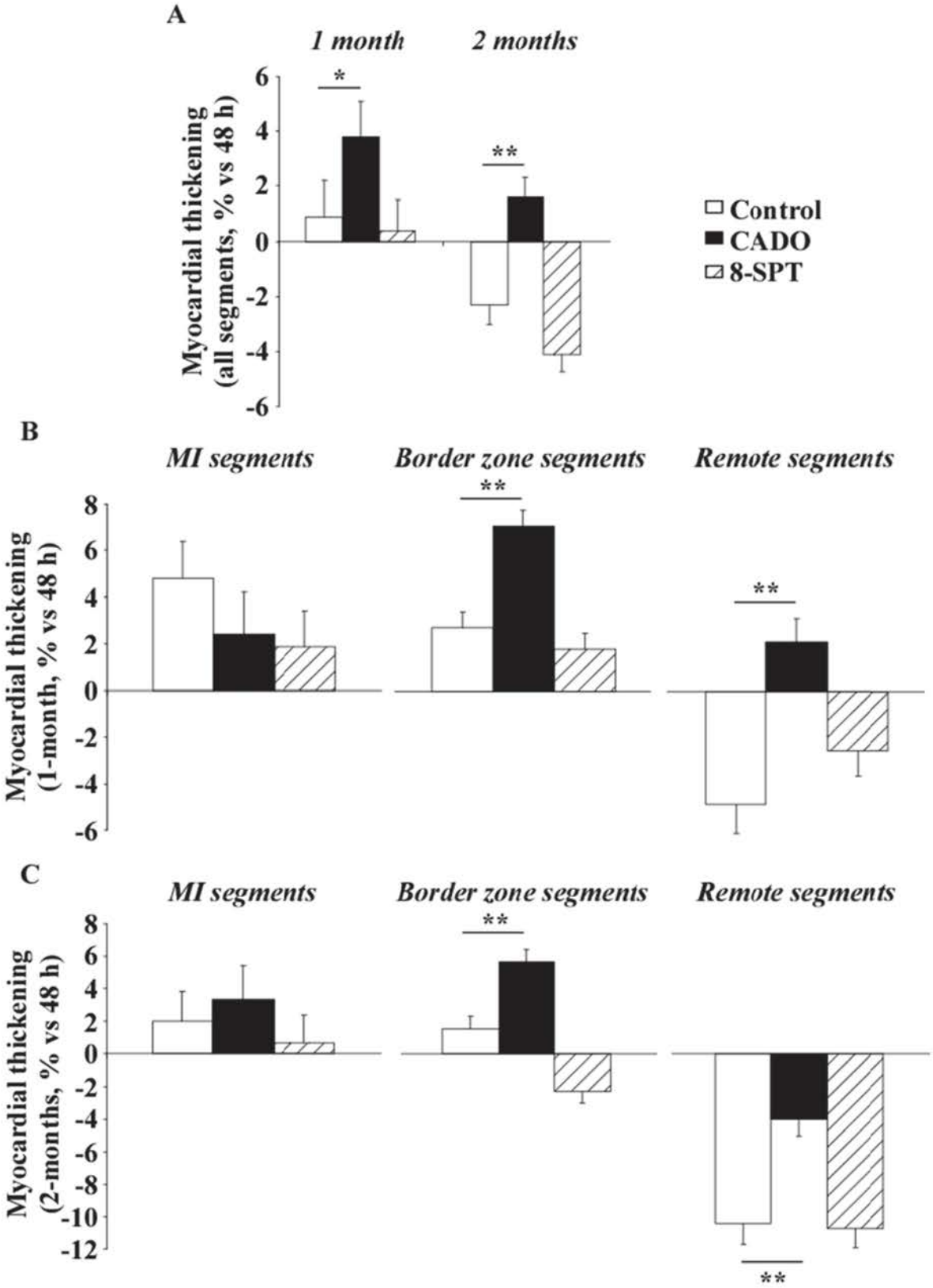

A
1 month
2 months
Myocardial thickening
(all segments, % vs 48 h)
6
4
2
0
-2
-4
-6
*
**
Control
CADO
8-SPT
B
MI segments
Border zone segments
Remote segments
Myocardial thickening
(1-month, % vs 48 h)
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
**
**
C
MI segments
Border zone segments
Remote segments
Myocardial thickening
(2-months, % vs 48 h)
8
6
4
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
**
**

Figure 2

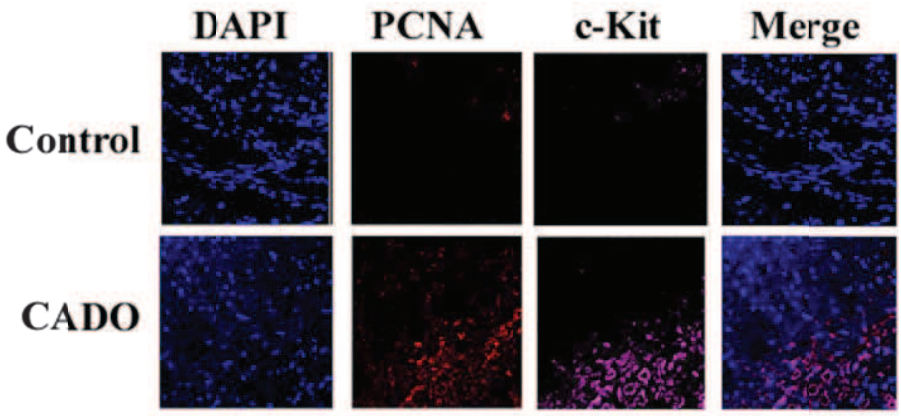


Figure 3

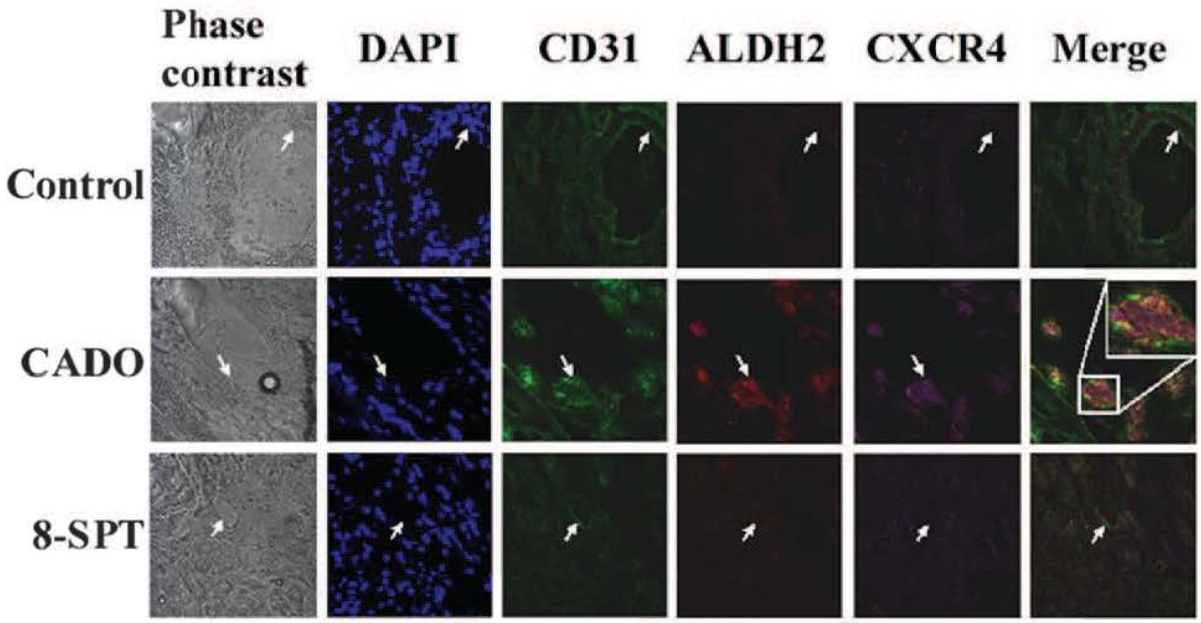

Phase contrast
DAPI
CD31
ALDH2
CXCR4
Merge
Control
CADO
8-SPT

Figure 4

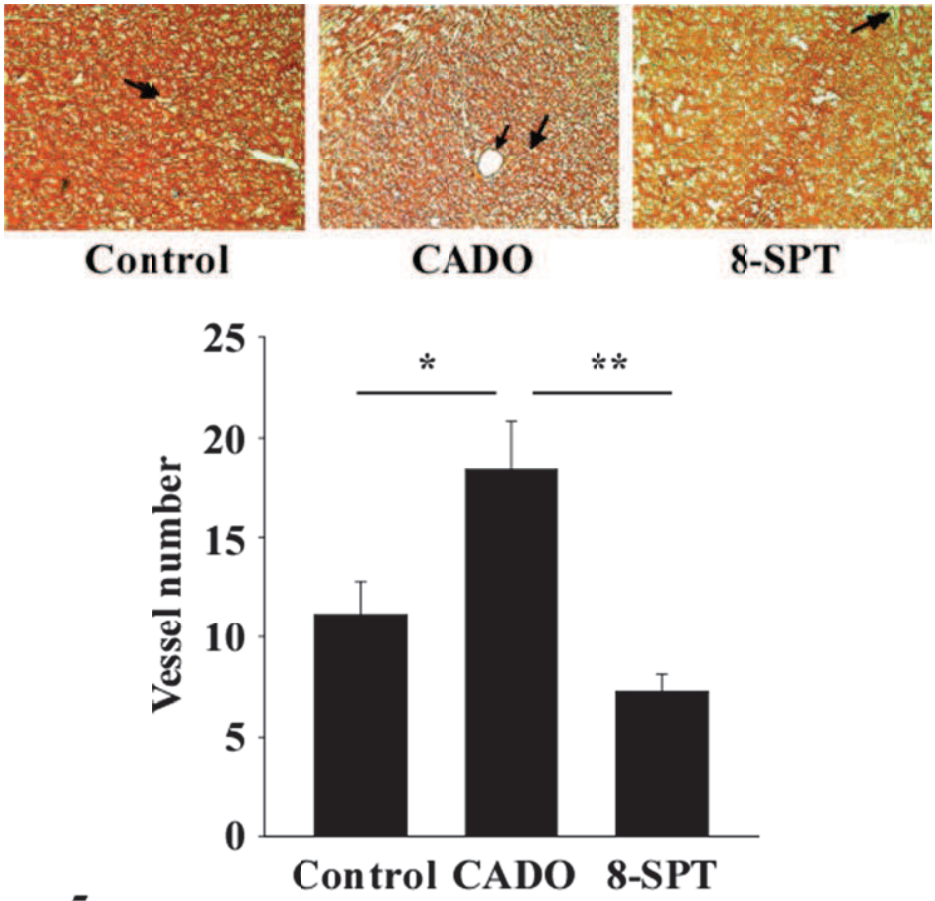

Control
CADO
8-SPT
Vessel number
25
20
15
10
5
0
*
**
Control
CADO
8-SPT

Figure 5

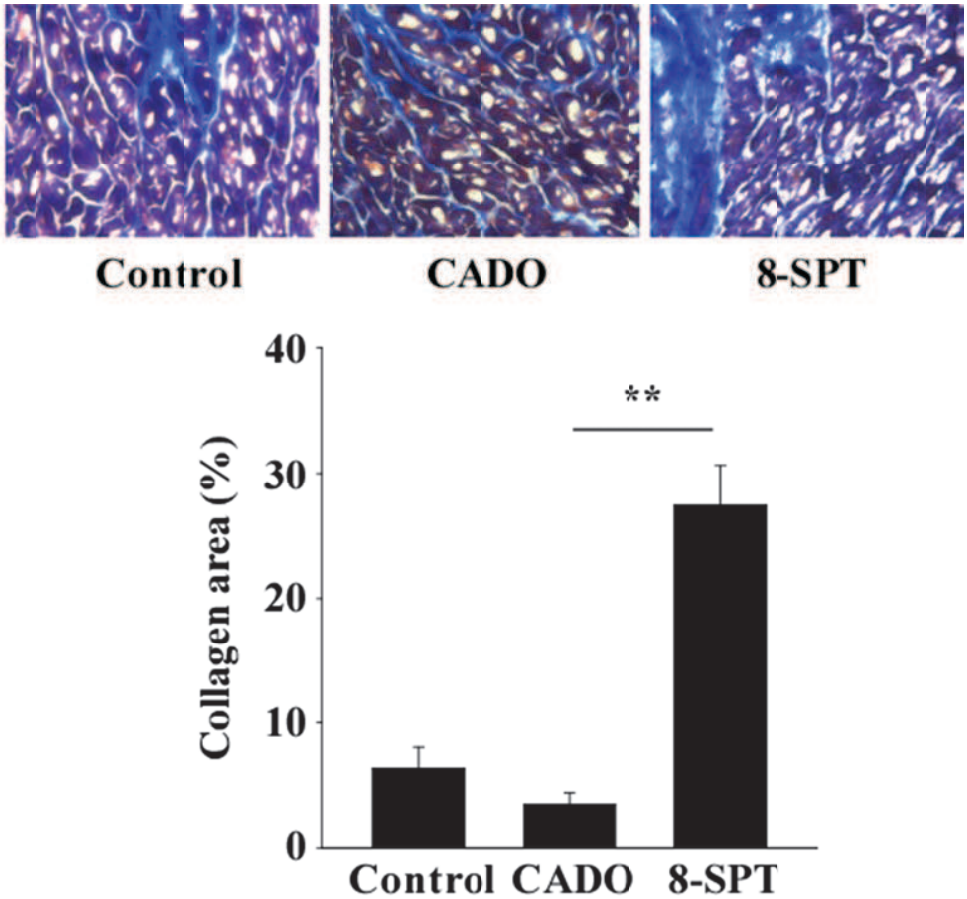
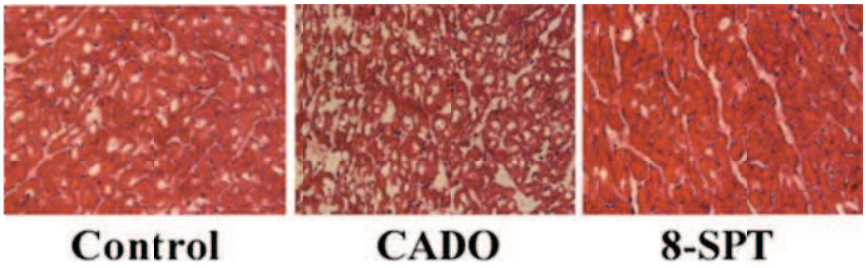

Control
CADO
8-SPT
Collagen area (%)
40
30
20
10
0
**
Control
CADO
8-SPT

Figure 6


Control
CADO
8-SPT

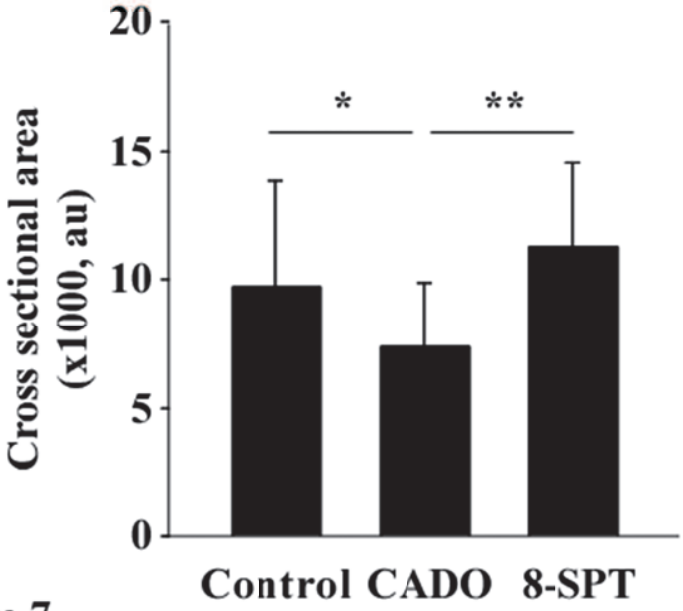

Cross sectional area
(x1000, au)
20
15
10
5
0
*
**
Control
CADO
8-SPT

Figure 7

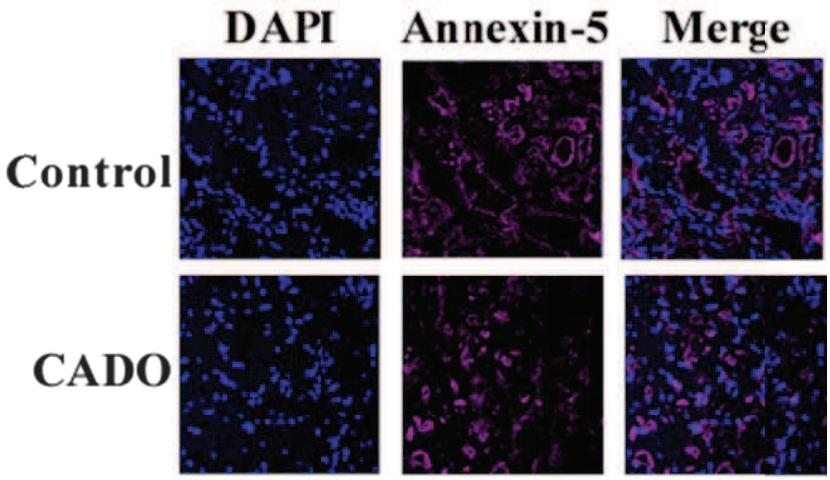


Figure 8

Etude n°4: La Monocyte Chemotactic Protein 3 stimule la migration des cellules endothéliales progénitrices et induit l'angiogenèse

Les cellules endothéliales progénitrices sont impliquées dans la revascularisation des zones ischémiées du cœur après IDM[93-96]. Le mécanisme mis en jeu dans leur recrutement depuis la moelle osseuse est partiellement connu. L'axe CXCR4/SDF-1α est bien décrit dans la littérature, mais on peine à expliquer pourquoi son blocage n'empêche que partiellement la migration des cellules souches mésenchymateuses (MSC), dont les EPC font partie. Schenk et al. [178] ont montré que la MCP3 régulait aussi la migration des MSC. La MCP3 est une chimiokine très active qui se lie à 3 récepteurs: CCR1, CCR2 et CCR3. Ses cellules cibles sont très vastes et incluent la plupart des leucocytes[179-181]. Son expression augmente dans le cœur de rat après ischémie et participe au recrutement des cellules progénitrices $CD34^{+}$[182]. De plus, la MCP3 est impliquée dans la mobilisation des monocytes vers les sites inflammatoires chez la souris[181].

Dans cette étude, nous avons testé l'hypothèse que la MCP3 pourrait participer à la mobilisation des EPC, et pourrait par conséquent jouer un rôle dans l'angiogenèse.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

-In vitro, la MCP3 stimulait la migration des EPC de façon dose dépendante. L'effet était significatif à partir de 10ng/mL et maximal à 25ng/mL (200% d'augmentation de la migration).

-La cytométrie en flux a montré que les EPC exprimaient de façon significative le CCR1 et de façon moindre le CCR2 et le CCR3. Ces résultats ont été confirmés par PCR quantitative.

-La migration des EPC selon la MCP3 était bloquée par 10µg/mL d'un anticorps neutralisant le CCR1.

-Les EPC ne produisaient pas de MCP3, ce qui laisse à penser que la migration des EPC vers la MCP3 se faisait par un mécanisme paracrine.

-La production de MCP3 a été mesurée chez différents types de cellules cardiaques. Les fibroblastes, myofibroblastes et macrophages produisaient la MCP3. De plus, les macrophages produisaient 10 fois plus de MCP3 que les fibroblastes. Ces résultats ont donc suggéré que les macrophages cardiaques pourraient participer au recrutement les EPC.

-Les macrophages non activés produisaient peu de MCP3. En revanche, cette production était accrue lorsque les macrophages était activés. Le Toll-Like Receptor 4 (TLR4) est le récepteur majeur de l'activation des macrophages. Parmi les différents ligands du TLR4, on retrouve deux agonistes endogènes issus de la dégradation de la matrice extracellulaire, l'héparan sulfate (HS) et l'acide hyaluronique (HY). Parmi ces deux activateurs, l'HS a induit une augmentation significative de la production de MCP3 par les macrophages (5 fois, P=0.03).

-La migration des EPC était augmentée par du milieu conditionné de macrophages stimulés pendant 24 heures avec 100µg/mL d'HS, suggérant que la présence de macrophages sur les sites inflammatoires constitue une source importante de MCP3, contribuant ainsi à la migration des EPC.

-Seule une faible partie de la migration des EPC était inhibée par le blocage du CCR1 (18%). Ceci a suggéré que d'autres chimiokines, se liant à d'autres récepteurs que le CCR1, seraient impliquées dans le recrutement des EPC par le milieu conditionné de macrophages activés.

-Des analyses par microarrays ont révélé que ces cellules expriment le CCR7 de façon non négligeable. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'effet de son ligand, la *Macrophage Inflammatory Protein 3ß* (MIP3ß), sur la chimiotaxie des EPC.

-La MIP3ß recombinante a induit une légère migration des EPC (140% d'augmentation). Cet effet était bloqué par un anticorps anti-CCR7.

-La MIP3ß était produite par les macrophages activés à l'HS (0,25 ng/mL). La concentration de cette chimiokine restait néanmoins 10 fois inférieure à celle de la MCP3 dans les milieux conditionnés de macrophages.

-La migration des EPC vers le milieu conditionné de macrophages activés était légèrement inhibée par un anticorps anti-CCR7. Par contre, l'incubation des cellules avec

l'anti-CCR1 et l'anti-CCR7 n'a pas montré d'effet additionnel ou synergique de ces 2 anticorps.

-Dans le modèle de Matrigel *Plug* chez la souris, la MCP3 (100ng/mL) stimulait l'angiogenèse (2.5 fois). Cet effet était annulé par le blocage du CCR1. Les microvaisseaux formés étaient positifs pour le CD31. Cette observation a montré le caractère endothélial et donc le phénotype vasculaire de ces vaisseaux nouvellement formés.

Cette étude a donc montré que la MCP3 stimule la migration des EPC et induit l'angiogenèse. Cet effet passe par l'activation du CCR1. Ces résultats suggèrent l'utilisation de la MCP3 pour stimuler la revascularisation du cœur ischémié après IDM, en combinaison ou non d'une thérapie cellulaire impliquant les EPC.

Cardiovascular Research (2012) **94**, 519–525
doi:10.1093/cvr/cvs140

Monocyte chemotactic protein 3 is a homing factor for circulating angiogenic cells

Mélanie Bousquenaud[1], Chantal Schwartz[1], Frédérique Léonard[1], Magali Rolland-Turner[1], Daniel Wagner[1,2], and Yvan Devaux[1]*

[1]Laboratory of Cardiovascular Research, Centre de Recherche Public-Santé, 120 route d'Arlon, L1150 Luxembourg, Luxembourg; and [2]Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg, Luxembourg

Received 8 February 2012; revised 7 March 2012; accepted 29 March 2012; online publish-ahead-of-print 4 April 2012

Time for primary review: 18 days

Aims Circulating angiogenic cells (CAC) participate in cardiac repair. CAC recruitment to the ischaemic heart is mainly induced by the chemokine (C–X–C motif) receptor 4 (CXCR4)/stromal-cell derived factor-1α axis. However, CAC mobilization is only partly prevented by CXCR4 blockade, indicating that other mechanisms are involved. Since the expression of monocyte chemotactic protein 3 (MCP3) is increased in ischaemic hearts, we hypothesized that it may participate in CAC mobilization.

Methods and results CAC were obtained from peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers. *In vitro* migration of CAC was concentration-dependently increased by recombinant MCP3 (one-fold increase, $P = 0.001$), and this effect was inhibited by antibodies neutralizing the chemokine (C–C motif) receptor 1 (CCR1). CCR1 expression at the surface of CAC was confirmed by flow cytometry. Conditioned medium from heparan sulfate-activated macrophages, which contained MCP3, induced the migration of CAC (one-fold increase, $P = 0.01$). This increase was partly inhibited by CCR1 antibodies. The migration of CAC was also stimulated by macrophage inflammatory protein 3β. This effect was blocked by CCR7 antibodies and was of lower magnitude than that of MCP3. MCP3 induced the formation of blood vessels in Matrigel plugs implanted in mice (1.5-fold increase, $P < 0.001$). This effect was abrogated by anti-CCR1 antibodies.

Conclusion This study shows that MCP3 stimulates the migration of CAC and angiogenesis, suggesting that MCP3 may be useful to improve cardiac repair.

Keywords Cardiac repair • Stem cells • Angiogenesis • Chemokine

1. Introduction

Mesenchymal stem cells (MSC) have a great therapeutic potential in a number of disease states such as cardiovascular pathologies. Among other subsets of MSC, circulating angiogenic cells (CAC) participate in cardiac repair after ischaemia through revascularization of ischaemic areas of the myocardium.[1–4] However, little is known about how CAC are recruited to the injured sites.

The recruitment of MSC is a sequential process, involving first their mobilization from the bone marrow through rupture of the chemokine (C–X–C motif) receptor 4 (CXCR4)/stromal-cell derived factor-1α (SDF1α) axis and then their migration to sites of injury through chemotaxis. Whereas the CXCR4/SDF1α axis is known to mediate both steps of this process, it is unclear why blocking CXCR4 only partly prevents MSC migration.[5] Schenk *et al.*[6] observed that monocyte chemotactic protein 3 (MCP3/CCL7) also regulates MSC migration. The chemokine MCP3 is one of the most broadly active chemoattractants which recognizes three different chemokine (C–C motif) receptors, CCR1, CCR2, and CCR3. MCP3 has a very broad range of target cells, including most of the leucocytes (monocytes, eosinophils, basophils, NK cells, T lymphocytes, and neutrophils).[7–9] Interestingly, MCP3 expression is increased in rat hearts after ischaemia and participates in the recruitment of CD34+ bone marrow progenitors to the ischaemic myocardium.[10] Moreover, MCP3 orchestrates monocyte mobilization to inflammatory sites.[9]

We hypothesized that MCP3 may participate in CAC mobilization. Using both *in vitro* and *in vivo* approaches, we demonstrate that MCP3 induces CAC migration and angiogenesis.

* Corresponding author. Tel: +352 26970300; fax: +352 26970396, Email: yvan.devaux@crp-sante.lu

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2012. For permissions please email: journals.permissions@oup.com.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at BibliothÃ¨que nationale de Luxembourg on May 18, 2012

2. Methods

2.1 Cell culture

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from the venous blood of healthy volunteers through separation on a Ficoll gradient using Leucosep tubes (Greiner, Wemmel, Belgium). The investigation conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Approval has been granted by the national Ethics Committee and an informed consent was obtained from each donor. CAC were obtained from PBMC as described previously.[11,12] Briefly, 8×10^6 PBMC were seeded onto human fibronectin (2.5 $\mu g/cm^2$)-coated six-well plates and cultured in EBM media supplemented with brain bovine extract, human recombinant endothelial growth factor, hydrocortisone, gentamicin, amphotericin B, and 20% foetal calf serum (FCS; Lonza, Verviers, Belgium). After 3 days, non-adherent cells were discarded and adherent cells were cultured another 24 h. CAC were positive for classical CAC markers and were double-positive for endothelial-specific lectin and Dil-labelled acetylated low-density lipoproteins.

Primary monocytes were purified from PBMC by negative selection using the Monocyte Isolation Kit II (Myltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) and differentiated to macrophages with macrophage colony-stimulating factor for 7 days prior to treatment with heparan sulfate (HS), hyaluronic acid (HY) or lipopolysaccharide (LPS) for 24 h.

Primary human coronary artery endothelial cells (HCAEC) and human microvascular endothelial cells (HMVEC) were cultured following the manufacturer's recommendations (Lonza). Human cardiac fibroblasts were purchased from TCS CellWorks Ltd (Buckingham, UK). Myofibroblasts were obtained by differentiation of fibroblasts with transforming growth factor-β (10 ng/mL) for 24 h.

2.2 Flow cytometry

Cells were harvested in non-enzymatic cell dissociation solution and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS, Lonza) supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA). Two lakh cells were treated with the appropriate amount of Fc-blocking reagent (Miltenyi, Utrecht, The Netherlands) and stained thereafter with specific antibodies or the corresponding isotype control in 50 μL PBS−1% BSA for 30 min at 4°C. If required, cells were fixed using the commercial BD FACS lysis solution according to the manufacturer's instructions. Antibodies used were: mouse monoclonal anti-CCR1 (IgG2b-PE clone 53504, R&D System, Oxon, UK), mouse monoclonal anti-CCR2 (IgG2b-Alexa 647 clone 12G5, BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), and mouse monoclonal anti-CCR3 (IgG2a-APC clone 61828, R&D System). Twenty thousand to 40 000 events were acquired on a BD FACSCanto™ flow cytometer and analysed with the FACSDiva™ software (BD Biosciences). Overlays were obtained using FlowJo 7.2.4 software.

2.3 Real-time polymerase chain reaction

Total RNA was isolated using TriReagent and the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was reverse transcribed using the Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Merelbeke, Belgium). Polymerase chain reaction (PCR) was performed using the iCycler and the IQ™ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Nazareth, Belgium). PCR primer sequences are available upon request. Expression levels were calculated by the $2^{\Delta Ct}$ method with β-actin as a housekeeping gene.

2.4 Chemotactic assay

Chemotaxis experiments were performed in Costar® Transwell™ permeable supports with polycarbonate 5 μm pore size membranes (VWR, Leuven, BE). All experiments were carried out in antibiotic-free CAC medium with 5% FCS. A cell suspension of 1.8×10^6 cells/mL of CAC was generated and 100 μL aliquots were distributed in the upper chambers of the Transwell™ permeable supports (180 000 cells/well) or previously incubated for 30 min at 37°C with 10 μg/mL of anti-CCR1 (clone 53504, R&D System) and/or anti-CCR7 (clone 150503, R&D System) neutralizing antibodies. The loaded chambers were then transferred to a 24-well plate containing MCP3 or macrophage inflammatory protein 3β (MIP3β, 0−100 ng/mL). Recombinant human MCP3 and MIP3β were obtained from Peprotech (London, UK). The level of contaminating endotoxin was <0.1 ng/μg. In some experiments, recombinant chemokines were replaced by conditioned medium from primary macrophages treated by 100 μg/mL HS for 24 h in the same medium that was used to culture CAC. After 6 h at 37°C 5% CO_2, cell migration was evaluated by lysis and DNA staining of cells that crossed the membrane with the CyQUANT dye (Invitrogen). Fluorescence was measured with the POLARstar OPTIMA (BMG Labtech) using excitation at 480 nm and emission at 520 nm.

2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay

MCP3 concentrations were measured by the CCL7 Quantikine® Colorimetric Sandwich ELISA (R&D Systems). The detection limit of the assay was 1 pg/mL. MIP3β concentrations were measured by the CCL19/MIP3β DuoSet® Colorimetric Sandwich ELISA (R&D System). The detection limit of the assay was 4 pg/mL.

2.6 Animals

This study was conducted in accordance with the regulations of the Animal Welfare Act of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and protocols were approved by the Regional Veterinary Department ('Direction Départementale de la Protection des Populations'), agreements RAR1A03516811825 and 54-100. Seventeen adult C57BL6 mice (Charles Rivers Laboratories; 8- to 11-weeks old) were enrolled.

2.7 *In vivo* Matrigel™ plug assay

Growth Factor-Reduced Matrigel™ (18−22 mg/mL; 500 μL/mouse) (BD Biosciences) was mixed with 100 ng/mL of MCP3 on ice and was injected subcutaneously into the left and right lower abdominal side of nine mice. Six control animals were injected with 500 μL of Matrigel™ containing 50 μL of vehicle. Twenty units of heparin (Tocris Bioscience, Bristol, UK) per plug were used as an anti-coagulant. Each mouse was thoroughly anaesthetized using gaseous isoflurane (3%) before the injection of Matrigel™. The effectiveness of anaesthesia was verified with the loss of footpad reflex. To inhibit angiogenesis, mice were injected with neutralizing antibodies against CCR1 (33 μg per mouse, R&D Systems Europe, Oxon Abingdon, UK) or the isotype control Sheep IgG (Abcam, Cambridge, UK) on days 1, 3, and 6. Control animals were injected with NaCl. On day 7, mice were sacrificed by pentobarbital overdose (200 mg/kg). The plugs were dissected from the abdomen and placed in 3.7% formaldehyde/PBS at room temperature for 2 days. The plugs were sectioned at 5 μm, stained with haematoxylin and eosin, and examined under microscope at ×400 magnification. Microvessels visible at least 50 μm from a native tissue edge were considered to be newly created and not part of those pre-existing in native tissue. A microvessel was defined as a ring or cylindrical structure with an internal endothelial cell lining. Branched microvessels were counted as one less than the number of arms (i.e. a y-shaped structure would be counted as two).

Quantification of microvessels was performed on each whole slice, using ×100 magnification. Two sections per plug were assessed for histological analysis (at one extremity and in the middle of the sections series). To assess CAC recruitment responsible for the neovascularization, we performed immunohistochemical staining for CD31 (mouse monoclonal IgG1, P2B1, Abcam) on two representative slices of each group. Alexa Fluor®488-coupled donkey anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch, UK) was used as a secondary antibody. Images were recorded

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at BibliothÃ¨que nationale de Luxembourg on May 18, 2012

on a confocal microscope (Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510) with a ×400 magnification using the LSM 510 META software. Nuclear staining was performed using DAPI (blue).

2.8 Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SD. Comparisons between the means of two groups were performed with the *t*-test for Gaussian data or the Mann–Whitney test for non-Gaussian data. Data normality was assessed with the Shapiro–Wilk test. Comparisons between multiple groups were performed with one-way ANOVA. A pairwise multiple comparison procedure (Holm–Sidak method) was used to isolate groups that differ from each other. All tests were two-tailed. The SigmaPlot v11.0 software was used for statistical analysis.

3. Results

3.1 Chemotactic migration of CAC is induced by MCP3

Transwell experiments were undertaken to evaluate the capacity of CAC to migrate along a gradient of MCP3. As shown in *Figure 1*, MCP3 concentration-dependently stimulated the migration of CAC ($P = 0.01$). The effect was significant for concentrations of MCP3 from 10 ng/mL and was maximal with 25 ng/mL MCP3 (one-fold increase, $P = 0.001$).

Since the MCP3 protein used in this study was a recombinant protein purified from cultures of *Escherichia coli*, we verified that the migration was effectively due to MCP3 and not to contaminating endotoxin. The migration of CAC was unaffected by 0.01, 1, and 100 ng/mL LPS (data not shown).

3.2 The migration of CAC induced by MCP3 involves CCR1

Using flow cytometry, we observed that among the three known MCP3 receptors, CCR1, but not CCR2 or CCR3, was markedly expressed at the surface of CAC (*Figure 2A*). It has to be noted that a very small population of CAC also expressed CCR2, and to a still lesser extent CCR3 (see arrows in *Figure 2A*). The relative distribution of MCP3 receptors, as assessed by quantitative PCR, was as follows: CCR1 > CCR2 > CCR3 (*Figure 2B*). Since CCR1 was the predominant receptor (76%), we tested its involvement in the migration of CAC induced by MCP3. As shown in *Figure 2C*, MCP3 concentration-dependently increased the migration of CAC ($P < 0.001$), and this effect was abrogated by the pre-treatment of CAC with 10 μg/mL of anti-CCR1 antibodies ($P = 0.37$). These results show that CCR1 mediates the stimulation of CAC migration by MCP3.

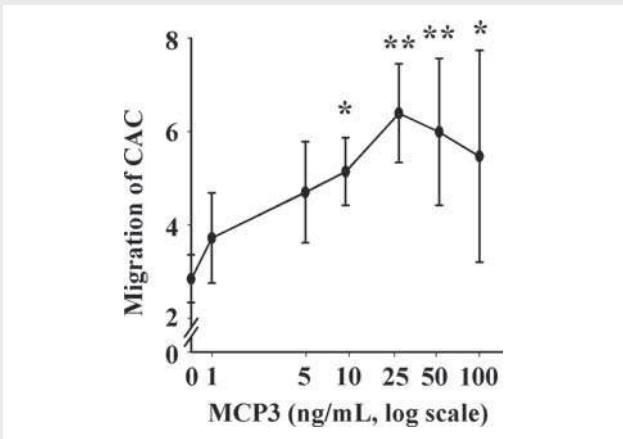


Figure 1 MCP3 stimulates CAC migration. CAC purified from PBMC were seeded on the top of Transwell membranes and recombinant MCP3 was added in the bottom compartment. CAC that crossed the membrane were stained with the CyQUANT dye and fluorescence was quantified. Migration is expressed as fluorescence intensity ($\times 10^4$). Results are mean ± SD ($n = 4$). $^*P < 0.05$ vs. control; $^{**}P < 0.005$ vs. control. The concentration-dependent effect of MCP3 was significant (ANOVA, $P = 0.01$).

3.3 The migration of CAC induced by MCP3 is a paracrine mechanism

Measured by ELISA, MCP3 was barely detectable in the conditioned medium of CAC (*Figure 3A*). In addition, the intracellular expression of MCP3 was undetectable by flow cytometry (data not shown). Therefore, we investigated the production of MCP3 by cardiac and inflammatory cells. Fibroblasts, myofibroblasts, and macrophages—but not vascular endothelial cells—produced MCP3. The secretion of MCP3 by macrophages was more than 10-fold higher than by fibroblasts (*Figure 3A*).

3.4 Macrophages produce MCP3 upon activation

Having observed that a concentration of 10 ng/mL MCP3 is necessary to trigger CAC migration (*Figure 1*) and that conditioned medium from resting macrophages contained only 3.5 ng/mL MCP3 (*Figure 3A*), we concluded that macrophages may have to be activated to produce MCP3 in sufficient quantity to induce CAC migration. Since the toll-like receptor 4 is activated in macrophages during cardiac ischaemia and inflammation, we evaluated the effect of several ligands of this receptor on MCP3 production. We used one ligand of bacterial origin (LPS), and two ligands produced in the injured heart by extracellular matrix breakdown, HS[13] and HY.[14] As shown in *Figure 3B*, only HS up-regulated MCP3 production (five-fold increase, $P = 0.03$). After 24 h, conditioned medium from HS-treated macrophages contained on average 20 ng/mL MCP3, a concentration sufficient to stimulate CAC migration.

3.5 Conditioned medium from activated macrophages stimulates the migration of CAC

Next, we assessed the migration of CAC in response to conditioned medium from HS-treated macrophages. Macrophages were treated for 24 h with 100 μg/mL HS, and the increase in the MCP3 level in conditioned medium was verified before performing migration assays. As shown in *Figure 3C*, the migration of CAC was increased upon exposure to conditioned medium from HS-treated macrophages (one-fold increase, $P = 0.01$). Then, CAC were pre-incubated with 10 μg/mL of anti-CCR1 antibodies before seeding in the Transwell. Only a modest inhibition of CAC migration was observed after CCR1 blockade (−18%, $P = 0.32$; *Figure 3C*).

3.6 MIP3β is a weak inducer of the migration of CAC

We investigated whether other chemokines could also regulate CAC migration. Of note, SDF1α was undetectable in conditioned

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at BibliothÃ¨que nationale de Luxembourg on May 18, 2012

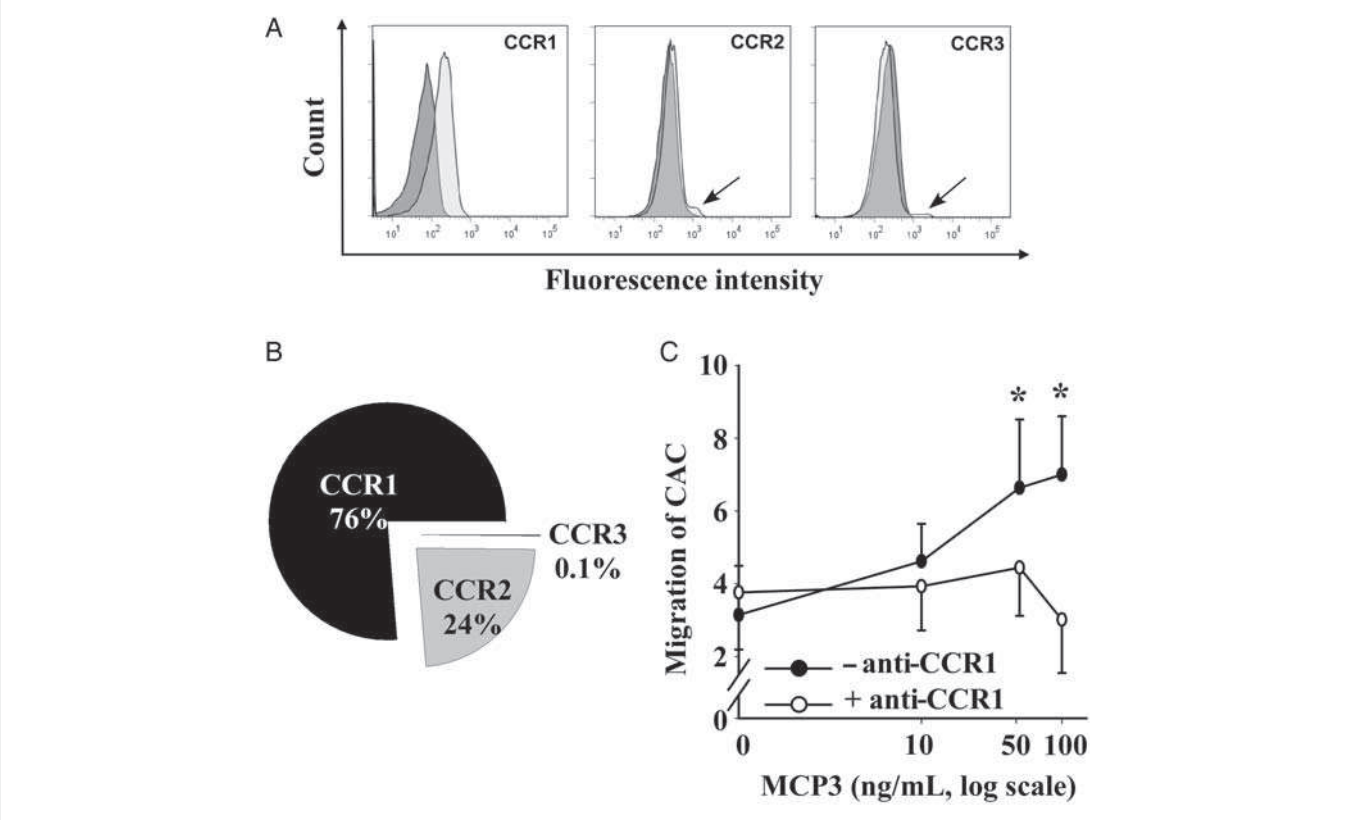


Figure 2 MCP3-induced migration of CAC relies on CCR1. (*A*) Expression profile of MCP3 receptors at the surface of CAC was characterized by flow cytometry. Histograms show that CAC express CCR1, and to a much lesser extent CCR2 and CCR3 receptors (arrows). Light grey: specific staining. Dark grey: isotype controls. (*B*) Relative mRNA expression of MCP3 receptors as assessed by quantitative PCR: CCR1 > CCR2 > CCR3. Expression levels were normalized to β-actin. Pie-chart was obtained with the relative abundance of each receptor from three independent cultures of CAC. (*C*) CAC pre-treated with 10 μg/mL of CCR1-blocking antibodies (open circles) or vehicle (closed circles) were evaluated for their capacity to migrate along a gradient of MCP3 in Transwell assay. The migration of CAC was quantified as in *Figure 1*. Values are mean ± SD ($n = 6$). *$P < 0.001$ vs. control. The concentration-dependent effect of MCP3 was significant (ANOVA, $P < 0.001$).

medium from activated macrophages (data not shown). Using microarrays (data not shown), we found that in addition to CCR1 and CXCR4, the chemokine receptor CCR7 was also expressed by CAC, although to a lower extent than CXCR4 and CCR1. It is known that MIP3β binds to CCR7 and triggers the chemotaxis of haematopoietic progenitor cells.[15] The migration of CAC towards purified MIP3β was enhanced ($P = 0.03$; *Figure 4A*). The effect of MIP3β on cell migration was less important than the effect of MCP3 shown in *Figure 1* (140% increase in migration for MIP3β compared with 200% for MCP3) and was achieved at higher concentrations (*Figure 4A*). The effect of MIP3β was blocked by anti-CCR7 antibodies. MIP3β was weakly produced by macrophages and highly up-regulated upon stimulation with HS (*Figure 4B*). However, the highest concentration of MIP3β was still much lower (<0.5 ng/mL) than the concentration of MCP3 obtained after HS treatment (20 ng/mL; *Figure 3B*). When conditioned medium from HS-treated macrophages was used in migration assays, only a modest inhibitory effect of anti-CCR7 antibodies was observed. The concomitant administration of anti-CCR1 and anti-CCR7 antibodies did not induce a significant additional or synergistic effect (*Figure 4C*). Taken together, these results suggest that MCP3 is a stronger stimulus of CAC migration than MIP3β.

3.7 MCP3 induces angiogenesis

We used the Matrigel™ plug assay to test whether MCP3 stimulates CAC recruitment *in vivo* and is able to induce angiogenesis. Mice were subcutaneously implanted with 500 μL of Matrigel™ containing 100 ng/mL MCP3 or vehicle. To assess the implication of CCR1, mice received three injections of anti-CCR1 antibodies (33 μg/mouse) or isotype control. After 1 week, mice were sacrificed and plug sections were analysed. In plugs containing MCP3, we observed a significant increase in the development of microvessels (*Figure 5A*). Counting of microvessels revealed a 1.5-fold increase in the microvessel number ($P < 0.001$). The neutralization of CCR1 severely inhibited microvessel formation induced by MCP3. Microvessels were positive for the endothelial marker CD31, confirming their vascular phenotype (*Figure 5B*). These results demonstrate that MCP3 stimulates angiogenesis *in vivo* through the activation of CCR1.

4. Discussion

In this study, we have demonstrated that MCP3 stimulates the migration of CAC, thereby inducing angiogenesis. This observation may have important implications when considering cell therapy for the ischaemic heart.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at BibliothÃ¨que nationale de Luxembourg on May 18, 2012

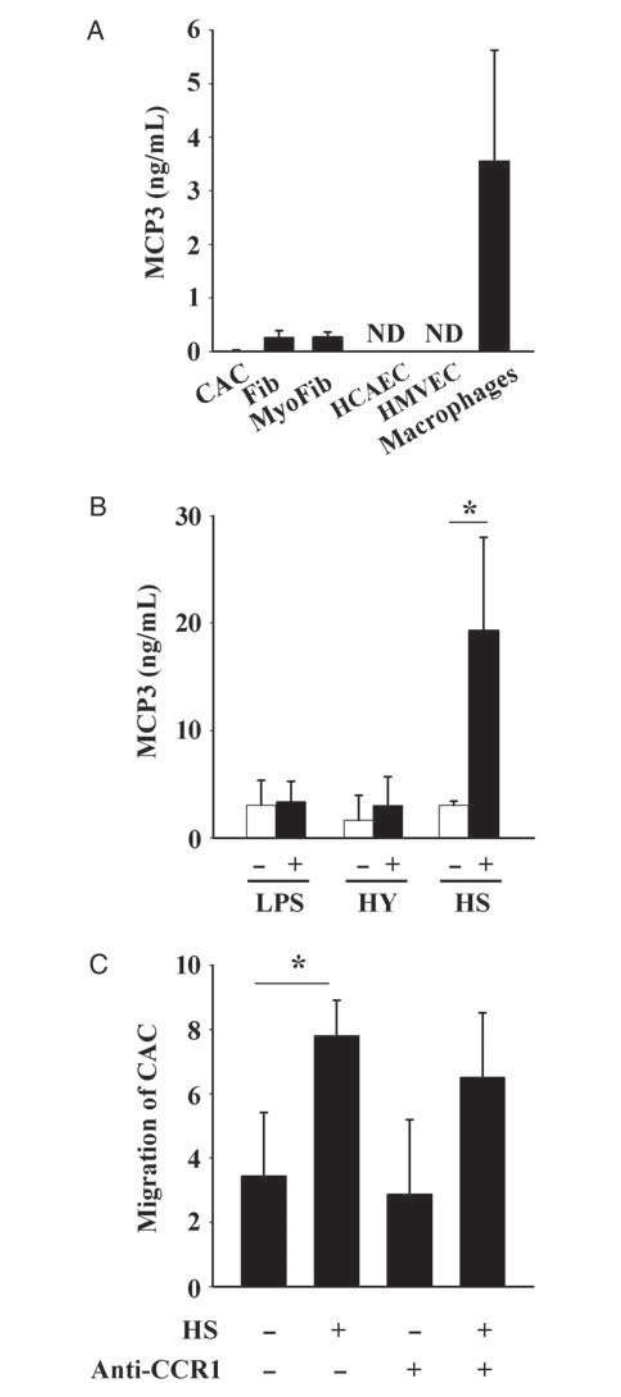


Figure 3 Macrophages produce MCP3 and stimulate CAC chemotaxis. (*A*) Concentration of MCP3 in culture supernatants of CAC, human primary fibroblasts (Fib), myofibroblasts (MyoFib), HCAEC, HMVEC, and primary macrophages. Cells were maintained in culture for 24 h and MCP3 was quantified by ELISA. ND, not detectable. (*B*) Human primary macrophages were treated with LPS (100 ng/mL), HS (100 μg/mL), or HY (50 μg/mL) for 24 h. Conditioned media were assessed for MCP3 content by ELISA. (*C*) The migration of CAC was tested in the presence of conditioned medium from macrophages treated with 100 μg/mL HS or vehicle for 24 h. Prior to migration, CAC were treated with 10 μg/mL anti-CCR1 blocking antibodies or vehicle. The migration of CAC was assessed in Transwell assay and quantified as in *Figure 1*. Results are mean ± SD ($n \geq 3$). $^{*}P < 0.05$.

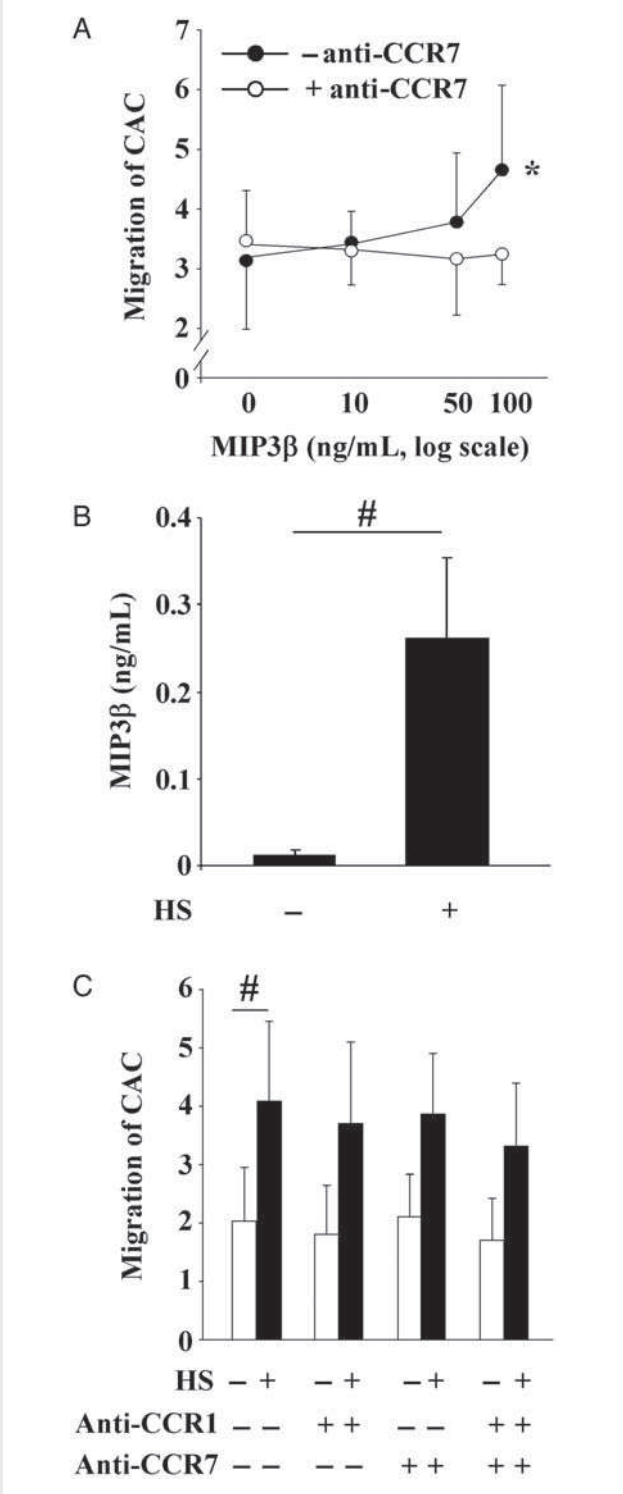


Figure 4 MIP3β is a weak inducer of CAC migration. (*A*) The migration of CAC towards recombinant MIP3β was assessed as described in *Figure 1*, with or without pre-incubation with 10 μg/mL of anti-CCR7 antibody. (*B*) The concentration of MIP3β was measured by ELISA in conditioned medium of macrophages incubated with 100 μg/mL HS during 24 h. (*C*) The migration of CAC was assessed towards conditioned media from HS-activated macrophages, after incubation with neutralizing antibodies against CCR1 and/or CCR7. Values are mean ± SD ($n = 7$ for *A*, $n = 4$ for *B*, and $n = 8$ for *C*). $^{*}P < 0.05$ (ANOVA); $^{\#}P < 0.005$.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at BibliothÃ¨que nationale de Luxembourg on May 18, 2012

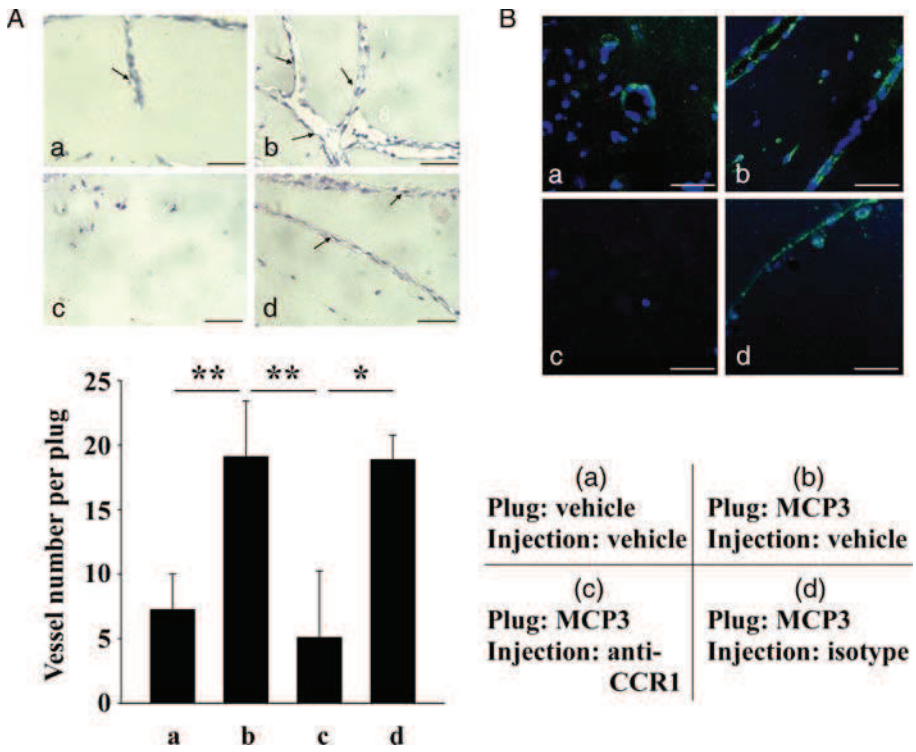


Figure 5 MCP3 induces angiogenesis *in vivo*. Matrigel plugs containing 100 ng/mL MCP3 or vehicle were implanted in mice, injected intraperitoneally with anti-CCR1 antibodies (33 μg/mouse) or isotype control ($n = 3$ mice per group, 2 plugs per mouse). Seven days after implantation, mice were sacrificed and Matrigel plugs were harvested. (*A*) Top panel: haematoxylin and eosin staining showing microvessels formation in plugs. Bottom panel: quantification of microvessels in the plugs. $^{**}P < 0.001$; $^{*}P < 0.005$. (*B*) Matrigel plugs were stained with anti-CD31 (green) to attest for the vascular property of microvessels. Nuclei were stained with DAPI (blue). Magnification ×400. Scale bar 100 μm. Representative pictures are shown ($n \geq 6$).

We observed that CAC did not produce MCP3, indicating that the stimulation of their migration by this chemokine may be a paracrine mechanism. It has been shown in rats that the transplantation of cardiac fibroblasts overexpressing MCP3 into the heart after myocardial infarction recruited MSC to injured tissue and improved cardiac healing.[6] We observed a low but detectable production of MCP3 by fibroblasts and myofibroblasts, indicating that these cells may contribute to the mobilization of CAC upon injury. However, macrophages produced the largest quantity of MCP3 and are therefore thought to be potent triggers of CAC recruitment.

It is known that the mobilization of CAC to ischaemic tissues is controlled by the SDF1α/CXCR4 ligand/receptor couple.[16–18] Here, we show for the first time that the migration of CAC can also be triggered by MCP3. This finding provides an explanation why CXCR4 blockade only partly prevents stem cell migration.[5] This could also be due to a lack of specificity of the antibodies used to neutralize CXCR4. Indeed, the reliability of G-protein-coupled receptor antibodies has been questioned.[19] Similarly, a poor specificity of the anti-CCR1 used in our study may account for the partial inhibition of CAC migration observed after CCR1 blockade (*Figure 3C*). This is however unlikely since the antibody used in these experiments, which was generated by Coughlan *et al.*,[20] recognizes the CCR1 receptor but not the CCR3 receptor, the most closely phylogenetically related chemokine receptor. The specificity of this antibody has also been demonstrated elsewhere.[21]

A more likely explanation for the partial inhibition of migration by anti-CCR1 may be the presence of other chemokines in conditioned medium from HS-treated macrophages. In our experiments, SDF1α was undetectable in conditioned medium, ruling out a possible role for this chemokine. The MIP3β/CCR7 axis triggers the chemotaxis of hematopoietic progenitor cells.[15] We observed that MIP3β stimulated CAC migration through the CCR7 receptor. This effect was weaker than MCP3, conferring to this latter chemokine the stronger ability to induce the migration of CAC. The dual blockade of CCR1 and CCR7 did not fully block the migration of CAC, suggesting that other chemokines may be involved. Upon activation, macrophages produce interleukin (IL)-6,[22] and IL-6 has been shown to regulate the migration of endothelial progenitor cells through the CD126 receptor.[23] Fractalkine (CX3CL1) may also stimulate CAC migration, since it is involved in macrophage chemotaxis during inflammation[24] and its receptor, CX3CR1, is expressed on endothelial progenitor cells.[25] Overall, the migration of CAC is a complex mechanism implicating multiple chemokines. We identified here MCP3 as an important player.

The efficacy of cell therapy is often limited by a low homing of injected cells to the ischaemic heart.[26] From our results, it can be speculated that MCP3 may be studied as an adjunct to cell therapy to improve the homing to the site of injury.

In conclusion, we have identified MCP3 as a new target to improve cardiac repair. This observation suggests testing concomitant

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at BibliothÃ¨que nationale de Luxembourg on May 18, 2012

administration of CAC and MCP3 in pre-clinical models of ischaemic cardiac disease.

Acknowledgements

We thank Christelle Nicolas, Bernadette Leners, and Mickaël Lhuillier for expert technical assistance. The help of Wim Ammerlaan and Nicolaas Brons with flow cytometry is acknowledged.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by the National Funds of Research, the Society for Research on Cardiovascular Diseases, and the Ministry of Culture, Higher Education and Research of Luxembourg. M.B. and F.L. are recipients of fellowships from the National Funds of Research of Luxembourg.

References

1. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M *et al*. Transplantation of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:3422–3427.
2. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H *et al*. Therapeutic potential of *ex vivo* expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001;**103**:634–637.
3. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J *et al*. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;**7**:430–436.
4. Jujo K, Ii M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2008;**45**:530–544.
5. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE *et al*. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 2004; **104**:2643–2645.
6. Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z *et al*. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells* 2007; **25**:245–251.
7. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF *et al*. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 2008;**180**:6846–6853.
8. Si Y, Tsou CL, Croft K, Charo IF. CCR2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *J Clin Invest* 2010;**120**:1192–1203.
9. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP *et al*. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest* 2007;**117**:902–909.
10. Bonaros N, Sondermejer H, Schuster M, Rauf R, Wang SF, Seki T *et al*. CCR3- and CXCR4-mediated interactions regulate migration of CD34+ human bone marrow progenitors to ischemic myocardium and subsequent tissue repair. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;**136**:1044–1053.
11. Chavakis E, Carmona G, Urbich C, Gottig S, Henschler R, Penninger JM *et al*. Phosphatidylinositol-3-kinase-{gamma} is integral to homing functions of progenitor cells. *Circ Res* 2008;**102**:942–949.
12. Azuaje FJ, Wang H, Zheng H, Leonard F, Rolland-Turner M, Zhang L *et al*. Predictive integration of gene functional similarity and co-expression defines treatment response of endothelial progenitor cells. *BMC Syst Biol* 2011;**5**:46.
13. Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL. Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 2002;**168**:5233–5239.
14. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T *et al*. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002;**195**: 99–111.
15. Kim CH, Pelus LM, White JR, Broxmeyer HE. Macrophage-inflammatory protein-3β/EBI1-ligand chemokine/CKβ-11, a CC chemokine, is a chemoattractant with a specificity for macrophage progenitors among myeloid progenitor cells. *J Immunol* 1998;**161**:2580–2585.
16. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004;**110**:3300–3305.
17. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME *et al*. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004;**10**:858–864.
18. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005;**106**: 1901–1910.
19. Michel MC, Wieland T, Tsujimoto G. How reliable are G-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2009;**379**:385–388.
20. Coughlan CM, McManus CM, Sharron M, Gao Z, Murphy D, Jaffer S *et al*. Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neuroscience* 2000;**97**:591–600.
21. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, Herault O *et al*. The *in vitro* migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 2007;**25**:1737–1745.
22. Stow JL, Low PC, Offenhauser C, Sangermani D. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. *Immunobiology* 2009;**214**:601–612.
23. Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W *et al*. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis *in vitro*. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;**28**:90–98.
24. Saederup N, Chan L, Lira SA, Charo IF. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in CCR2−/− mice: evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation* 2008; **117**:1642–1648.
25. Walenta KL, Bettink S, Bohm M, Friedrich EB. Differential chemokine receptor expression regulates functional specialization of endothelial progenitor cell subpopulations. *Basic Res Cardiol* 2011;**106**:299–305.
26. Zimmet H, Porapakkham P, Porapakkham P, Sata Y, Haas SJ, Itescu S *et al*. Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: a meta-analysis of randomized control trials. *Eur J Heart Fail* 2012;**14**:91–105.

Downloaded from http://cardiovascres.oxfordjournals.org/ at BibliothÃ¨que nationale de Luxembourg on May 18, 2012

Etude n°5 : Effets d'un agoniste A2A / antagoniste A3 des récepteurs à l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages et neutrophiles.

#

Nous avons observé dans de précédentes études que l'activation des différents types de récepteurs à l'adénosine induit des résultats parfois opposés. L'activation du récepteur A2A provoque une inhibition de la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles humains[21], une enzyme impliquée dans la dégradation de la MEC et donc dans le remodelage ventriculaire post IDM. Au contraire, l'activation spécifique du récepteur A3 provoque une augmentation de la production de MMP-9 par les macrophages humains[20].
Dans cette étude, nous avons étudié les effets d'une molécule agoniste du récepteur A2A et antagoniste du récepteur A3, synthétisée par GlaxoSmithKline[90]. Cette molécule, nommée PCI, est susceptible de limiter le remodelage ventriculaire gauche après IDM.

Les buts de cette étude ont été :

-de s'assurer de la non-toxicité du PCI sur les macrophages et neutrophiles humains

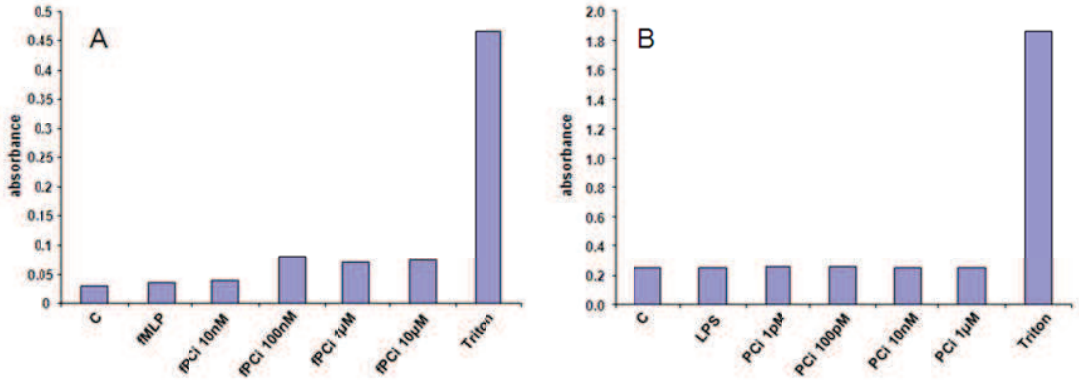
-de caractériser les effets du PCI sur la production de MMP-9 par les neutrophiles et macrophages primaires humains

-de tester la stabilité et la cinétique du PCI in vivo en vue de futures expériences pharmacologiques.

Nous avons obtenu les résultats suivants:

-Le PCI n'a pas d'effet cytotoxique sur les neutrophiles, ni sur les macrophages au repos ou activés. L'activité LDH mesurée dans les milieux de culture de ces cellules

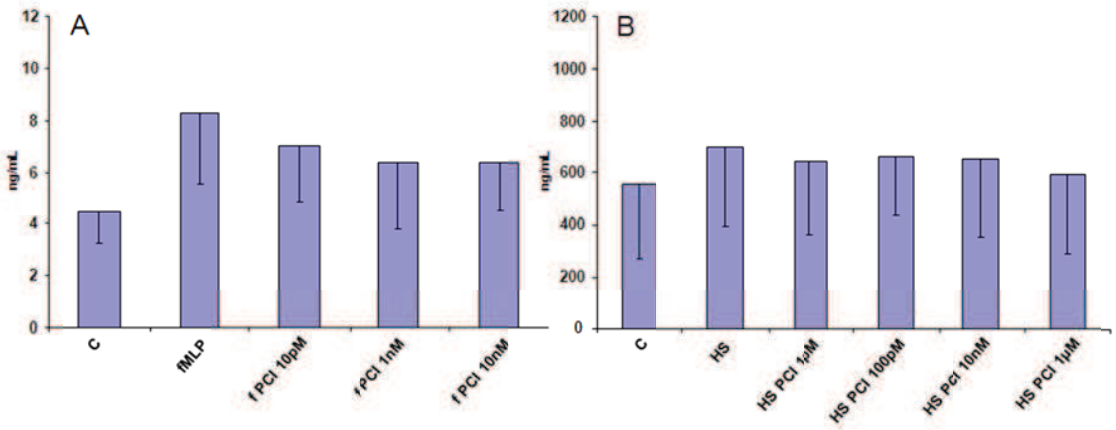
traitées avec le PCI ne représente que 13% en moyenne de l'activité LDH maximale mesurée dans les surnageants de cellules traitées au Triton (contrôle positif représentant 100% de mortalité) (Figure 28).



<u>Figure 28.</u> Activité Lactate Déshydrogénase mesurée dans les milieux de culture de neutrophiles (A) et macrophages (B) traités avec le PCI

Les neutrophiles isolés du sang de volontaires sains ont été traités avec différentes concentrations de PCI avant d'être activés par la fMLP (10^{-7}M). Les macrophages ont été obtenus par différenciation de monocytes isolés du sang de volontaires sains avec du *macrophage-colony stimulating factor* (50ng/mL pendant 7 jours). Ils ont ensuite été activés avec 10ng/mL de LPS et prétraités pendant 15 minutes avec différentes concentrations de PCI. L'activité LDH contenue dans les milieux conditionnés a été mesurée par spectrométrie après 15 minutes pour les neutrophiles et après 24 heures pour les macrophages. (n=2).

-Le PCI inhibait la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles activés à la fMLP. Ces effets n'étaient pas significatifs, même si 10pM de PCI avaient déjà tendance à inhiber la sécrétion de MMP-9 (Figure 29A). De plus, le PCI n'a pas eu d'effet sur les macrophages latents, ni activés par l'HS (Figure 29B).

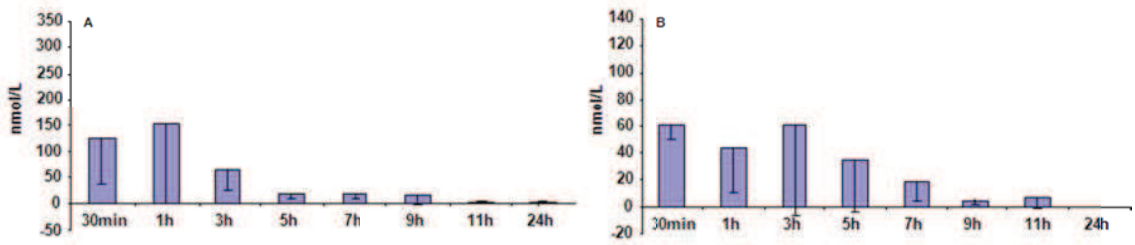


<u>Figure 29.</u> Effets du PCI sur la production de MMP-9 in vitro

A. Les neutrophiles isolés du sang de volontaires sains ont été traités avec différentes concentrations de PCI avant d'être activés par la fMLP (10^{-7}M). B. Les macrophages ont été obtenus par différenciation de monocytes isolés du sang de volontaires sains avec du *macrophage-colony stimulating factor* (50ng/mL pendant 7 jours). Ils ont ensuite été activés avec 10ng/mL d'HS et prétraités pendant 15 minutes avec différentes concentrations de PCI. Le taux de MMP-9 contenu dans les milieux conditionnés a été mesuré par ELISA après 15 minutes pour les neutrophiles et après 24 heures pour les macrophages. (n=3).

-In vivo, le PCI injecté par voie intrapéritonéale (IP, Fig 30A) ou intraveineuse (IV, Figure 30B) (2mg/kg) était détectable 30 minutes après l'injection, quel que soit le mode d'injection. La concentration plasmatique de PCI déclinait après 1 heure quand il était injecté en IV et après 5 heures seulement lorsqu'il était injecté en IP. Injecté en IP, on retrouvait en moyenne 56nM de PCI dans le plasma. Injecté en IV, on retrouvait en moyenne 33nM de PCI dans le plasma. Ces concentrations sont suffisantes pour avoir un effet sur la production de MMP-9 in vitro. En effet, 10pM de PCI ont déjà tendance à inhiber la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles, et la dose la plus forte de 1µM testée sur les macrophages n'a pas d'effet sur la production de MMP-9.

Après 12 heures, le PCI n'était plus détectable dans le plasma, quelle que soit la voir d'injection.



<u>Figure 30.</u> Analyse de la stabilité du PCI in vivo

Des rats males Wistar (320–350g) ont été injectés par voie intraveineuse (IV, partie A, n=4) ou intrapéritonéale (IP, partie B n=4) avec une dose de PCI (2 mg/kg). Des prélèvements sanguins veineux (100µL) ont été collectés à 0.5, 1, 3, 5, 9, 11 et 24 heures après l'injection. Le PCI plasmatique a été mesuré par spectrométrie de masse.

In vitro, le PCI était donc capable d'inhiber la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles activés et il ne provoquait pas d'augmentation de production de MMP-9 par les macrophages latents ou activés. Le PCI n'était pas cytotoxique aux doses induisant ces effets.

In vivo, le PCI était stable et détecté à des doses susceptibles d'avoir des effets sur la MMP-9 pendant 12 heures après son injection. Injecté en IP, on retrouvait de plus fortes concentrations de PCI plasmatiques. L'injection IP semble donc la plus adaptée en vue de futures expériences pharmacologiques.

Cette étude préliminaire montre donc que le PCI, par sa propriété agoniste du récepteur A2A et antagoniste du récepteur A3 à l'adénosine, semble donc être un candidat potentiel pour inhiber le remodelage ventriculaire après IDM.

DISCUSSION

Etude n°1: Mise en place du modèle d'infarctus du myocarde chez le rat. Mise au point des techniques et analyse du remodelage ventriculaire gauche.

Dans cette étude, nous avons pu caractériser de façon précise les séquelles d'IDM et prédire le remodelage ventriculaire précoce dans le modèle d'IDM chez le rat grâce à la FDG-TEP, couplée à une prémédication à l'acipimox. Des membres de notre groupe ont récemment démontré que cette technique permet d'obtenir un ratio signal/bruit élevé, avec un rapport moyen de l'activité de FDG dans le myocarde par rapport à l'activité sanguine de 10[115], ce qui est supérieur à la valeur obtenue chez l'homme jusqu'à maintenant[117, 119]. Chez l'homme, on savait déjà que le FDG permet d'identifier de façon précise les zones irréversiblement touchées après un IDM[109, 110, 116, 153-155].

Les analyses histologiques ont permis de confirmer ces données chez le rat, mettant en évidence la faible viabilité cellulaire (amincissement pariétal, fibrose, dégradation des éléments du cytosquelette) dans les segments cardiaques ayant une captation en FDG <50% en TEP, un critère habituellement utilisé pour identifier le myocarde non viable chez l'homme[116, 153-155]. Dans une précédente étude, il a été demontré que la SPECT au Sestamibi, lorsqu'elle était utilisée pour étudier le remodelage cardiaque après IDM chez le rat, avait tendance à surestimer la zone infarcie[105]. Ces résultats confirment ceux déjà obtenus chez l'homme et où il a été montré que le FDG était un meilleur traceur que le Sestamibi pour caractériser la viabilité myocardique, en particulier dans les zones hypoperfusées au repos. En effet, on observe alors qu'il y a souvent une faible captation en Sestamibi alors que la captation en FDG est au contraire élevée[109-111, 183, 184].

Dans notre étude, l'extension initiale des segments nécrosés mesurée à 48 heures avec la FDG-TEP est fortement prédictive du remodelage ventriculaire gauche à 15 jours.

Les altérations structurelles, mises en évidence par nos analyses histologiques, ont également permis de valider le critère de fixation <50% pour définir un IDM.
Dans le modèle d'IDM chez le rat, le remodelage ventriculaire gauche continue après 15 jours, surtout pour les IDM sévères[105]. En revanche, la majeure partie de la dilatation ventriculaire se produit dans les 15 jours suivants l'IDM. Ce processus à court terme est donc un facteur critique dans la survenue de l'insuffisance cardiaque.

L'occlusion coronarienne produit des tailles variables d'IDM chez le rat (ainsi que chez l'homme) dues à la variabilité anatomique des territoires vascularisés par les artères coronaires, ainsi qu'à la circulation collatérale plus ou moins développée d'un individu à l'autre. La classification à 48 heures en 3 groupes de rats selon leur taille initiale d'IDM (limité, modéré et sévère) a été un facteur prédictif indépendant majeur de l'élargissement ventriculaire gauche à 15 jours. 44% de la dilatation du VG ont pu être prédits par cette variable et 34% supplémentaires ont été prédits par la FC à 48 heures. La FC était supérieure à 48 heures, comparée à 15 jours après IDM. Ceci correspond à la cinétique d'activation à court terme du système sympathique après IDM [185]. De plus, il a été démontré que l'activation sympathique augmentait le remodelage ventriculaire gauche et pouvait être limitée par l'administration de ß-bloquants[156, 186]. C'est pourquoi notre hypothèse est que l'activation sympathique pourrait accroitre le remodelage, de manière indépendante de la taille d'IDM.

Cette étude présente néanmoins quelques limitations. Tout d'abord, les techniques ex vivo utilisées pour confirmer le caractère nécrotique des segments présentant une captation en FDG <50% en TEP ont été réalisées sur des coupes histologiques (µImager™, coloration au trichrome de Masson et marquage immunohistologique), ce qui empêche de mesurer précisément la taille d'IDM ex vivo. Ensuite, la FC n'a pas été mesurée avant l'induction de l'IDM, ce qui n'a pas permis d'observer une réelle augmentation de la FC à 48 heures et d'évaluer l'impact de cette augmentation sur le remodelage ultérieur. Enfin, il aurait été bénéfique pour notre étude d'avoir effectué une FDG-TEP avant l'induction de l'IDM, pour avoir des informations additionnelles sur l'augmentation du volume du VG dans les 48 premières heures.

L'IRM permet aussi de caractériser et de prédire le remodelage ventriculaire post IDM chez l'homme et chez l'animal, comme le montrent les études suivantes.

Récemment, Schuleri et al.[130] ont utilisé l'IRM pour caractériser le remodelage de la zone péri-infarcie chez le mini porc. Ils ont montré que les changements fonctionnels opérant dans cette zone peuvent donner un aperçu des problèmes d'arythmie et de mort subite dans les 90 jours suivant l'IDM.

Chez l'homme, Mather et al.[187] ont montré que la FE, la taille initiale d'IDM et l'extension de l'œdème myocardique mesurés 1 semaine après l'IDM par IRM étaient des facteurs prédictifs de la taille d'IDM et de la fonction cardiaque à 3 mois après l'IDM. Nahrendorf [188] a montré que l'activité protéolytique cardiaque, mesurée par IRM, permet de prédire le remodelage ventriculaire gauche post IDM et l'évolution vers l'IC. Lombardo et al.[189] ont également montré l'intérêt de l'IRM dans la phase aigüe de l'IDM pour prédire le remodelage ventriculaire chez l'homme. Dans cette étude, la taille initiale d'IDM et la présence d'une obstruction vasculaire à 5 jours permettait de prédire le risque de remodelage ventriculaire délétère ultérieur.

Ainsi, l'IRM est aussi une technique d'imagerie efficace pour mesurer de façon précise la taille d'IDM et la fonction cardiaque chez l'homme et l'animal. Ces caractéristiques en font un outil intéressant, comparable à la TEP, pour prédire le remodelage ventriculaire post IDM.

De nombreuses études ont également testé la capacité de l'imagerie par SPECT à évaluer les patients et les animaux ayant subi un IDM. Il est d'ailleurs possible d'utiliser en SPECT des traceurs métaboliques, mais qui sont différents du FDG.

Par exemple, Franken et al.[190]ont montré que la SPECT au Sestamibi combinée à l'utilisation d' acide beta-méthyl iodophényl pentadécanoique permet de prédire le devenir des patients après IDM avec une meilleure valeur prédictive que celle obtenue avec l'échocardiographie à la dobutamine. L'acide beta-méthyl iodophényl

pentadécanoique est un acide gras modifié qui permet de mesurer l'activité métabolique du myocarde en SPECT[191]. D'autres études ont montré que cet acide gras permettait d'améliorer la prédiction de la dysfonction cardiaque après IDM[192, 193]. Dans le modèle d'IDM du rat, une étude faite par des membres de notre équipe a montré que la taille initiale d'IDM, évaluée par SPECT au Sestamibi, permettait de prédire le remodelage ventriculaire[105]. Cependant, les résultats ont révélé que la SPECT a tendance à surestimer l'extension de la zone infarcie, comparée à la taille mesurée par le µImager™.

Ainsi, la SPECT réalisée avec le Sestamibi semble être moins précise que la TEP au FDG ou l'IRM pour mesurer les paramètres cardiaques et délimiter la taille d'IDM.

Le remodelage ventriculaire peut également être prédit grâce aux paramètres cardiaques mesurés par échocardiographie.

Wita et al.[194] ont montré que la perfusion myocardique, mesurée chez les patients à leur admission après IDM, est un facteur indépendant hautement prédictif du remodelage ventriculaire à 6 mois post IDM. Cependant, les limites de l'échocardiographie ont été montré par Bochenek et al.[195]. Dans cette étude menée chez des patients ayant subi un IDM, le remodelage ventriculaire à 3 mois est modérément corrélé aux paramètres mesurés par échocardiographie. Jang et al.[196] ont montré que la torsion du VG mesurée par échocardiographie chez les patients ayant subi un IDM permet de prédire la dilatation du VG à 6 mois post IDM.

Chez les animaux, Patten et al.[197] ont pu différencier des IDM de grande taille et de taille modérée sur la base des volumes ventriculaires et la fraction de raccourcissement mesurés par échocardiographie. D'autres études ont établi des corrélations entre les volumes ventriculaires et la fraction de raccourcissement d'une part et la taille d'IDM d'autre part. Ces données ne permettent pas de prédire le remodelage ventriculaire mais au moins d'établir une corrélation entre les paramètres cardiaques mesurés par échocardiographie et la fonction ventriculaire[198, 199].

Ainsi, dans le domaine de l'évaluation du remodelage cardiaque après infarctus chez le rat, l'IRM et la TEP au FDG semblent être les techniques les plus intéressantes, en

raison : 1) de la précision dans la mesure des volumes et de la FE du VG, avec une imagerie en trois dimensions et 2) de leur capacité à évaluer très précisément la taille de l'IDM, un paramètre essentiel dans ce contexte. L'IRM présente l'avantage d'être non-irradiante (pour les animaux et le personnel), d'avoir une meilleure résolution spatiale et de permettre une mesure fiable de la masse myocardique et donc, du degré d'hypertrophie. La TEP au FDG est beaucoup plus simple d'utilisation : l'apnée n'est pas nécessaire pendant les acquisitions, ce qui permet d'utiliser des procédures d'anesthésie plus légères, et les procédures de recueil des données se font avec des logiciels totalement automatisés (ce qui n'est pas le cas avec l'IRM).

Etude n°2: Cas particulier d'un rat ayant survécu à long-terme à un infarctus du myocarde très étendu.

Dans cette étude, nous avons reporté le cas d'un rat ayant survécu de façon très surprenante, pendant 2 mois, à un IDM touchant plus de 70% de son VG, laissant seulement intacte la paroi septale, ainsi que le ventricule droit.

Le remodelage ventriculaire post IDM est déterminé en grande partie par la taille d'IDM, mais aussi par d'autres facteurs (stimulation sympathique, comorbidité…)[200, 201]. Ce processus démarre très tôt, dans les heures suivant l'IDM. Le pronostic des patients ayant subi un important IDM est mauvais, en particulier si le remodelage ventriculaire n'est pas au moins atténué par un traitement. Cependant, les patients hospitalisés à la suite d'un IDM bénéficient toujours d'une prise en charge thérapeutique avec des médicaments freinant le remodelage, tels que les ICE et les β-bloquants.

Dans notre étude, le rat ayant subi l'IDM par ligature coronaire n'a ensuite reçu aucun traitement cardioprotecteur. Sa survie à long-terme en est donc encore plus surprenante.

Chez l'homme cependant, l'IDM touche rarement des personnes jeunes et sans maladie, c'est pourquoi la mortalité relevée chez les patients ayant subi un IDM est relativement élevée. Dans notre cas, le rat étudié était un rat adulte de 8 semaines sans aucune maladie antérieure à l'IDM. Cela explique peut être en partie la survie surprenante de cet animal.

Chez l'homme, certains cas de survie à des IDM massifs ont été également reportés. Haddad et al.[202] ont décrit le cas d'un jeune homme ayant survécu à un IDM massif transmural touchant les parois antéroseptales du VG et réduisant la FE à 15%. Il a survécu malgré une FE extrêmement faible.

Une autre explication à la survie de l'animal de notre étude est l'espèce choisie. En effet, le rat Wistar est relativement résistant à l'IDM, comparé à d'autres espèces. Heimbecker RO et al.[203] ont montré que la ligature de l'artère interventriculaire antérieure, proximale ou distale de l'aorte, provoque 100% de mortalité chez les veaux. Glass et al. et Stein et al.[204, 205] ont montré que le chien ne pouvait survivre à un IDM > 35% du VG. La souris semble aussi être une espèce relativement résistante à l'IDM. Patten RD et al.[197] ont montré que cette espèce survit à des IDM touchant 40% du VG en moyenne. Dans leur étude, l'IDM pouvait toucher jusqu'à 64% du VG. Cependant, ils utilisaient l'échocardiographie pour mesurer la taille d'IDM et cet outil peut surestimer la taille d'IDM.

La génétique pourrait également expliquer en partie la survie de cet animal. On ne peut pas exclure la possibilité de certaines mutations génétiques ayant eu pour effet de permettre à cet animal de s'adapter à l'IDM très étendu. Cependant, cette hypothèse mériterait une étude approfondie.

Toutes ces données montrent que le cas que nous avons reporté est exceptionnel. L'absence de comorbidité, le jeune âge et l'espèce de l'animal étudié peuvent en partie expliquer sa survie. Le VD laissé intact peut également avoir un joué un rôle important dans la survie de l'animal.

Etude n°3: L'adénosine améliore la contractilité cardiaque dans la zone bordant l'IDM et stimule la migration des cellules endothéliales progénitrices

Suite à l'amélioration de la caractérisation tissulaire grâce à l'IRM et à la TEP et aux nouveaux traitements tels que la thérapie cellulaire, la zone bordant l'IDM est devenue une cible très intéressante après l'IDM.

Nous avons travaillé avec le modèle d'IDM chez le rat, couramment utilisé dans ce contexte. Nous avons évalué la fonction cardiaque après IDM par FDG-TEP couplée à une prémédication à l'acipimox. Cette technique a été décrite dans notre première étude comme très précise pour caractériser les séquelles d'IDM et prédire le remodelage ventriculaire gauche [123]. Elle nous a donc permis de réduire le nombre d'animaux utilisés pour notre étude, obéissant ainsi au mieux à la règle des 3R qui constitue le fondement de la démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale (réduire le nombre d'animaux, raffiner la méthodologie utilisée et remplacer le modèle animal).
L'examen TEP réalisé à 48 heures a permis de randomiser les animaux selon leur taille initiale d'IDM, dans les 3 groupes de traitement (NaCl, CADO, CADO + 8-SPT).
Puisque la taille initiale d'IDM est un facteur majeur déterminant le remodelage ventriculaire gauche[123], il était très important que les tailles d'IDM soient en moyenne identiques dans les 3 groupes.

Les doses, mode et fréquence d'administration ont été choisis selon ceux déterminés par une précédente étude[17]. Nos résultats sont en accord avec ceux Wakeno et al.[17] qui ont observé une dérivée dans le temps de la pression du VG (dP/dt) et une fraction de raccourcissement améliorée 3 semaines après un traitement à la CADO. Nous avons confirmé que l'adénosine réduit la fibrose dans les zones saines du cœur infarci. Cependant, notre observation principale est que la CADO protège la contractilité segmentaire dans la zone bordant l'IDM et cet effet est annulé après le blocage chronique des récepteurs à l'adénosine (8-SPT). Le mécanisme exact par lequel l'adénosine améliore la contractilité dans la zone bordant l'IDM n'est pas complètement élucidé.
Nous avons observé que les rats du groupe CADO avaient une FC plus basse que celle des autres groupes et il est possible que ceci ait un effet favorable. Surtout, notre groupe a

montré dans de précédentes études in vitro que l'adénosine régule de multiples processus biologiques impliqués dans le remodelage du VG. En particulier, l'adénosine est impliquée dans l'inflammation[19, 206], l'angiogenèse[207 208, 209], et le turnover de la matrice extracellulaire[20, 21]. Grâce aux analyses post-mortem de cette étude, nous avons pu montrer les propriétés pro-angiogéniques de l'adénosine dans la zone bordant l'IDM. Nos résultats suggèrent que les effets pro-angiogéniques de l'adénosine dans la zone bordant l'IDM sont probablement consécutifs au recrutement d'EPC.

Nos résultats suggèrent donc que l'amélioration de la contractilité dans la zone bordant l'IDM pourrait être au moins en partie liée à une stimulation du recrutement des EPC et en conséquence, à une amélioration de la densité vasculaire dans cette zone. Il est intéressant de noter que l'effet de l'adénosine dans la zone bordant l'IDM est très similaire à celui observé par Wang et al[170] après l'injection de cellules progénitrices pluripotentes dans la zone bordant l'IDM du cœur de porc. De nombreuses études tendent à montrer que les EPC constitueraient un agent thérapeutique intéressant après IDM, mais avec la limite de la faible rétention de ces cellules dans le cœur[210-212].

Fazel et al.[213] ont montré que la mobilisation des cellules progénitrices de la moelle osseuse nécessite l'activation du récepteur membranaire c-Kit. De plus, ils ont démontré que la dysfonction de ce récepteur chez les souris mène à l'IC. Dans le cœur de rat néonatal, il a été montré que les cellules cardiaques progénitrices expriment le c-Kit[214]. En parallèle de ces études, il a été montré que les EPC sont recrutées vers l'endothélium inflammé via une activation de la voie de signalisation Akt médiée par le c-Kit[215].

Une activité ALDH importante a été décrite chez les EPC[175]. De plus, la transplantation de cellules de la moelle osseuse, ayant une forte activité ALDH, améliore la revascularisation des membres inférieurs ischémiés chez la souris[176] ainsi que la densité vasculaire chez la souris après IDM[177]. L'augmentation de l'expression de l'ALDH2 chez les rats traités par la CADO suggère donc une stimulation du recrutement d'EPC qui ont un fort pouvoir de régénération du cœur après IDM. Par contre, chez les rats contrôles, on n'observe pas de marquage ALDH2 ni CXCR4, ce qui suggère que le recrutement des EPC est très faible chez ces animaux.

L'amélioration de la contractilité cardiaque dans la zone bordant l'IDM peut également être liée à l'amélioration de la fonction mitochondriale ainsi qu'à la réduction de l'apoptose des cardiomyocytes dans cette zone. La mitochondrie joue un rôle essentiel dans l'apoptose et le TNF-α peut endommager la membrane de cet organite, enclenchant ainsi la voie de signalisation apoptotique. Nous avons déjà montré au préalable que l'adénosine limite la production de TNF-α par de nombreuses cellules dont les cardiomyocytes[18, 206]. C'est pourquoi une de nos hypothèses était que la CADO pourrait aussi avoir réduit l'apoptose des cardiomyocytes. Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas observé de réduction notable de ce processus dans les cœurs des rats traités avec la CADO. Simonis et al.[216], avaient pourtant montré que l'adénosine réduisait l'apoptose des cardiomyocytes lorsqu'elle est administrée avant l'IDM ou dans les 3 jours suivants. Dans notre protocole, l'adénosine a été administrée 7 jours après IDM, et donc peut être trop tardivement pour avoir un effet anti-apoptotique.

L'hypertrophie est un mécanisme de compensation qui peut aussi avoir des effets néfastes lors du remodelage ventriculaire après IDM[41, 217], en particulier parce que la stimulation chronique du signal hypertrophique peut conduire à l'apoptose des cardiomyocytes[218, 219]. Dans cette étude comme dans la nôtre, l'hypertrophie des cardiomyocytes en post IDM était inhibée par l'adénosine.

Cependant, dans notre étude, l'adénosine n'a pas montré d'effet significatif sur la fonction cardiaque globale des animaux (VTD, VTS, FE). Ceci peut s'expliquer au moins en partie par le faible nombre de rats étudiés dans nos populations. En effet, il y avait quand même une tendance à l'amélioration de ces variables par la CADO, sans pour autant atteindre le seuil de significativité de 5%. De plus, l'existence d'un effet bénéfique global de l'adénosine est renforcée par le fait que 2 paramètres cliniques, qui sont classiquement analysés lors de l'insuffisance cardiaque, la fréquence cardiaque et le poids corporel, étaient clairement plus élevés chez les rats contrôles par rapport aux rats CADO. Un autre point important est la considération de l'anatomie du muscle cardiaque. En effet, Buckberg et al.[220] ont montré que la compréhension des mécanismes de la fonction cardiaque ne pourrait être entièrement maitrisée que lorsque la structure anatomique du muscle cardiaque ne serait complètement décrite. Ils ont notamment émis le concept de Torrent-Guasp qui décrit l'architecture hélicoïdale du muscle cardiaque

humain. Il serait bénéfique d'étudier de plus près les effets de l'adénosine sur cette structure en corde afin de mieux comprendre ses effets sur la fonction cardiaque.

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) et des β-bloquants sont actuellement les traitements utilisés pour limiter le remodelage ventriculaire après IDM chez l'homme. Il a été démontré qu'ils pouvaient limiter l'expansion de la zone infarcie, administrés seuls ou en combinaison[221, 222]. Cependant, leurs effets sur la zone bordant l'IDM ne sont pas encore connus. Les β-bloquants pourraient avoir un effet seulement limité sur la zone bordant l'IDM du fait du manque de réponse des récepteurs ß-adrénergiques des cardiomyocytes survivants dans la zone bordant l'IDM[223] .

Dans cette étude, les effets cardioprotecteurs de l'adénosine ont été démontrés sur trois composants du remodelage ventriculaire après IDM dont les effets sur le pronostic sont radicalement différents. D'une part, l'adénosine n'a pas d'effet sur la fibrose de remplacement qui permet d'éviter la rupture de la paroi infarcie. En revanche, le blocage chronique des récepteurs à l'adénosine augmente fortement la fibrose réactionnelle dans les zones saines du cœur. Or cette fibrose, délétère, induit l'augmentation de la rigidité myocardique, et jusqu'à maintenant seuls les IEC et les traitements anti-aldostérone[224, 225] sont connus pour réduire la fibrose réactionnelle. Enfin, nos résultats sur l'hypertrophie des cardiomyocytes peuvent porter à controverse. En effet, l'hypertrophie est dans un premier temps bénéfique après un IDM puisqu'elle permet de compenser la perte de contractilité secondaire à la perte de tissu et à la diminution de l'impédance ventriculaire. Cependant, ce mécanisme peut devenir délétère à long-terme puisque la stimulation du signal hypertrophique peut conduire à l'apoptose cellulaire. Si l'on considère ce deuxième point, l'effet inhibiteur de l'adénosine sur l'hypertrophie des cardiomyocytes deux mois après IDM est ici cardioprotecteur. Ces données sont très importantes car elles montrent que l'adénosine exerce ses effets en inhibant les composantes délétères du remodelage ventriculaire après IDM.

Nos résultats suggèrent que l'administration chronique d'adénosine ou d'analogue des récepteurs à l'adénosine, débutant quelques jours après l'IDM, améliore la contractilité segmentaire dans la zone bordant l'IDM. Cet effet cardioprotecteur semble impliquer le recrutement d'EPC, un effet angiogénique et une inhibition de la fibrose. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer le potentiel thérapeutique de cette observation.

Etude n°4 : La Monocyte Chemotactic Protein 3 stimule la migration des cellules endothéliales progénitrices et induit l'angiogenèse

Cette étude a montré que la MCP3 était capable de stimuler la migration des EPC et d'induire l'angiogenèse.

Nous avons en effet observé que les EPC ne produisent pas de MCP3, ce qui montre que l'effet de cette chimiokine sur leur migration est dû à un mécanisme paracrine. Les cellules inflammatoires pourraient faire partie des cellules responsables de la sécrétion de MCP3.

Après IDM chez le rat, il a été démontré que la transplantation cardiaque de fibroblastes surexprimant la MCP3 induit le recrutement de MSC dans le tissue abîmé, 1 mois après IDM, et améliore la cicatrisation cardiaque[178].

Dans notre étude, nous avons observé que les fibroblastes et les myofibroblastes produisent la MCP3 en faible quantité, indiquant que ces cellules ne peuvent donc être que très partiellement responsables de la migration des EPC. Les macrophages sont en revanche les cellules qui produisent les plus grandes quantités de MCP3 parmi les cellules inflammatoires que nous avons étudiées. C'est pourquoi nous avons pensé que ces cellules pouvaient jouer un rôle important dans le recrutement des EPC vers les sites inflammatoires.

L'implication du SDF1α et de son récepteur, le CXCR4, dans la mobilisation des EPC vers les sites ischémiés est bien connue[172-174]. Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois que la migration des EPC pouvait également être médiée par la MCP3. Ces résultats peuvent expliquer pourquoi le blocage du CXCR4 inhibe en partie seulement la migration des cellules souches[226]. Une autre explication pourrait être le manque de spécificité des anticorps utilisés pour neutraliser le CXCR4. En effet, les anticorps se liant aux récepteurs couplés aux protéines G peuvent parfois ne pas être très spécifiques[227]. C'est pourquoi nous nous sommes demandé si l'inhibition partielle de la migration des EPC avec l'anticorps anti-CCR1 pouvait provenir de la faible spécificité de notre anticorps. Ce n'est pas le cas, car notre anticorps, qui a été fabriqué par Coughlan et al.[228], reconnait bien le récepteur CCR1 mais pas le CCR3, qui est le récepteur le plus

proche d'un point de vue phylogénétique. De plus, la spécificité de notre anticorps a également été démontrée dans une autre étude sur la migration des cellules souches[229].

L'inhibition partielle de la migration des EPC par le blocage du CCR1 est plus certainement due à la présence de nombreuses chimiokines dans le milieu conditionné de macrophages. Le SDF1α n'a pas été détecté dans ces milieux, ce qui exclue son implication. La MIP3β et son récepteur CCR7 sont impliqués dans la migration des cellules progénitrices hématopoïétiques[230]. Nos résultats ont montré que cet axe est également impliqué dans la migration des EPC. Cependant, l'effet de la MIP3ß reste discret par rapport à celui de la MCP3, qui elle a un pouvoir chimioattractant majeur sur les EPC.

La migration des EPC n'a été que partiellement inhibée par le double blocage CCR1 et CCR7. Ceci suggère que d'autres chimiokines sont également impliquées dans ce processus. Les macrophages activés produisent de l'interleukine 6 (IL-6)[231] et il a été démontré que cette cytokine peut réguler la migration des EPC en se liant au récepteur CD126[232]. La fractalkine (CXCL1) pourrait également stimuler la migration des EPC, puisqu'elle participe au recrutement des macrophages vers les sites inflammatoires[233] et aussi parce que son récepteur, le CX3CR1, est exprimé sur les EPC[234]. Il est évident que la migration des EPC est un processus très complexe qui implique de nombreuses chimiokines. Nous avons cependant contribué à la compréhension de ce processus en identifiant la MCP3 comme acteur important.

On savait déjà que les EPC étaient recrutées vers le tissu ischémié après IDM. Shintani et al.[235] ont montré que le taux plasmatique de PBMC $CD34^+$, précurseurs des EPC, atteignait un pic 7 jours après l'IDM chez l'homme. Le sang périphérique et la moëlle osseuse sont 2 sources distinctes d'EPC et Xin Z et al.[236] ont montré que les EPC circulantes semblaient être les plus appropriées dans la thérapie cellulaire post IDM. En effet, ces EPC auraient de meilleures capacités de prolifération, de migration et de néovascularisation que les EPC provenant de la moëlle osseuse. Ces données sont en faveur de nos résultats, où l'on a montré que la MCP3 stimulait le recrutement des EPC circulantes.

L'efficacité de la thérapie cellulaire est souvent limitée par la rétention des cellules greffées dans le tissus ischémié[237]. Chez le rat, il a été montré que l'injection

concomitante d'EPC humaines et de SDF1α améliore la fonction cardiaque après IDM[238]. De nombreuses études ont montré que la stimulation de l'angiogenèse permet de réduire le remodelage ventriculaire délétère après IDM[239, 240]. Récemment, Rengo et al.[241] ont montré que le récepteur adrénergique β2 est impliqué dans la stimulation de l'angiogenèse, permettant ainsi d'améliorer la perfusion myocardique et la fonction cardiaque après IDM. Kobayashi et al.[242] ont démontré que l'ocytocine permet aussi d'améliorer le remodelage ventriculaire post IDM via la stimulation de l'angiogenèse. Toutes ces données révèlent l'intérêt potentiel d'améliorer l'attraction puis la rétention des EPC dans le cœur après IDM.

Dans leur étude, Moore et al.[26] montrent que le recrutement des cellules inflammatoires, telles que les monocytes, participent à l'athérosclérose qui est un facteur responsable de la survenue d'un IDM. Cependant, l'inhibition du recrutement des monocytes ou la stimulation de l'apoptose des macrophages par exemple, ne permet pas d'inhiber la progression de la formation de la plaque d'athérome et augmente la susceptibilité aux organismes infectieux. Les mécanismes d'action des macrophages dans l'athérosclérose ne sont pas encore entièrement élucidés. Nos résultats montrent que les macrophages, dans un contexte inflammatoire, peuvent également avoir un effet bénéfique en recrutant les cellules endothéliales progénitrices.

En conclusion, nos résultats suggèrent que la MCP3 pourrait être un nouvel agent thérapeutique pour améliorer la réparation du tissue cardiaque en stimulant la néovascularisation après IDM. Cette observation suggère aussi l'intérêt potentiel d'une utilisation concomitante de MCP3 et d'EPC pour stimuler la revascularisation après IDM.

Etude n°5 : Effets d'un agoniste A2A / antagoniste A3 des récepteurs à l'adénosine sur la production de MMP-9 par les macrophages et neutrophiles.

Le but de cette étude a été d'effectuer la première phase de l'étude préclinique du PCI, molécule agoniste du récepteur A2A et antagoniste du récepteur A3 à l'adénosine synthétisée par GlaxoSmithKline[243].

Les résultats préliminaires obtenus sont très encourageants, suggérant l'intérêt thérapeutique de cette nouvelle molécule dans le domaine cardiovasculaire.

Les tests in vitro ont tout d'abord confirmé les propriétés agonistiques et antagonistiques du PCI. En effet le PCI a inhibe la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles activés. Ceci est concordant avec les résultats de l'une de nos précédentes études[21] où nous avons montré que l'adénosine inhibe la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles via le récepteur A2A. De plus, nous avons montré que le PCI ne stimule pas la production de MMP-9 par les macrophages latents ou activés. Ceci est également cohérent avec une autre de nos précédentes études[20] où nous avons montré que c'est via le récepteur A3 que l'adénosine stimule la production de MMP-9 par les macrophages.

In vitro, le PCI inhibe la production de MMP-9 chez 2 types cellulaires inflammatoires majeurs: les neutrophiles et les macrophages. Ces 2 types cellulaires sont recrutés et activés sur le site inflammatoire dans les quelques jours suivant un IDM [50]. L'activité de la MMP-9 lors de cette phase aigüe est un déterminant majeur de la dégradation de la matrice extracellulaire et donc du remodelage ventriculaire gauche[5, 66, 244].

Les résultats obtenus in vitro vont permettre de débuter les expériences de la deuxième phase préclinique, l'étape de tests menés sur modèles animaux. En effet, ces données in vitro nous laissent supposer que le PCI pourrait être une molécule cardioprotectrice après IDM en limitant le remodelage ventriculaire de par l'inhibition de la MMP-9.

Il faut reconnaitre que lors de cette étude, il aurait également été intéressant d'étudier d'autres cellules inflammatoires impliquées dans le remodelage ventriculaire,

telles que les fibroblastes, lymphocytes[245, 246] ou mastocytes[247]. Néanmoins, les neutrophiles et les macrophages sont 2 types cellulaires ayant un rôle majeur dans le processus de remodelage car ils sont les seuls à produire de la MMP-9. Cependant, de futures expériences sur d'autres types cellulaires régulant le remodelage devront être réalisées.

Les expériences de pharmacocinétique ont montré que le PCI est éliminé plus rapidement de la circulation systémique lorsqu'il est injecté par voie intraveineuse, comparé à la voie intrapéritonéale. De plus, il a été montré que l'effet bradycardisant de la cytidine injectée par voie intraveineuse chez le rat passe par l'activation du récepteur A2A à l'adénosine[248]. Ces données nous encouragent donc à utiliser la voie intrapéritonéale plutôt que la voie intraveineuse pour de futures études chez l'animal, afin de faciliter la fréquence et le mode d'administration du PCI, et afin d'éviter tout biais hémodynamique.

Avant d'étudier in vivo les effets du PCI sur le remodelage ventriculaire après IDM, il reste à mener une étude de toxicologie pour rechercher d'éventuels effets toxiques et déterminer leur seuil d'apparition.

Des études cliniques ont déjà montré que l'activité MMP-9 est corrélée au pronostic des patients après IDM et que l'activité de cette enzyme pouvait être un marqueur plasmatique du risque d'IC. Au sein de notre laboratoire, Wagner et al.[4] ont montré que le taux de MMP-9 circulante est un facteur prédictif de la survenue de l'IC. Deux ans après IDM, des taux élevés étaient associés à une FE diminuée et un VTD augmenté. Par contre, d'autres marqueurs classiques, tels que le TNF-α, le pro-BNP, la créatine kinase, la protéine C réactive et la MMP-2, n'ont pas été montrés comme étant des facteurs prédictifs de la survenue tardive de l'IC, 2 ans après IDM. Yan et al.[6] ont montré qu'un taux élevé de MMP-9 plasmatique est corrélé à une faible FE et à un fort VTS chez les patients souffrant d'IC. De plus, plus le taux de MMP-9 est élevé chez ces patients, plus la fonction ventriculaire est détériorée. Buralli S et al.[249] ont montré que la mesure des taux plasmatiques de MMP-3 et MMP-9 combinée à l'évaluation de la fonction ventriculaire diastolique par Doppler permet d'améliorer l'évaluation du

pronostic des patients souffrant d'IC systolique. Jong et al.[250] ont également suggéré que le taux et l'activité de la MMP-9 pouvaient être utilisés pour prédire le risque de développement de l'IC chez les patients ayant subi un IDM.

Chez la souris, Moshal et al.[251] ont montré que la délétion génétique de l'activité de la MMP-9 réduisait la dysfonction contractile dans la cadre de l'IC. Ovechkin AV et al.[252] ont montré que dans le modèle de pression post-charge chez la souris, la délétion du gène MMP-9 prévient l'apoptose des cellules endothéliales de l'endocarde, améliore la fonction cardiaque mesurée par échocardiographie (dP/dt augmentée) et prévient la dysfonction endothéliale myocardique.

Toutes ces études cliniques et précliniques, montrent que la MMP-9 est un facteur prédictif du remodelage délétère après IDM et donc de la survenue de l'IC. Son taux étant corrélé positivement à la dysfonction cardiaque, il semble donc utile de trouver de nouvelles molécules capables de réduire l'activité de la MMP-9 après IDM.

Un autre point essentiel à prendre en compte pour les futures études sur l'animal est l'effet vasodilatateur de l'adénosine, médié majoritairement par le récepteur A2a. Cet effet bénéfique, survenant en conditions anoxiques, est largement documenté[253-255] et devra être étudié lors de l'étude des effets du PCI chez l'animal après IDM.

Notre agoniste A2A/antagoniste A3 pourrait donc être un bon agent thérapeutique pour lutter contre le remodelage délétère et ainsi, limiter la survenue de l'IC post IDM.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail a permis de préciser les mécanismes moléculaires et cellulaires des effets de l'adénosine sur le remodelage ventriculaire après IDM.

Dans un premier temps, nous avons travaillé sur le modèle d'infarctus du myocarde chez le rat et surtout, sur les techniques d'imagerie cardiaque et les techniques histologiques et biochimiques permettant la caractérisation et la prédiction du remodelage ventriculaire.

Ces techniques ont permis de mener à bien la seconde étude dans laquelle nous avons montré l'effet bénéfique de l'adénosine après IDM. Après un traitement chronique, l'adénosine a révélé ses propriétés cardioprotectrices en améliorant la contractilité cardiaque, plus particulièrement dans la zone bordant l'IDM qui est une cible thérapeutique majeure dans le remodelage ventriculaire. En effet, c'est dans cette zone que s'opèrent de nombreux changements susceptibles d'aggraver la destruction myocardique après IDM. Il est donc d'intérêt majeur de cibler cette zone afin de maintenir sa fonction tissulaire et à plus large échelle afin d'éviter le remodelage ventriculaire délétère. Nos études histologiques ont montré que cet effet était peut-être dû à une augmentation de l'angiogenèse consécutive à la stimulation du recrutement d'EPC dans la zone bordant l'IDM. Une inhibition de la fibrose et de l'hypertrophie des cardiomyocytes dans les zones saines du cœur pourrait aussi expliquer une partie des mécanismes par lesquels l'adénosine exerce son effet cardioprotecteur.

Nous avons aussi montré que la MCP3 est une cytokine qui stimule le recrutement des EPC via leur CCR1 et augmente l'angiogenèse in vivo. Ces résultats montrent que la MCP3 peut jouer un rôle important dans le traitement du remodelage ventriculaire après IDM. En effet, de nombreuses études ont montré que la néovascularisation du cœur après IDM permet d'améliorer la fonction cardiaque. De plus, le manque de rétention cellulaire dans le tissu ischémié est souvent une limitation à la thérapie cellulaire par les EPC.

C'est pourquoi l'administration de MCP3 concomitante à celle d'EPC pourrait améliorer l'effet angiogénique et ainsi réduire davantage le remodelage ventriculaire délétère après IDM.

Dans la dernière étude, nous avons montré que le PCI, agoniste du récepteur A2A et antagoniste du récepteur A3 à l'adénosine, a des propriétés bénéfiques vis-à-vis de la production de MMP-9 par les neutrophiles et macrophages. Cette molécule permet d'inhiber la sécrétion de MMP-9 par les neutrophiles et elle permet de ne pas stimuler la production de MMP-9 par les macrophages activés. Or il est connu que l'activité de cette enzyme est corrélée positivement au remodelage ventriculaire délétère après IDM. Le PCI est donc une cible thérapeutique très prometteuse dans le cadre du remodelage ventriculaire après IDM.

Ce travail de thèse a donc permis d'identifier de nouveaux candidats pour la thérapie du remodelage ventriculaire après IDM :

1) L'adénosine, qui permet d'améliorer la contractilité de la zone bordant l'IDM, territoire cible dans le cadre de la thérapie cellulaire après IDM.
2) La MCP3, qui permet de stimuler le recrutement des EPC et de stimuler l'angiogenèse, mécanisme indissociable de l'amélioration de la fonction cardiaque après IDM.
3) Le PCI, qui pourrait inhiber le remodelage ventriculaire délétère en inhibant l'activité MMP-9 dans le cœur après IDM.

D'autre part, l'imagerie par TEP au 18F-FDG s'est révélée être un outil précieux pour caractériser l'IDM et suivre le remodelage ventriculaire chez le rat de façon non invasive. Cette technique permet de mesurer les paramètres cardiaques tout en étant capable de distinguer la zone bordant l'IDM des zones saine et nécrosée du cœur. Dans le cadre de la thérapie cellulaire, la TEP permet donc de cibler la zone bordant l'IDM et d'y mesurer l'évolution des paramètres cardiaques (viabilité, contractilité globale et segmentaire).

BIBLIOGRAPHIE

1. Vaur L, Danchin N, Genes N, Dubroca I, Etienne S, Ferrieres J, Cambou JP. Epidemiology of myocardial infarction in france: Therapeutic and prognostic implications of heart failure during the acute phase. *American heart journal*. 1999;137:49-58
2. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiological reviews*. 1999;79:215-262
3. Yang DC, Ma ST, Tan Y, Chen YH, Li D, Tang B, Chen JS, Su XH, Li G, Zhang X, Yang YJ. Imbalance of matrix metalloproteinases/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and loss of fibronectin expression in patients with congestive heart failure. *Cardiology*.116:133-141
4. 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. *Journal of cardiac failure*. 2006;12:66-72
5. Spinale FG. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function. *Physiological reviews*. 2007;87:1285-1342
6. Yan AT, Yan RT, Spinale FG, Afzal R, Gunasinghe HR, Arnold M, Demers C, McKelvie RS, Liu PP. Plasma matrix metalloproteinase-9 level is correlated with left ventricular volumes and ejection fraction in patients with heart failure. *Journal of cardiac failure*. 2006;12:514-519
7. Konstam MA, Udelson JE, Anand IS, Cohn JN. Ventricular remodeling in heart failure: A credible surrogate endpoint. *Journal of cardiac failure*. 2003;9:350-353
8. Anand IS, Florea VG, Solomon SD, Konstam MA, Udelson JE. Noninvasive assessment of left ventricular remodeling: Concepts, techniques, and implications for clinical trials. *Journal of cardiac failure*. 2002;8:S452-464
9. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*. 1987;76:44-51
10. Berne RM. Cardiac nucleotides in hypoxia: Possible role in regulation of coronary blood flow. *The american journal of physiology*. 1963;204:317-322
11. Gessi S, Merighi S, Varani K, Borea PA. Adenosine receptors in health and disease. *Advances in pharmacology*.61:41-75
12. Headrick JP, Peart JN, Reichelt ME, Haseler LJ. Adenosine and its receptors in the heart: Regulation, retaliation and adaptation. *Biochimica et biophysica acta*.1808:1413-1428
13. Trincavelli ML, Daniele S, Martini C. Adenosine receptors: What we know and what we are learning. *Current topics in medical chemistry*.10:860-877
14. Desmet W, Bogaert J, Dubois C, Sinnaeve P, Adriaenssens T, Pappas C, Ganame J, Dymarkowski S, Janssens S, Belmans A, Van de Werf F. High-dose intracoronary adenosine for myocardial salvage in patients with acute st-segment elevation myocardial infarction. *European heart journal*.
15. Fokkema ML, Vlaar PJ, Vogelzang M, Gu YL, Kampinga MA, de Smet BJ, Jessurun GA, Anthonio RL, van den Heuvel AF, Tan ES, Zijlstra F. Effect of high-dose intracoronary adenosine administration during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: A randomized controlled trial. *Circulation. Cardiovascular intervention*. 2009;2:323-329
16. Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, DiCarli MF, Leesar MA, Browne KF, Eisenberg PR, Bolli R, Casas AC, Molina-Viamonte V, Orlandi C, Blevins R, Gibbons RJ, Califf RM, Granger CB. 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. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999;34:1711-1720
17. Wakeno M, Minamino T, Seguchi O, Okazaki H, Tsukamoto O, Okada K, Hirata A, Fujita M, Asanuma H, Kim J, Komamura K, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. Long-term stimulation of adenosine a2b receptors begun after myocardial infarction prevents cardiac remodeling in rats. *Circulation*. 2006;114:1923-1932
18. Wagner DR, Combes A, McTiernan C, Sanders VJ, Lemster B, Feldman AM. Adenosine inhibits lipopolysaccharide-induced cardiac expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation research*. 1998;82:47-56
19. 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. *The american journal of physiology*. 1999;276:H2141-2147
20. 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;80:246-254
21. 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;99:590-597
22. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB. Executive summary: Heart disease and stroke statistics--2012 update: A report from the american heart association. *Circulation*.125:188-197
23. Torabi A, Cleland JG, Khan NK, Loh PH, Clark AL, Alamgir F, Caplin JL, Rigby AS, Goode K. The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction. *European heart journal*. 2008;29:859-870
24. Ezekowitz JA, Kaul P, Bakal JA, Armstrong PW, Welsh RC, McAlister FA. Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53:13-20
25. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317-325
26. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145:341-355
27. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nature medicine*. 2011;17:1410-1422
28. Armstrong PW, Collen D, Antman E. Fibrinolysis for acute myocardial infarction: The future is here and now. *Circulation*. 2003;107:2533-2537
29. He W, Zhang L, Ni A, Zhang Z, Mirotsou M, Mao L, Pratt RE, Dzau VJ. Exogenously administered secreted frizzled related protein 2 (sfrp2) reduces fibrosis and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107:21110-21115
30. Obana M, Maeda M, Takeda K, Hayama A, Mohri T, Yamashita T, Nakaoka Y, Komuro I, Takeda K, Matsumiya G, Azuma J, Fujio Y. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation*. 2010;121:684-691

31. Jugdutt BI. Limiting fibrosis after myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2009;360:1567-1569
32. van Rooij E, Sutherland LB, Thatcher JE, DiMaio JM, Naseem RH, Marshall WS, Hill JA, Olson EN. Dysregulation of micrornas after myocardial infarction reveals a role of mir-29 in cardiac fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105:13027-13032
33. Mirotsou M, Dzau VJ, Pratt RE, Weinberg EO. Physiological genomics of cardiac disease: Quantitative relationships between gene expression and left ventricular hypertrophy. *Physiological genomics*. 2006;27:86-94
34. Tanaka N, Ryoke T, Hongo M, Mao L, Rockman HA, Clark RG, Ross J, Jr. Effects of growth hormone and igf-i on cardiac hypertrophy and gene expression in mice. *The american journal of physiology*. 1998;275:H393-399
35. Rockman HA, Wachhorst SP, Mao L, Ross J, Jr. Ang ii receptor blockade prevents ventricular hypertrophy and anf gene expression with pressure overload in mice. *The american journal of physiology*. 1994;266:H2468-2475
36. Fraccarollo D, Galuppo P, Hildemann S, Christ M, Ertl G, Bauersachs J. Additive improvement of left ventricular remodeling and neurohormonal activation by aldosterone receptor blockade with eplerenone and ace inhibition in rats with myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42:1666-1673
37. Nakamura Y, Yoshiyama M, Omura T, Yoshida K, Izumi Y, Takeuchi K, Kim S, Iwao H, Yoshikawa J. Beneficial effects of combination of ace inhibitor and angiotensin ii type 1 receptor blocker on cardiac remodeling in rat myocardial infarction. *Cardiovascular research*. 2003;57:48-54
38. Konishi M, Haraguchi G, Yoshikawa S, Kimura S, Inagaki H, Isobe M. Additive effects of beta-blockers on renin-angiotensin system inhibitors for patients after acute myocardial infarction treated with primary coronary revascularization. *Circulation journal*. 2011;75:1982-1991
39. Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, Witt H, Kararigas G, Dworatzek E, Staub E, Martus P, Ruiz Noppinger P, Kintscher U, Gustafsson JA, Regitz-Zagrosek V. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *The american journal of physiology*. 2010;298:R1597-1606
40. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circulation research*. 1985;57:84-95
41. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161-1172
42. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: A consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology*. 2000;35:569-582
43. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: A corollary to infarct expansion. *Circulation*. 1986;74:693-702
44. Eaton LW, Weiss JL, Bulkley BH, Garrison JB, Weisfeldt ML. Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: Recognition by two-dimensional echocardiography. *The New England journal of medicine*. 1979;300:57-62
45. Mann DL. Mechanisms and models in heart failure: A combinatorial approach. *Circulation*. 1999;100:999-1008

46. Mann DL, Taegtmeyer H. Dynamic regulation of the extracellular matrix after mechanical unloading of the failing human heart: Recovering the missing link in left ventricular remodeling. *Circulation*. 2001;104:1089-1091
47. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE. Left ventricular remodeling in heart failure: Current concepts in clinical significance and assessment. *Journal of the American College of Cardiology. Cardiovasc Imaging*.4:98-108
48. Singh V, Martinezclark P, Pascual M, Shaw ES, O'Neill WW. Cardiac biomarkers - the old and the new: A review. *Coronary artery Diseases*.21:244-256
49. Hochholzer W, Morrow DA, Giugliano RP. Novel biomarkers in cardiovascular disease: Update 2010. *American heart journal*.160:583-594
50. Matsui Y, Morimoto J, Uede T. Role of matricellular proteins in cardiac tissue remodeling after myocardial infarction. *World journal of biological chemistry*.1:69-80
51. Rutschow S, Li J, Schultheiss HP, Pauschinger M. Myocardial proteases and matrix remodeling in inflammatory heart disease. *Cardiovasc Res*. 2006;69:646-656
52. Lee PY, Kumagai Y, Xu Y, Li Y, Barker T, Liu C, Sobel ES, Takeuchi O, Akira S, Satoh M, Reeves WH. Il-1alpha modulates neutrophil recruitment in chronic inflammation induced by hydrocarbon oil. *Journal of immunology*. 2011;186:1747-1754
53. Roussel L, Houle F, Chan C, Yao Y, Berube J, Olivenstein R, Martin JG, Huot J, Hamid Q, Ferri L, Rousseau S. Il-17 promotes p38 mapk-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *Journal of immunology*. 2010;184:4531-4537
54. Zarpelon AC, Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Carregaro V, Souza GR, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ, Verri WA, Jr. Endothelin-1 induces neutrophil recruitment in adaptive inflammation via tnfalpha and cxcl1/cxcr2 in mice. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 2012;90:187-199
55. Lindsey ML, Mann DL, Entman ML, Spinale FG. Extracellular matrix remodeling following myocardial injury. *Annals in medicine*. 2003;35:316-326
56. Lindsey M, Wedin K, Brown MD, Keller C, Evans AJ, Smolen J, Burns AR, Rossen RD, Michael L, Entman M. Matrix-dependent mechanism of neutrophil-mediated release and activation of matrix metalloproteinase 9 in myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*. 2001;103:2181-2187
57. van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: Matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovascular research*. 2008;78:203-212
58. Boettger T, Braun T. A new level of complexity: The role of micrornas in cardiovascular development. *Circulation research*. 2012;110:1000-1013
59. Emilian C, Goretti E, Prospert F, Pouthier D, Duhoux P, Gilson G, Devaux Y, Wagner DR. Micrornas in patients on chronic hemodialysis (minos study). *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2012;7:619-623
60. Devaux Y, Vausort M, Azuaje F, Vaillant M, Lair M, Gayat E, Lassus J, Ng L, Kelly D, Wagner D, Squire I. Low levels of vascular endothelial growth factor b predict left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Journal of cardiac failure*. 2012;18:330-337
61. Wardas J. Potential role of adenosine a2a receptors in the treatment of schizophrenia. *Frontiers in biosciences*. 2008;13:4071-4096
62. Reed W, Weiss KR, Lloyd PE, Kupfermann I, Chen M, Bailey CH. Association of neuroactive peptides with the protein secretory pathway in identified neurons of aplysia californica: Immunolocalization of scpa and scpb to the contents of dense-core vesicles

and the trans face of the golgi apparatus. *The Journal of comparative neurology*. 1988;272:358-369
63. Carlin RW, Lee JH, Marcus DC, Schultz BD. Adenosine stimulates anion secretion across cultured and native adult human vas deferens epithelia. *Biol Reprod*. 2003;68:1027-1034
64. 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
65. Brumley CL, Kuhn JA. Radiolabeled monoclonal antibodies. *AORN journal*. 1995;62:343-350, 353-345; quiz 356-348, 361-342
66. Spinale FG. Matrix metalloproteinases: Regulation and dysregulation in the failing heart. *Circulation research*. 2002;90:520-530
67. Headrick JP, Peart JN, Reichelt ME, Haseler LJ. Adenosine and its receptors in the heart: Regulation, retaliation and adaptation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2011;1808:1413-1428
68. Lloyd HG, Deussen A, Wuppermann H, Schrader J. The transmethylation pathway as a source for adenosine in the isolated guinea-pig heart. *Biochemical journal*. 1988;252:489-494
69. Antonioli L, Fornai M, Colucci R, Ghisu N, Tuccori M, Del Tacca M, Blandizzi C. Pharmacological modulation of adenosine system: Novel options for treatment of inflammatory bowel diseases. *Inflammation bowel diseases*. 2008;14:566-574
70. Kroll K, Decking UK, Dreikorn K, Schrader J. Rapid turnover of the amp-adenosine metabolic cycle in the guinea pig heart. *Circulation research*. 1993;73:846-856
71. Kumar V, Sharma A. Adenosine: An endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *European journal of pharmacology*. 2009;616:7-15
72. Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cellular signalling*. 2003;15:813-827
73. Fredholm BB. Adenosine receptors as drug targets. *Experimental cell research*. 2010;316:1284-1288
74. Ely SW, Berne RM. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation*. 1992;85:893-904
75. 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
76. Headrick JP, Hack B, Ashton KJ. Acute adenosinergic cardioprotection in ischemic-reperfused hearts. *The american journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2003;285:H1797-1818
77. 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
78. 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
79. Loh E, Rebbeck TR, Mahoney PD, DeNofrio D, Swain JL, Holmes EW. Common variant in ampd1 gene predicts improved clinical outcome in patients with heart failure. *Circulation*. 1999;99:1422-1425
80. 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). *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45:1775-1780

81. Desmet W, Bogaert J, Dubois C, Sinnaeve P, Adriaenssens T, Pappas C, Ganame J, Dymarkowski S, Janssens S, Belmans A, Van de Werf F. High-dose intracoronary adenosine for myocardial salvage in patients with acute st-segment elevation myocardial infarction. *European heart journal*. 2011;32:867-877
82. McIntosh VJ, Lasley RD. Adenosine receptor-mediated cardioprotection: Are all 4 subtypes required or redundant? *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2012;17:21-33
83. Villarreal F, Zimmermann S, Makhsudova L, Montag AC, Erion MD, Bullough DA, Ito BR. Modulation of cardiac remodeling by adenosine: In vitro and in vivo effects. *Molecular and cellular biochemistry*. 2003;251:17-26
84. Wagner DR, Devaux Y. Playing hide and seek with adenosine receptors. *Clinical and Translational Science*. 2008;1:133-135
85. 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. *Clinical and Translational Science*. 2008;1:126-133
86. Funakoshi H, Zacharia LC, Tang Z, Zhang J, Lee LL, Good JC, Herrmann DE, Higuchi Y, Koch WJ, Jackson EK, Chan TO, Feldman AM. A1 adenosine receptor upregulation accompanies decreasing myocardial adenosine levels in mice with left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2007;115:2307-2315
87. Funakoshi H, Chan TO, Good JC, Libonati JR, Piuhola 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;114:2240-2250
88. 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. *The american journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2001;281:H1751-1758
89. Harrison GJ, Cerniway RJ, Peart J, Berr SS, Ashton K, Regan S, Paul Matherne G, Headrick JP. Effects of a(3) adenosine receptor activation and gene knock-out in ischemic-reperfused mouse heart. *Cardiovascular research*. 2002;53:147-155
90. Hagymasi K, Reismann P, Racz K, Tulassay Z. [role of the endocrine system in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease]. *Orvosi hetilap*. 2009;150:2173-2181
91. Matsuura K, Honda A, Nagai T, Fukushima N, Iwanaga K, Tokunaga M, Shimizu T, Okano T, Kasanuki H, Hagiwara N, Komuro I. Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119:2204-2217
92. Huang C, Gu H, Yu Q, Manukyan MC, Poynter JA, Wang M. Sca-1+ cardiac stem cells mediate acute cardioprotection via paracrine factor sdf-1 following myocardial ischemia/reperfusion. *PLoS One*. 2011;6:e29246
93. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*. 2001;103:634-637
94. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for

therapeutic neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97:3422-3427
95. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature medicine*. 2001;7:430-436
96. Jujo K, Ii M, Losordo DW. Endothelial progenitor cells in neovascularization of infarcted myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2008;45:530-544
97. Ryzhov S, Solenkova NV, Goldstein AE, Lamparter M, Fleenor T, Young PP, Greelish JP, Byrne JG, Vaughan DE, Biaggioni I, Hatzopoulos AK, Feoktistov I. Adenosine receptor-mediated adhesion of endothelial progenitors to cardiac microvascular endothelial cells. *Circulation research*. 2008;102:356-363
98. Azuaje FJ, Wang H, Zheng H, Leonard F, Rolland-Turner M, Zhang L, Devaux Y, Wagner DR. Predictive integration of gene functional similarity and co-expression defines treatment response of endothelial progenitor cells. *BMC Systems biology*. 2011;5:46
99. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circulation research*. 1979;44:503-512
100. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Bulkley BH. Global cardiac remodeling after acute myocardial infarction: A study in the rat model. *Journal of the American College of Cardiology*. 1985;5:1355-1362
101. Lamas GA, Pfeffer MA. Increased left ventricular volume following myocardial infarction in man. *American heart journal*. 1986;111:30-35
102. Chareonthaitawee P, Christian TF, Hirose K, Gibbons RJ, Rumberger JA. Relation of initial infarct size to extent of left ventricular remodeling in the year after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 1995;25:567-573
103. van Gilst WH, Kingma JH, Peels KH, Dambrink JH, St John Sutton M. Which patient benefits from early angiotensin-converting enzyme inhibition after myocardial infarction? Results of one-year serial echocardiographic follow-up from the captopril and thrombolysis study (cats). *Journal of the American College of Cardiology*. 1996;28:114-121
104. Solomon SD, Glynn RJ, Greaves S, Ajani U, Rouleau JL, Menapace F, Arnold JM, Hennekens C, Pfeffer MA. Recovery of ventricular function after myocardial infarction in the reperfusion era: The healing and early afterload reducing therapy study. *Annals of internal medicine*. 2001;134:451-458
105. Maskali F, Franken PR, Poussier S, Tran N, Vanhove C, Boutley H, Le Gall H, Karcher G, Zannad F, Lacolley P, Marie PY. Initial infarct size predicts subsequent cardiac remodeling in the rat infarct model: An in vivo serial pinhole gated spect study. *Journal of nuclear medicine*. 2006;47:337-344
106. Li Y, Wang Y, Kim E, Beemiller P, Wang CY, Swanson J, You M, Guan KL. Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with rheb. *The Journal of biological chemistry*. 2007;282:35803-35813
107. Townsend DW. A combined pet/ct scanner: The choices. *Journal of nuclear medicine*. 2001;42:533-534
108. Nigam V, Sievers HH, Jensen BC, Sier HA, Simpson PC, Srivastava D, Mohamed SA. Altered micrornas in bicuspid aortic valve: A comparison between stenotic and insufficient valves. *The Journal of heart valve disease*. 2010;19:459-465

109. Segall G. Assessment of myocardial viability by positron emission tomography. *Nuclear medicine communications*. 2002;23:323-330
110. Slart RH, Bax JJ, van Veldhuisen DJ, van der Wall EE, Dierckx RA, Jager PL. Imaging techniques in nuclear cardiology for the assessment of myocardial viability. International journal of cardiovascular imaging. 2006;22:63-80
111. Villar AV, Merino D, Wenner M, Llano M, Cobo M, Montalvo C, García R, Martín-Durán R, Hurlé JM, Hurlé MA, Nistal JF. Myocardial gene expression of microrna-133a and myosin heavy and light chains, in conjunction with clinical parameters, predict regression of left ventricular hypertrophy after valve replacement in patients with aortic stenosis. *Heart (British Cardiac Society)*. 2011;97:1132-1137
112. Visser EP, Disselhorst JA, Brom M, Laverman P, Gotthardt M, Oyen WJ, Boerman OC. Spatial resolution and sensitivity of the inveon small-animal pet scanner. *Journal of nuclear medicine*. 2009;50:139-147
113. Poussier S, Maskali F, Tran N, Person C, Maureira P, Boutley H, Karcher G, Lacolley P, Regnault V, Fay R, Marie PY. Ecg-triggered (18)f-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of the rat heart is dramatically enhanced by acipimox. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2010;37:1745-1750
114. Farrell BC, Power EM, Mc Dermott KW. Developmentally regulated expression of sox9 and microrna s 124, 128 and 23 in neuroepithelial stem cells in the developing spinal cord. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 2011;29:31-36
115. Poussier S, Maskali F, Tran N, Person C, Maureira P, Boutley H, Karcher G, Lacolley P, Regnault V, Fay R, Marie PY. Ecg-triggered 18f-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of the rat heart is dramatically enhanced by acipimox. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2010;37:1745-1750
116. Gould KL, Yoshida K, Hess MJ, Haynie M, Mullani N, Smalling RW. Myocardial metabolism of fluorodeoxyglucose compared to cell membrane integrity for the potassium analogue rubidium-82 for assessing infarct size in man by pet. *Journal of nuclear medicine*. 1991;32:1-9
117. Knuuti MJ, Yki-Jarvinen H, Voipio-Pulkki LM, Maki M, Ruotsalainen U, Harkonen R, Teras M, Haaparanta M, Bergman J, Hartiala J, et al. Enhancement of myocardial [fluorine-18]fluorodeoxyglucose uptake by a nicotinic acid derivative. *Journal of nuclear medicine*. 1994;35:989-998
118. Bax JJ, Veening MA, Visser FC, van Lingen A, Heine RJ, Cornel JH, Visser CA. Optimal metabolic conditions during fluorine-18 fluorodeoxyglucose imaging; a comparative study using different protocols. *European Journal of nuclear medicine*. 1997;24:35-41
119. Bax JJ, Visser FC, Poldermans D, Van Lingen A, Elhendy A, Boersma E, Sloof GW, Visser CA. Safety and feasibility of cardiac fdg spect following oral administration of acipimox, a nicotinic acid derivative: Comparison of image quality with hyperinsulinemic euglycemic clamping in nondiabetic patients. *Journal of nuclear cardiology*. 2002;9:587-593
120. Schroder O, Hor G, Hertel A, Baum RP. Combined hyperinsulinaemic glucose clamp and oral acipimox for optimizing metabolic conditions during 18f-fluorodeoxyglucose gated pet cardiac imaging: Comparative results. *Nuclear medicine communications*. 1998;19:867-874
121. Lagendijk AK, Goumans MJ, Burkhard SB, Bakkers J. Microrna-23 restricts cardiac valve formation by inhibiting has2 and extracellular hyaluronic acid production. *Circulation research*. 2011;109:649-657

122. Phelps ME, Hoffman EJ, Mullani NA, Ter-Pogossian MM. Application of annihilation coincidence detection to transaxial reconstruction tomography. *Journal of nuclear medicine*. 1975;16:210-224
123. Bousquenaud M, Maskali F, Poussier S, Marie PY, Boutley H, Karcher G, Wagner DR, Devaux Y. Acipimox-enhanced (18)f-fluorodeoxyglucose positron emission tomography for characterizing and predicting early remodeling in the rat infarct model. International journal of cardiovascular imaging.
124. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, Pennell DJ, Rumberger JA, Ryan T, Verani MS. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: A statement for healthcare professionals from the cardiac imaging committee of the council on clinical cardiology of the american heart association. *Circulation*. 2002;105:539-542
125. Song YJ, Tian XB, Zhang S, Zhang YX, Li X, Li D, Cheng Y, Zhang JN, Kang CS, Zhao W. Temporal lobe epilepsy induces differential expression of hippocampal mirnas including let-7e and mir-23a/b. *Brain Research*. 2011;1387:134-140
126. Abdellatif M. The role of microrna-133 in cardiac hypertrophy uncovered. *Circulation research*. 2010;106:16-18
127. Wu MC, Gao DW, Sievers RE, Lee RJ, Hasegawa BH, Dae MW. Pinhole single-photon emission computed tomography for myocardial perfusion imaging of mice. *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;42:576-582
128. Higuchi T, Nekolla SG, Jankaukas A, Weber AW, Huisman MC, Reder S, Ziegler SI, Schwaiger M, Bengel FM. Characterization of normal and infarcted rat myocardium using a combination of small-animal pet and clinical mri. *Journal of nuclear medicine*. 2007;48:288-294
129. Moura MD, Navarro PA, Silva de Sa MF, Ferriani RA, Unzer SM, Reis RM. Hypogonadotropic hypogonadism: Retrospective analysis of 19 cases. *International journal of gynaecology and obtetrics*. 2000;71:141-145
130. Zhang Z, Tang H, Wang Z, Zhang B, Liu W, Lu H, Xiao L, Liu X, Wang R, Li X, Wu M, Li G. Mir-185 targets the DNA methyltransferases 1 and regulates global DNA methylation in human glioma. *Molecular cancer*. 2011;10:124
131. Yan AT, Shayne AJ, Brown KA, Gupta SN, Chan CW, Luu TM, Di Carli MF, Reynolds HG, Stevenson WG, Kwong RY. Characterization of the peri-infarct zone by contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging is a powerful predictor of post-myocardial infarction mortality. *Circulation*. 2006;114:32-39
132. Tsang JS, Ebert MS, van Oudenaarden A. Genome-wide dissection of microrna functions and cotargeting networks using gene set signatures. *Mol Cell*. 2010;38:140-153
133. Safdar A, Abadi A, Akhtar M, Hettinga BP, Tarnopolsky MA. Mirna in the regulation of skeletal muscle adaptation to acute endurance exercise in c57bl/6j male mice. *PLoS One*. 2009;4:e5610
134. Marcus NJ, Olson EB, Jr., Bird CE, Philippi NR, Morgan BJ. Time-dependent adaptation in the hemodynamic response to hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*. 2009;165:90-96
135. Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity. *New England Journal of Medicine*. 2008;358:1370-1380
136. Rehwald WG, Wagner A, Sievers B, Kim RJ, Judd RM. Cardiovascular mri: Its current and future use in clinical practice. *Expert review of cardiovascular therapy*. 2007;5:307-321
137. Stuber M, Weiss RG. Coronary magnetic resonance angiography. *Journal of magnetic resonance imaging*. 2007;26:219-234

138. Liao JM, Lu H. Autoregulatory suppression of c-myc by mir-185-3p. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:33901-33909
139. Zhang L, Liu Y, Song F, Zheng H, Hu L, Lu H, Liu P, Hao X, Zhang W, Chen K. Functional snp in the microrna-367 binding site in the 3'utr of the calcium channel ryanodine receptor gene 3 (ryr3) affects breast cancer risk and calcification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:13653-13658
140. Gao C, Zhang Z, Liu W, Xiao S, Gu W, Lu H. Reduced microrna-218 expression is associated with high nuclear factor kappa b activation in gastric cancer. *Cancer*. 2010;116:41-49
141. Li Q, Song XW, Zou J, Wang GK, Kremneva E, Li XQ, Zhu N, Sun T, Lappalainen P, Yuan WJ, Qin YW, Jing Q. Attenuation of microrna-1 derepresses the cytoskeleton regulatory protein twinfilin-1 to provoke cardiac hypertrophy. *Journal of cell science*. 2010;123:2444-2452
142. Hirai T, Nohara R, Ogoh S, Chen LG, Kataoka K, Li XH, Fujita M, Matsumori A, Taguchi S, Sasayama S. Serial evaluation of fatty acid metabolism in rats with myocardial infarction by pinhole spect. *Journal of nuclear cardiology*. 2001;8:472-481
143. Lautamaki R, Schuleri KH, Sasano T, Javadi MS, Youssef A, Merrill J, Nekolla SG, Abraham MR, Lardo AC, Bengel FM. Integration of infarct size, tissue perfusion, and metabolism by hybrid cardiac positron emission tomography/computed tomography: Evaluation in a porcine model of myocardial infarction. *Circulation. Cardiovascular imaging*. 2009;2:299-305
144. Lee WW, Marinelli B, van der Laan AM, Sena BF, Gorbatov R, Leuschner F, Dutta P, Iwamoto Y, Ueno T, Begieneman MP, Niessen HW, Piek JJ, Vinegoni C, Pittet MJ, Swirski FK, Tawakol A, Di Carli M, Weissleder R, Nahrendorf M. Pet/mri of inflammation in myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59:153-163
145. Fortney K, Kotlyar M, Jurisica I. Inferring the functions of longevity genes with modular subnetwork biomarkers of caenorhabditis elegans aging. *Genome biology*. 2010;11:R13
146. Germano G, Kiat H, Kavanagh PB, Moriel M, Mazzanti M, Su HT, Van Train KF, Berman DS. Automatic quantification of ejection fraction from gated myocardial perfusion spect. *Journal of nuclear medicine*. 1995;36:2138-2147
147. Germano G, Kavanagh PB, Berman DS. An automatic approach to the analysis, quantitation and review of perfusion and function from myocardial perfusion spect images. *International journal of cardiac imaging*. 1997;13:337-346
148. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, Jacobs AK, Kaul S, Laskey WK, Pennell DJ, Rumberger JA, Ryan T, Verani MS. Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart. A statement for healthcare professionals from the cardiac imaging committee of the council on clinical cardiology of the american heart association. International journal of cardiovascular imaging. 2002;18:539-542
149. Marie PY, Djaballah W, Franken PR, Vanhove C, Muller MA, Boutley H, Poussier S, Olivier P, Karcher G, Bertrand A. Osem reconstruction, associated with temporal fourier and depth-dependant resolution recovery filtering, enhances results from sestamibi and 201tl 16-interval gated spect. *Journal of nuclear medicine*. 2005;46:1789-1795
150. Slart RH, Bax JJ, van Veldhuisen DJ, van der Wall EE, Irwan R, Sluiter WJ, Dierckx RA, de Boer J, Jager PL. Prediction of functional recovery after revascularization in patients with chronic ischaemic left ventricular dysfunction: Head-to-head comparison between 99mtc-sestamibi/18f-fdg disa spect and 13n-ammonia/ 18f-fdg pet. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2006;33:716-723

151. Soeki T, Kishimoto I, Okumura H, Tokudome T, Horio T, Mori K, Kangawa K. C-type natriuretic peptide, a novel antifibrotic and antihypertrophic agent, prevents cardiac remodeling after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;45:608-616
152. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, Pick R, Shroff SG, Weber KT. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circulation research*. 1989;64:1041-1050
153. Schmidt M, Voth E, Schneider CA, Theissen P, Wagner R, Baer FM, Schicha H. F-18-fdg uptake is a reliable predictory of functional recovery of akinetic but viable infarct regions as defined by magnetic resonance imaging before and after revascularization. *Magnetic resonance imaging*. 2004;22:229-236
154. Baer FM, Voth E, Schneider CA, Theissen P, Schicha H, Sechtem U. Comparison of low-dose dobutamine-gradient-echo magnetic resonance imaging and positron emission tomography with [18f]fluorodeoxyglucose in patients with chronic coronary artery disease. A functional and morphological approach to the detection of residual myocardial viability. *Circulation*. 1995;91:1006-1015
155. Brunken R, Tillisch J, Schwaiger M, Child JS, Marshall R, Mandelkern M, Phelps ME, Schelbert HR. Regional perfusion, glucose metabolism, and wall motion in patients with chronic electrocardiographic q wave infarctions: Evidence for persistence of viable tissue in some infarct regions by positron emission tomography. *Circulation*. 1986;73:951-963
156. Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation*. 1988;78:186-201
157. Chavakis E, Carmona G, Urbich C, Gottig S, Henschler R, Penninger JM, Zeiher AM, Chavakis T, Dimmeler S. Phosphatidylinositol-3-kinase-gamma is integral to homing functions of progenitor cells. *Circulation research*. 2008;102:942-949
158. Azuaje FJ, Wang H, Zheng H, Leonard F, Rolland-Turner M, Zhang L, Devaux Y, Wagner DR. Predictive integration of gene functional similarity and co-expression defines treatment response of endothelial progenitor cells. *BMC Systems biology*.5:46
159. Devaux Y, Azuaje F, Vausort M, Yvorra C, Wagner DR. Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction. *Functional and iIntegrative genomics*.10:329-337
160. Le Brigand K, Russell R, Moreilhon C, Rouillard JM, Jost B, Amiot F, Magnone V, Bole-Feysot C, Rostagno P, Virolle V, Defamie V, Dessen P, Williams G, Lyons P, Rios G, Mari B, Gulari E, Kastner P, Gidrol X, Freeman TC, Barbry P. An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes. *Nucleic acids research*. 2006;34:e87
161. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98:5116-5121
162. Saldanha AJ. Java treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2004;20:3246-3248
163. de Hoon MJ, Imoto S, Nolan J, Miyano S. Open source clustering software. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2004;20:1453-1454
164. Ceconi C, Comini L, Suffredini S, Stillitano F, Bouly M, Cerbai E, Mugelli A, Ferrari R. Heart rate reduction with ivabradine prevents the global phenotype of left ventricular remodeling. *The american journal of physiology Heart Circ Physiol*. 2010;300:H366-373

165. Tran N, Franken PR, Maskali F, Nloga J, Maureira P, Poussier S, Groubatch F, Vanhove C, Villemot JP, Marie PY. Intramyocardial implantation of bone marrow-derived stem cells enhances perfusion in chronic myocardial infarction: Dependency on initial perfusion depth and follow-up assessed by gated pinhole spect. *Journal of nuclear medicine*. 2007;48:405-412
166. McCallister BD, Jr., Christian TF, Gersh BJ, Gibbons RJ. Prognosis of myocardial infarctions involving more than 40% of the left ventricle after acute reperfusion therapy. *Circulation*. 1993;88:1470-1475
167. Homans DC, Asinger R, Elsperger KJ, Erlien D, Sublett E, Mikell F, Bache RJ. Regional function and perfusion at the lateral border of ischemic myocardium. *Circulation*. 1985;71:1038-1047
168. Fahling M, Perlewitz A, Doller A, Thiele BJ. Regulation of collagen prolyl 4-hydroxylase and matrix metalloproteinases in fibrosarcoma cells by hypoxia. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*. 2004;139:119-126
169. Monceau V, Belikova Y, Kratassiouk G, Robidel E, Russo-Marie F, Charlemagne D. Myocyte apoptosis during acute myocardial infarction in rats is related to early sarcolemmal translocation of annexin a5 in border zone. *The american journal of physiology Heart Circ Physiol*. 2006;291:H965-971
170. Wang X, Jameel MN, Li Q, Mansoor A, Qiang X, Swingen C, Panetta C, Zhang J. Stem cells for myocardial repair with use of a transarterial catheter. *Circulation*. 2009;120:S238-246
171. Tao Z, Chen B, Tan X, Zhao Y, Wang L, Zhu T, Cao K, Yang Z, Kan YW, Su H. Coexpression of vegf and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (mi) heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:2064-2069
172. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*. 2004;110:3300-3305
173. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, Capla JM, Galiano RD, Levine JP, Gurtner GC. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through hif-1 induction of sdf-1. *Nature medicine*. 2004;10:858-864
174. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood*. 2005;106:1901-1910
175. Povsic TJ, Zavodni KL, Kelly FL, Zhu S, Goldschmidt-Clermont PJ, Dong C, Peterson ED. Circulating progenitor cells can be reliably identified on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007;50:2243-2248
176. Capoccia BJ, Robson DL, Levac KD, Maxwell DJ, Hohm SA, Neelamkavil MJ, Bell GI, Xenocostas A, Link DC, Piwnica-Worms D, Nolta JA, Hess DA. Revascularization of ischemic limbs after transplantation of human bone marrow cells with high aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*. 2009;113:5340-5351
177. Sondergaard CS, Hess DA, Maxwell DJ, Weinheimer C, Rosova I, Creer MH, Piwnica-Worms D, Kovacs A, Pedersen L, Nolta JA. Human cord blood progenitors with high aldehyde dehydrogenase activity improve vascular density in a model of acute myocardial infarction. *Journal of translational medicine*. 2010;8:24

178. Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, McCarthy PM, Penn MS. Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2007;25:245-251
179. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, Pamer EG. Additive roles for mcp-1 and mcp-3 in ccr2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during listeria monocytogenes infection. *Journal of immunology*. 2008;180:6846-6853
180. Si Y, Tsou CL, Croft K, Charo IF. Ccr2 mediates hematopoietic stem and progenitor cell trafficking to sites of inflammation in mice. *The Journal of clinical investigation*.120:1192-1203
181. Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, Mack M, Charo IF. Critical roles for ccr2 and mcp-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117:902-909
182. Bonaros N, Sondermejer H, Schuster M, Rauf R, Wang SF, Seki T, Skerrett D, Itescu S, Kocher AA. Ccr3- and cxcr4-mediated interactions regulate migration of cd34+ human bone marrow progenitors to ischemic myocardium and subsequent tissue repair. *Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2008;136:1044-1053
183. Maskali F, Poussier S, Marie PY, Tran N, Antunes L, Olivier P, Plenat F, Maitrejean S, Zannad F, Karcher G. High-resolution simultaneous imaging of spect, pet, and mri tracers on histologic sections of myocardial infarction. *Journal of nuclear cardiology*. 2005;12:229-230
184. Marshall RC, Tillisch JH, Phelps ME, Huang SC, Carson R, Henze E, Schelbert HR. Identification and differentiation of resting myocardial ischemia and infarction in man with positron computed tomography, 18f-labeled fluorodeoxyglucose and n-13 ammonia. *Circulation*. 1983;67:766-778
185. Mill JG, Vassallo DV, Leite CM. Time course of changes in heart rate and sympathetic tone after coronary artery ligation in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1991;24:855-858
186. Parrish DC, Gritman K, Van Winkle DM, Woodward WR, Bader M, Habecker BA. Postinfarct sympathetic hyperactivity differentially stimulates expression of tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter. *American journal of physiology*. 2008;294:H99-H106
187. Mather AN, Fairbairn TA, Artis NJ, Greenwood JP, Plein S. Timing of cardiovascular mr imaging after acute myocardial infarction: Effect on estimates of infarct characteristics and prediction of late ventricular remodeling. *Radiology*. 2011;261:116-126
188. Pagano D, Townend JN, Littler WA, Horton R, Camici PG, Bonser RS. Coronary artery bypass surgery as treatment for ischemic heart failure: The predictive value of viability assessment with quantitative positron emission tomography for symptomatic and functional outcome. *Journal of thoracic and cardiovasc ular surgery*. 1998;115:791-799
189. Lombardo A, Niccoli G, Natale L, Bernardini A, Cosentino N, Bonomo L, Crea F. Impact of microvascular obstruction and infarct size on left ventricular remodeling in reperfused myocardial infarction: A contrast-enhanced cardiac magnetic resonance imaging study. International journal of cardiovascular imaging. 2011
190. Franken PR, Dendale P, De Geeter F, Demoor D, Bossuyt A, Block P. Prediction of functional outcome after myocardial infarction using bmipp and sestamibi scintigraphy. *Journal of nuclear medicine*. 1996;37:718-722
191. Knapp FF, Jr., Ambrose KR, Goodman MM. New radioiodinated methyl-branched fatty acids for cardiac studies. *European Journal of nuclear medicine*. 1986;12 Suppl:S39-44

192. Hambye AS, Dobbeleir AA, Vervaet AM, Van den Heuvel PA, Franken PR. Bmipp imaging to improve the value of sestamibi scintigraphy for predicting functional outcome in severe chronic ischemic left ventricular dysfunction. *Journal of nuclear medicine*. 1999;40:1468-1476
193. Hambye AS, Vervaet A, Dobbeleir A, Dendale P, Franken P. Prediction of functional outcome by quantification of sestamibi and bmipp after acute myocardial infarction. *European Journal of nuclear medicine*. 2000;27:1494-1500
194. Wita K, Filipecki A, Lelek M, Bochenek T, Elzbieciak M, Wrobel W, Berger Kucza A, Tabor Z, Drzewiecki J, Grabka M, Trusz Gluza M. Prediction of left ventricular remodeling in patients with stemi treated with primary pci: Use of quantitative myocardial contrast echocardiography. *Coronary artery diseases*. 2011;22:171-178
195. Bochenek T, Wita K, Tabor Z, Grabka M, Krzych L, Wrobel W, Berger-Kucza A, Elzbieciak M, Doruchowska A, Gluza MT. Value of speckle-tracking echocardiography for prediction of left ventricular remodeling in patients with st-elevation myocardial infarction treated by primary percutaneous intervention. *Journal of the american society of echocardiography*. 2011;24:1342-1348
196. Jang JY, Woo JS, Kim WS, Ha SJ, Sohn IS, Kim W, Bae JH, Kim KS. Serial assessment of left ventricular remodeling by measurement of left ventricular torsion using speckle tracking echocardiography in patients with acute myocardial infarction. The american journal of cardiology. 2010;106:917-923
197. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, Pandian NG, Hanak GG, Smith JJ, Mendelsohn ME, Konstam MA. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *The american journal of physiology*. 1998;274:H1812-1820
198. Gao XM, Dart AM, Dewar E, Jennings G, Du XJ. Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovascular research*. 2000;45:330-338
199. Kanno S, Lerner DL, Schuessler RB, Betsuyaku T, Yamada KA, Saffitz JE, Kovacs A. Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Journal of the american society of echocardiography*. 2002;15:601-609
200. Gaudron P, Eilles C, Kugler I, Ertl G. Progressive left ventricular dysfunction and remodeling after myocardial infarction. Potential mechanisms and early predictors. *Circulation*. 1993;87:755-763
201. Giannuzzi P, Temporelli PL, Bosimini E, Gentile F, Lucci D, Maggioni AP, Tavazzi L, Badano L, Stoian I, Piazza R, Heyman I, Levantesi G, Cervesato E, Geraci E, Nicolosi GL. Heterogeneity of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: Results of the gruppo italiano per lo studio della sopravvivenza nell'infarto miocardico-3 echo substudy. *American heart journal*. 2001;141:131-138
202. Haddad M, Veinot JP, Masters RG, Hendry PJ. Essential thrombocytosis causing a massive myocardial infarction. *Cardiovasc Pathol*. 2003;12:216-218
203. Heimbecker RO, Lemire G, Chen C. Surgery for massive myocardial infarction. An experimental study of emergency infarctectomy with a preliminary report on the clinical application. *Circulation*. 1968;37:II3-11
204. Glass BA, Carter RL, Albert HM, Rosenberg DM. Excision of myocardial infarcts. Experimental and clinical studies. *Arch Surg*. 1968;97:940-946
205. Stein M, Cordell AR. Arrhythmias and left ventricular efficiency following infarction and infarctectomy. *Archives in surgery*. 1969;99:802-807

206. 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
207. Ernens I, Leonard F, Vausort M, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR. Adenosine up-regulates vascular endothelial growth factor in human macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*.392:351-356
208. Leonard F, Devaux Y, Vausort M, Ernens I, Rolland-Turner M, Wagner DR. Adenosine modifies the balance between membrane and soluble forms of flt-1. *Journal of leukocyte biology*.90:199-204
209. Azuaje F, Leonard F, Rolland-Turner M, Devaux Y, Wagner DR. Proof-of-principle investigation of an algorithmic model of adenosine-mediated angiogenesis. *Theoretical biology and medical modelling*.8:7
210. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature medicine*. 2003;9:702-712
211. Siddique A, Shantsila E, Lip GY, Varma C. Endothelial progenitor cells: What use for the cardiologist? *Journal of angiogenesis research*. 2010;2:6
212. Tongers J, Losordo DW, Landmesser U. Stem and progenitor cell-based therapy in ischaemic heart disease: Promise, uncertainties, and challenges. *European heart journal*. 2011;32:1197-1206
213. Fazel SS, Chen L, Angoulvant D, Li SH, Weisel RD, Keating A, Li RK. Activation of c-kit is necessary for mobilization of reparative bone marrow progenitor cells in response to cardiac injury. *Faseb Journal*. 2008;22:930-940
214. Deuel W, Hess OM, Turina M, Senning A, Krayenbuhl HP. [relaxation of the left ventricle in aortic stenosis before and after aortal valve replacement]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*. 1982;112:1612-1615
215. Hess OM, Brunner HH, Goebel NH, Krayenbuhl HP. [contractility of the left ventricle in aortic valve stenosis; significance of myocardial hypertrophy]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft fur Kreislaufforschung*. 1976;42:152-155
216. Simonis G, Wiedemann S, Joachim D, Weinbrenner C, Marquetant R, Strasser RH. Stimulation of adenosine a2b receptors blocks apoptosis in the non-infarcted myocardium even when administered after the onset of infarction. *Molecular and cellularbiochemistry*. 2009;328:119-126
217. Goldman S, Raya TE. Rat infarct model of myocardial infarction and heart failure. *Journal of cardiac failure*. 1995;1:169-177
218. Adams JW, Sakata Y, Davis MG, Sah VP, Wang Y, Liggett SB, Chien KR, Brown JH, Dorn GW, 2nd. Enhanced galphaq signaling: A common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:10140-10145
219. Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG. Regulation of mirna expression during neural cell specification. *The European journal of neuroscience*. 2005;21:1469-1477
220. Buckberg G, Hoffman JI, Mahajan A, Saleh S, Coghlan C. Cardiac mechanics revisited: The relationship of cardiac architecture to ventricular function. *Circulation*. 2008;118:2571-2587
221. Ahmet I, Lakatta EG, Talan MI. Pharmacological stimulation of beta2-adrenergic receptors (beta2ar) enhances therapeutic effectiveness of beta1ar blockade in rodent dilated ischemic cardiomyopathy. *Heart failure reviews*. 2005;10:289-296

222. Ahmet I, Morrell C, Lakatta EG, Talan MI. Therapeutic efficacy of a combination of a beta1-adrenoreceptor (ar) blocker and beta2-ar agonist in a rat model of postmyocardial infarction dilated heart failure exceeds that of a beta1-ar blocker plus angiotensin-converting enzyme inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;331:178-185
223. Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nature reviews*. 2006;5:425-438
224. Brilla CG. Aldosterone and myocardial fibrosis in heart failure. *Herz*. 2000;25:299-306
225. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, Swynghedauw B, Delcayre C. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: Effect of angiotensin ii receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation*. 1999;99:2694-2701
226. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active cxcr4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*. 2004;104:2643-2645
227. Michel MC, Wieland T, Tsujimoto G. How reliable are g-protein-coupled receptor antibodies? *Naunyn Schmiedebergs. Archives in pharmacology*. 2009;379:385-388
228. Coughlan CM, McManus CM, Sharron M, Gao Z, Murphy D, Jaffer S, Choe W, Chen W, Hesselgesser J, Gaylord H, Kalyuzhny A, Lee VM, Wolf B, Doms RW, Kolson DL. Expression of multiple functional chemokine receptors and monocyte chemoattractant protein-1 in human neurons. *Neuroscience*. 2000;97:591-600
229. Ponte AL, Marais E, Gallay N, Langonne A, Delorme B, Herault O, Charbord P, Domenech J. The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2007;25:1737-1745
230. Kim CH, Pelus LM, White JR, Broxmeyer HE. Macrophage-inflammatory protein-3 beta/ebi1-ligand chemokine/ck beta-11, a cc chemokine, is a chemoattractant with a specificity for macrophage progenitors among myeloid progenitor cells. *Journal of immunology*. 1998;161:2580-2585
231. Stow JL, Low PC, Offenhauser C, Sangermani D. Cytokine secretion in macrophages and other cells: Pathways and mediators. *Immunobiology*. 2009;214:601-612
232. Fan Y, Ye J, Shen F, Zhu Y, Yeghiazarians Y, Zhu W, Chen Y, Lawton MT, Young WL, Yang GY. Interleukin-6 stimulates circulating blood-derived endothelial progenitor cell angiogenesis in vitro. *Journal of cerebral blood flow metabolism*. 2008;28:90-98
233. Saederup N, Chan L, Lira SA, Charo IF. Fractalkine deficiency markedly reduces macrophage accumulation and atherosclerotic lesion formation in ccr2-/- mice: Evidence for independent chemokine functions in atherogenesis. *Circulation*. 2008;117:1642-1648
234. Walenta KL, Bettink S, Bohm M, Friedrich EB. Differential chemokine receptor expression regulates functional specialization of endothelial progenitor cell subpopulations. *Basic research in cardiology*.106:299-305
235. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2001;103:2776-2779
236. Xin Z, Meng W, Ya-Ping H, Wei Z. Different biological properties of circulating and bone marrow endothelial progenitor cells in acute myocardial infarction rats. *Thoracic and cardiovascular surgery*. 2008;56:441-448

237. Zimmet H, Porapakkham P, Sata Y, Haas SJ, Itescu S, Forbes A, Krum H. Short- and long-term outcomes of intracoronary and endogenously mobilized bone marrow stem cells in the treatment of st-segment elevation myocardial infarction: A meta-analysis of randomized control trials. *European journal of heart failure*.14:91-105
238. Schuh A, Liehn EA, Sasse A, Hristov M, Sobota R, Kelm M, Merx MW, Weber C. Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model. *Basic research in cardiology*. 2008;103:69-77
239. Qipshidze N, Metreveli N, Mishra PK, Lominadze D, Tyagi SC. Hydrogen sulfide mitigates cardiac remodeling during myocardial infarction via improvement of angiogenesis. *International journal of biological sciences*. 2012;8:430-441
240. Kumamoto H, Okamoto H, Watanabe M, Onozuka H, Yoneya K, Nakagawa I, Chiba S, Watanabe S, Mikami T, Abe K, Kitabatake A. Beneficial effect of myocardial angiogenesis on cardiac remodeling process by amlodipine and mci-154. *The american journal of physiology*. 1999;276:H1117-1123
241. Rengo G, Zincarelli C, Femminella GD, Liccardo D, Pagano G, de Lucia C, Altobelli GG, Cimini V, Ruggiero D, Perrone-Filardi P, Gao E, Ferrara N, Lymperopoulos A, Koch WJ, Leosco D. Myocardial beta(2) -adrenergic receptor gene delivery promotes coordinated cardiac adaptive remodeling and angiogenesis in heart failure. *British journal of pharmacology*. 2012
242. Kobayashi H, Yasuda S, Bao N, Iwasa M, Kawamura I, Yamada Y, Yamaki T, Sumi S, Ushikoshi H, Nishigaki K, Takemura G, Fujiwara T, Fujiwara H, Minatoguchi S. Postinfarct treatment with oxytocin improves cardiac function and remodeling via activating cell-survival signals and angiogenesis. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2009;54:510-519
243. Bosch MP, Campos F, Niubo I, Rosell G, Diaz JL, Brea J, Loza MI, Guerrero A. Synthesis and biological activity of new potential agonists for the human adenosine a2a receptor. *Journal of medicinal chemistry*. 2004;47:4041-4053
244. Spinale FG, Coker ML, Krombach SR, Mukherjee R, Hallak H, Houck WV, Clair MJ, Kribbs SB, Johnson LL, Peterson JT, Zile MR. Matrix metalloproteinase inhibition during the development of congestive heart failure : Effects on left ventricular dimensions and function. *Circulation research*. 1999;85:364-376
245. Tang TT, Yuan J, Zhu ZF, Zhang WC, Xiao H, Xia N, Yan XX, Nie SF, Liu J, Zhou SF, Li JJ, Yao R, Liao MY, Tu X, Liao YH, Cheng X. Regulatory t cells ameliorate cardiac remodeling after myocardial infarction. *Basic research in cardiology*.107:1-17
246. Matsumoto K, Ogawa M, Suzuki J, Hirata Y, Nagai R, Isobe M. Regulatory t lymphocytes attenuate myocardial infarction-induced ventricular remodeling in mice. *International heart journal*.52:382-387
247. Melendez GC, Li J, Law BA, Janicki JS, Supowit SC, Levick SP. Substance p induces adverse myocardial remodelling via a mechanism involving cardiac mast cells. *Cardiovascular research*.92:420-429
248. Yilmaz MS, Coskun C, Suzer O, Yalcin M, Mutlu D, Savci V. Hypotensive effects of intravenously administered uridine and cytidine in conscious rats: Involvement of adenosine receptors. *European journal of pharmacology*. 2008;584:125-136
249. Buralli S, Dini FL, Ballo P, Conti U, Fontanive P, Duranti E, Metelli MR, Marzilli M, Taddei S. Circulating matrix metalloproteinase-3 and metalloproteinase-9 and tissue doppler measures of diastolic dysfunction to risk stratify patients with systolic heart failure. The american journal of cardiology. 2010;105:853-856

250. Jong GP, Ma T, Chou P, Chang MH, Wu CH, Lis PC, Lee SD, Liu JY, Kuo WW, Huang CY. Serum mmp-9 activity as a diagnosing marker for the developing heart failure of post mi patients. *The chinese journal of physiology*. 2006;49:104-109
251. Moshal KS, Rodriguez WE, Sen U, Tyagi SC. Targeted deletion of mmp-9 attenuates myocardial contractile dysfunction in heart failure. *Physiol Res*. 2008;57:379-384
252. Ovechkin AV, Tyagi N, Rodriguez WE, Hayden MR, Moshal KS, Tyagi SC. Role of matrix metalloproteinase-9 in endothelial apoptosis in chronic heart failure in mice. *Journal of applied physiology*. 2005;99:2398-2405
253. Ponnoth DS, Sanjani MS, Ledent C, Roush K, Krahn T, Mustafa SJ. Absence of adenosine-mediated aortic relaxation in a(2a) adenosine receptor knockout mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2009;297:H1655-1660
254. Zhao G, Messina E, Xu X, Ochoa M, Sun HL, Leung K, Shryock J, Belardinelli L, Hintze TH. Caffeine attenuates the duration of coronary vasodilation and changes in hemodynamics induced by regadenoson (cvt-3146), a novel adenosine a2a receptor agonist. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2007;49:369-375
255. Lieu HD, Shryock JC, von Mering GO, Gordi T, Blackburn B, Olmsted AW, Belardinelli L, Kerensky RA. Regadenoson, a selective a2a adenosine receptor agonist, causes dose-dependent increases in coronary blood flow velocity in humans. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the american society of nuclear cardiology*. 2007;14:514-520

RESUME

Le remodelage ventriculaire est un processus réactionnel pouvant faire suite à un infarctus du myocarde (IDM), évènement ischémique aigu survenant lors de l'obstruction d'une artère coronaire. Le remodelage provoque alors des changements géométriques et fonctionnels du tissu myocardique qui permettent de maintenir et d'adapter la fonction cardiaque. Lorsque ce processus est délétère, la maladie évolue vers l'insuffisance cardiaque, ce qui altère le pronostic et la qualité de vie des patients. L'adénosine est un nucléoside ubiquitaire dont les effets sur le remodelage ventriculaire après IDM sont encore peu connus et dépendent du type de récepteur activé. Au sein de notre laboratoire, de précédentes études in vitro ont montré que l'adénosine régule de nombreux acteurs clés du remodelage. Dans ce travail de thèse, nous avons émis l'hypothèse que l'adénosine pouvait avoir un effet bénéfique sur le remodelage ventriculaire après la survenue d'un IDM. Dans un premier temps, nous avons montré que la tomographie par émission de positrons (TEP) permet de caractériser précisément les séquelles d'IDM et de prédire le remodelage ventriculaire chez le rat après occlusion coronaire. Cette technique nous a permis de mettre en évidence le cas d'un rat ayant survécu à un IDM touchant plus de 70% de son ventricule gauche. Dans un deuxième temps, nous avons montré que l'administration chronique d'adénosine, à long terme après IDM chez le rat, permet de maintenir la contractilité cardiaque dans la zone bordant l'IDM. Cet effet cardioprotecteur peut s'expliquer par une stimulation de l'angiogenèse elle -même due à un recrutement de cellules endothéliales progénitrices circulantes. Ensuite, nous avons montré que la chimiokine *Monocyte Chemotactic Protein 3* est capable de stimuler la migration des cellules endothéliales progénitrices et est ainsi un agent thérapeutique potentiel après IDM. Enfin, nous avons commencé l'étude préclinique d'une molécule agoniste du récepteur A2A à l'adénosine et antagoniste du récepteur A3, un candidat particulièrement prometteur pour prévenir le remodelage ventriculaire après IDM.

Mots clés : cardioprotection, adénosine, infarctus du myocarde, remodelage ventriculaire gauche, imagerie nucléaire, tomographie par émission de positrons, contractilité myocardique.

ABSTRACT

Left ventricular (LV) remodeling can follow myocardial infarction (MI), an acute ischemic event which occurs after occlusion of a coronary artery. Remodeling allows maintaining and adapting cardiac function by geometric and functional changes of the myocardium. If this process becomes maladaptive, the patients' prognostic and life quality are impaired by the development of heart failure. Adenosine is an ubiquitous nucleoside with partially characterized effects on LV remodeling. These effects depend on the type of receptor activated. Previous in vitro studies from our laboratory have shown that adenosine regulates several key processes involved in LV remodeling. Here, we hypothesized that adenosine may have beneficial effects on LV remodeling after MI. First, we showed that positon emission tomography (PET) can accurately characterize MI severity and predicts subsequent LV remodeling in the rat model of MI induced by coronary occlusion. Using this technique, we described the case of a rat that survived after a massive infarct covering 70% of the left ventricle. Second, we showed that a chronic administration of adenosine preserves cardiac contractility in the border zone, two months after MI. This cardioprotective effect can be explained, in part, by the stimulation of angiogenesis involving a stimulation of the recruitment of endothelial progenitor cells to the heart. Then, we showed that the Monocyte Chemotactic Protein 3 stimulates the migration of endothelial progenitor cells and is thereby a potential therapeutic target after MI. Finally, we started the preclinical study of an A2A agonist / A3 antagonist, a promising candidate to prevent LV remodeling after MI.

Key words : cardioprotection, adenosine, myocardial infarction, left ventricular remodeling, nuclear imaging, positon emission tomography, myocardial contractility.

ANNEXE

Devaux et al. BMC Medical Genomics 2011, 4:83
http://www.biomedcentral.com/1755-8794/4/83

BMC Medical Genomics

RESEARCH ARTICLE Open Access

Transforming growth factor β receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction

Yvan Devaux[1*], Melanie Bousquenaud[1], Sophie Rodius[1], Pierre-Yves Marie[2], Fatiha Maskali[2], Lu Zhang[1], Francisco Azuaje[1] and Daniel R Wagner[1,3]

Abstract

Background: Prediction of left ventricular (LV) remodeling after acute myocardial infarction (MI) is clinically important and would benefit from the discovery of new biomarkers.

Methods: Blood samples were obtained upon admission in patients with acute ST-elevation MI who underwent primary percutaneous coronary intervention. Messenger RNA was extracted from whole blood cells. LV function was evaluated by echocardiography at 4-months.

Results: In a test cohort of 32 MI patients, integrated analysis of microarrays with a network of protein-protein interactions identified subgroups of genes which predicted LV dysfunction (ejection fraction ≤ 40%) with areas under the receiver operating characteristic curve (AUC) above 0.80. Candidate genes included transforming growth factor beta receptor 1 (TGFBR1). In a validation cohort of 115 MI patients, TGBFR1 was up-regulated in patients with LV dysfunction ($P < 0.001$) and was associated with LV function at 4-months ($P = 0.003$). TGFBR1 predicted LV function with an AUC of 0.72, while peak levels of troponin T (TnT) provided an AUC of 0.64. Adding TGFBR1 to the prediction of TnT resulted in a net reclassification index of 8.2%. When added to a mixed clinical model including age, gender and time to reperfusion, TGFBR1 reclassified 17.7% of misclassified patients. TGFB1, the ligand of TGFBR1, was also up-regulated in patients with LV dysfunction ($P = 0.004$), was associated with LV function ($P = 0.006$), and provided an AUC of 0.66. In the rat MI model induced by permanent coronary ligation, the TGFB1-TGFBR1 axis was activated in the heart and correlated with the extent of remodeling at 2 months.

Conclusions: We identified TGFBR1 as a new candidate prognostic biomarker after acute MI.

Background

Left ventricular (LV) remodeling after acute myocardial infarction (MI) sets the stage for the development of heart failure (HF). In spite of modern reperfusion therapies, morbidity and mortality of HF post MI remain elevated, with a 5-year prevalence of 63 to 76% [1,2]. A rapid and accurate prediction of the development of HF after MI would be a major breakthrough since HF is potentially preventable [3].

Several factors determine the magnitude of LV remodeling and dysfunction, including infarct size and other clinical variables such as age, gender and time to reperfusion. These factors have conventionally been used to predict remodeling after acute MI [4]. Circulating biomarkers such as troponins and natriuretic peptides have the potential to improve this prediction and to select patients for new biological or mechanical therapies. However, existing biomarkers are not accurate prognostic indicators of the development of LV remodeling and HF after acute MI.

In recent studies, we have implemented integrated strategies based on the concepts of systems biology to identify new prognostic biomarkers of LV remodeling [5-8]. Approaching LV remodeling with systems-based technologies is a prerequisite to address the complexity of LV remodeling. Some of these studies relied on the

* Correspondence: yvan.devaux@crp-sante.lu
[1]Laboratory of Cardiovascular Research Centre de Recherche Public-Santé, Luxembourg, L-1150, Luxembourg
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central
© 2011 Devaux et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

assumption that angiogenesis may beneficially affect LV remodeling and participate in cardiac repair. Indeed, intracoronary myocardial contrast echocardiography and magnetic resonance imaging have shown that microvascular perfusion greatly affects LV remodeling [9-11]. However, angiogenesis is certainly not the only regulator of LV remodeling. A transcriptomic profile of angiogenic factors has been revealed [12] and we have reported the capacity of transcriptional networks in blood cells to characterize LV remodeling [8,13].

In the present study, we implemented a combined analysis of transcriptomic profiles of blood cells from MI patients and protein interaction networks of angiogenic proteins to identify new biomarkers of LV remodeling.

Results

Patient selection and characteristics of the test cohort

Patients presenting with acute ST-elevation MI, treated with primary percutaneous revascularization, were enrolled in this study. Blood samples were obtained at the time of mechanical reperfusion. A test cohort of two groups of 16 patients selected based on their EF 4 months after MI (Table 1) was used for transcriptomic analyses. One group of patients had a preserved LV systolic function with high EF after MI (> 40%, median 63%, range 45-73), and the other group impaired LV function with low EF (≤ 40%, median 35%, range 20-40). Demographic features of these 2 groups were similar, except for infarct size as indicated by higher levels of TnT and CPK in the low EF group.

Transcriptomic analysis of blood cells

Gene expression profiles of whole-blood cells were obtained using 25,000 genes microarrays [14]. 525 genes were found differentially expressed between high and low EF patients with a 1.3-fold change threshold. Of note, the 5% threshold for statistical significance was reached for 54% of these genes. 226 genes were up-regulated in the high EF group and 299 were up-regulated in the low EF group. Using gene set enrichment analysis (GSEA), we retrieved the 50 genes most significantly associated with one or the other group of patients. The heat-map drawn with the expression data of these 50

Table 1 Clinical characteristics.

	Test cohort					Validation cohort	
	High EF (n = 16)		Low EF (n = 16)		P value (high vs low EF)	(n = 115)	
4-months EF, % (median-range)	63	45-73	35	20-40	0.0003	40	15-86
Age, y (median-range)	56	43-84	68	38-83	0.57	56	32-90
Sex (male, n, %)	13	81%	13	81%	1	98	85%
Body Mass Index (median-range)	28	23-35	26	20-38	0.25	27	19-43
Serum markers (median-range)							
Troponin T (ng/mL)	0.78	0.06-10.69	11.64	1.46-26.1	0.007	4.76	0.03-26.1
CPK (units/L)	762	603-3798	4860	1015-9383	< 0.001	1978	602-9383
Cardiovascular history, n (%)							
Prior MI	2	13%	3	19%	0.64	7	6%
CABG	0	0%	1	6%	0.33	3	3%
PTCA	1	6%	2	13%	0.56	11	10%
Diabetes	4	25%	6	38%	0.46	22	19%
Hypertension	6	38%	7	44%	0.73	47	41%
Hypercholesterolemia	7	44%	9	56%	0.50	45	39%
Tobacco	4	25%	5	31%	0.71	53	46%
Medications, n (%)							
Beta-blockers	16	100%	14	88%	0.16	98	85%
Calcium antagonists	3	19%	0	0%	0.08	0	0%
Nitrates	6	38%	6	38%	1	31	27%
ACE inhibitors	10	63%	10	63%	1	51	44%
Statins	14	88%	14	88%	1	89	77%
Angiotensin receptor inhibitors	2	13%	0	0%	0.16	1	1%

All MI patients had successful mechanical reperfusion and stenting of the infarct artery within 12 hours of chest pain onset. All patients received Aspirin, Clopidogrel, Heparin and Abciximab in the presence of a large thrombus.

ACE: Angiotensin Converting Enzyme; CABG: Coronary Artery Bypass Grafting; EF: Ejection Fraction; PTCA: Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty; MI: Myocardial Infarction.

genes shows that LV function assessed 4-months after MI is associated with a specific biosignature of blood cells obtained the day of MI (Figure 1A).

Angiogenic genes associated with clinical outcome after MI

There is ample evidence that angiogenesis plays a significant role in LV remodeling after MI. We therefore aimed to identify among the 525 genes differentially expressed between high and low EF patients the genes related to angiogenesis. For this purpose, we retrieved from the Entrez Gene database a list of 494 genes known to be related to angiogenesis in humans with the following query: "angiogenesis" AND "homo sapiens". We assigned to these 494 genes the expression values of the test cohort obtained by microarrays. 28 genes were found differentially expressed: 20 genes were up-regulated in the low EF group and 8 genes were up-regulated in the high EF group (Figure 1B).

Building of a network of protein-protein interactions

We implemented an interaction network of proteins know to be involved in angiogenesis, a process involved in LV remodeling. For this purpose, we retrieved from the Human Protein Reference Database all known interactions between the 28 proteins encoded by the 28 genes differentially expressed between the 2 groups of patients from the test cohort (Figure 1B). The network built with these interactions is represented in Figure 2A, and contains 441 nodes (proteins) and 458 edges (interactions). It has to be noted that the proteins PBEF1 and PFKFB3 did not have known protein-protein interaction.

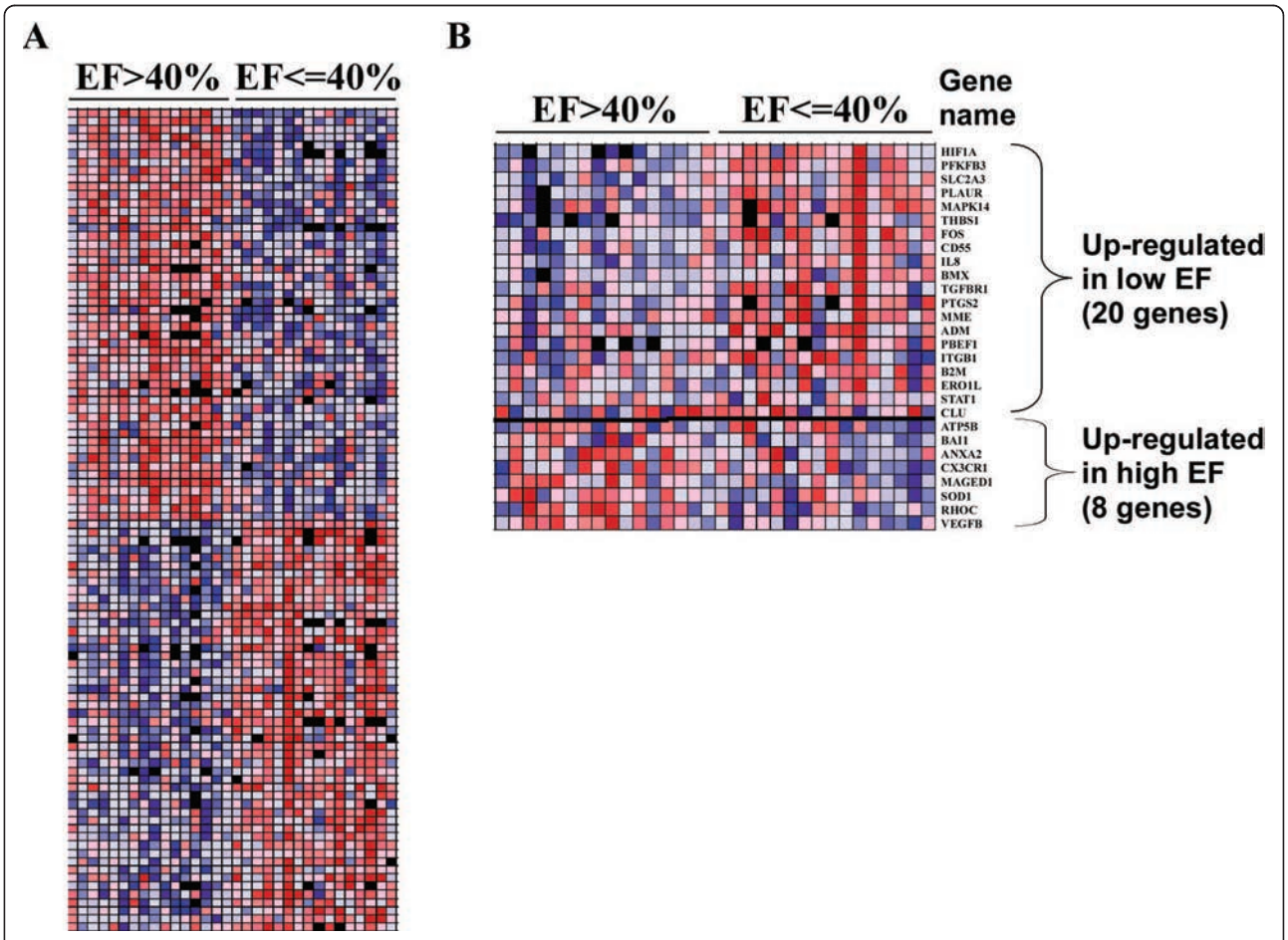


Figure 1 Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) of expression profiles of blood cells from MI patients. Gene expression profiles of blood cells from two groups of 16 MI patients having either high EF (> 40%) or low EF (≤ 40%) were obtained by 25,000 genes oligonucleotide microarrays. After normalization and filtering steps, expression data were analyzed by GSEA and are visualized by heat-maps. Colors (red, pink, light blue, dark blue) show the range of expression values (high, moderate, low, lowest, respectively). Black boxes denote missing values. (A) Expression ranges of the 50 most differentially expressed genes showing distinct transcriptomic biosignatures between patients with high and low EF. (B) Among the 525 differentially expressed genes between high and low EF patients, 28 genes were involved in angiogenesis according to the Entrez Gene database resource: 20 genes were up regulated in the low EF group and 8 genes were up regulated in the high EF group. A heat-map representing the expression values of these 28 genes is shown.

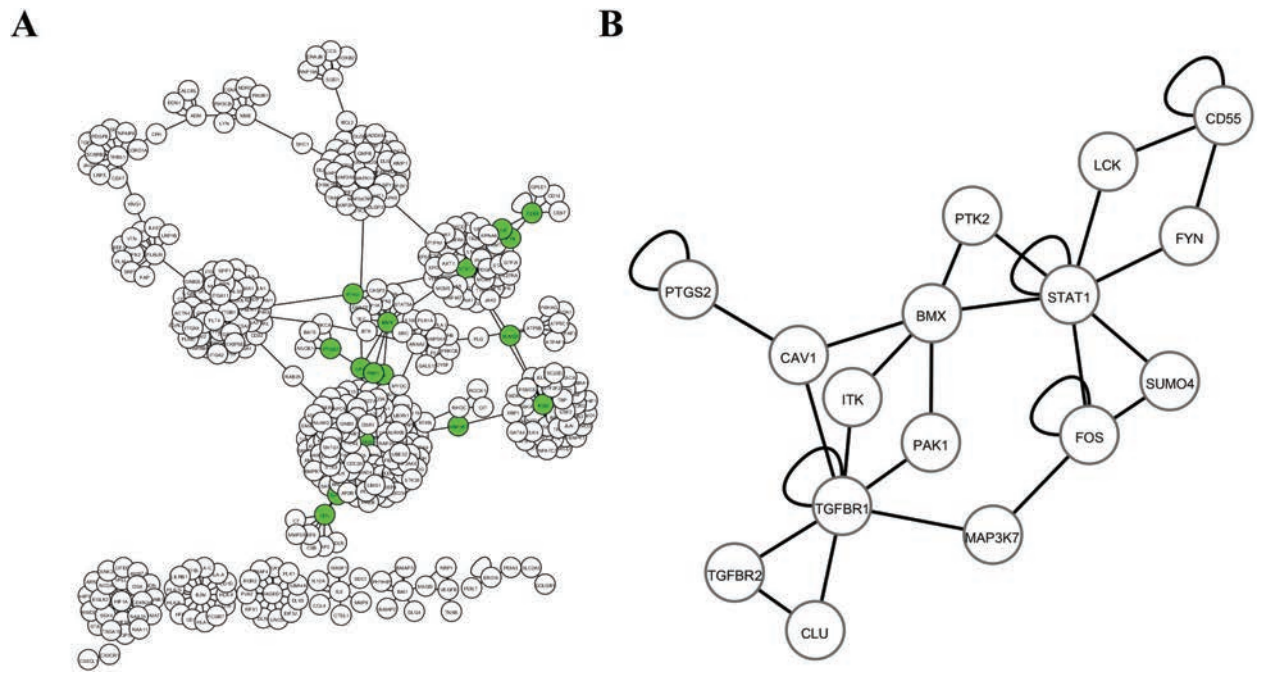


Figure 2 Protein-protein interaction network. A global network (A) was built from 441 proteins (nodes) and 458 interactions (edges). Green nodes represents the 16 proteins of cluster 6 used to built the subnetwork (B).

Then we used MCODE algorithm to identify clusters of interconnected proteins. This was based on the assumption that highly interacting proteins may have important biological functions. Nine clusters from 9 to 35 proteins were identified (Table 2).

Prognostic performances of clusters of angiogenic genes

To determine the prognostic value of the genes of the clusters identified by network analysis, we used the expression values obtained by microarrays in the two groups of MI patients of the test cohort. To limit our investigations to a reasonable number of genes, we focused on the 16 genes of cluster 6 (Table 2). Of these genes, TGFBR2 and SUMO4 were not detected by microarrays. The sub-network formed by the 16 genes is displayed in Figure 2B. Logistic regression models attributed the best predictive value to a group of 3 genes: TGFBR1, PTK2 and ITK (AUC = 0.89). These 3 genes classified patients into low EF and high EF groups with 87% sensitivity (Table 3).

Table 2 Subsets of angiogenic genes associated with LV function.

Cluster	Protein number	Interaction number	MCODE score*	Genes
1	3	4	1	TGFBR1, TGFBR2, CLU
2	5	7	1	TGFBR1, TGFBR2, CLU, MAP3K7, FOS
3	10	16	1.3	TGFBR1, TGFBR2, CLU, MAP3K7, FOS, SUMO4, STAT1, PTK2, BMX, CAV1
4	12	20	1.42	TGFBR1, TGFBR2, CLU, MAP3K7, FOS, SUMO4, STAT1, PTK2, BMX, CAV1, ITK, PAK1,
5	13	22	1.38	TGFBR1, TGFBR2, CLU, MAP3K7, FOS, SUMO4, STAT1, PTK2, BMX, CAV1, ITK, PAK1, PTGS2
6	16	27	1.37	TGFBR1, TGFBR2, CLU, MAP3K7, FOS, SUMO4, STAT1, PTK2, BMX, CAV1, ITK, PAK1, PTGS2, FYN, LCK, CD55
7	21	34	1.38	TGFBR1, TGFBR2, CLU, MAP3K7, FOS, SUMO4, STAT1, PTK2, BMX, CAV1, ITK, PAK1, PTGS2, FYN, LCK, CD55, ATP5B, SRC, MYOC, ANXA2, PLG
8	28	44	1.32	TGFBR1, TGFBR2, CLU, MAP3K7, FOS, SUMO4, STAT1, PTK2, BMX, CAV1, ITK, PAK1, PTGS2, FYN, LCK, CD55, ATP5B, SRC, MYOC, ANXA2, PLG, SOD1, BCL2, MAPK14, SMAD7, SHC1, MME, ADM
9	35	55	1.34	TGFBR1, TGFBR2, CLU, MAP3K7, FOS, SUMO4, STAT1, PTK2, BMX, CAV1, ITK, PAK1, PTGS2, FYN, LCK, CD55, ATP5B, SRC, MYOC, ANXA2, PLG, SOD1, BCL2, MAPK14, SMAD7, SHC1, MME, ADM, CFH, THBS1, KNG1, PLAUR, PRKCA, RAB25

*MCODE cluster score = density * number of nodes.

Table 3 Prognostic performances of subsets of angiogenic genes.

Proteins	AUC	True positive rate (%)	False positive rate (%)
TGFBR1, CLU, MAP3K7, FOS, STAT1, PTK2, BMX, CAV1, ITK, PAK1, PTGS2, FYN, LCK, CD55	0.67	62	38
CLU, FOS, ITK, PTGS2, LCK, CD55	0.83	69	31
FOS, LCK, CLU	0.84	69	31
ITK, LCK, CD55	0.82	72	28
ITK, CD55	0.84	75	25
TGFBR1, PTK2, ITK	0.89	87	13

Logistic regression models were used for these analyses. AUC: area under the receiver operating characteristic (ROC) curve. True positive rate (= sensitivity) indicates the percentage of patients correctly classified in the EF group (EF ≤ 40% or EF > 40%). False positive rate (= 1-specificity) indicates the percentage of patients misclassified in the EF group. Optimal classification models are shown; all other combination of genes provided lower classification performances.

Independent validation

To confirm the results obtained from the test cohort, we measured the expression of TGFBR1, PTK2 and ITK by quantitative PCR in blood cells from a validation cohort of 115 acute MI patients. Demographic features of these patients are shown in Table 1. As for the test cohort, blood samples were obtained at presentation and follow-up was performed at 4-months by echocardiography. Of the 3 candidate genes, TGFBR1 was the most robustly associated with LV function. PTK2 and ITK were not significantly correlated with the EF (data not shown). TGFBR1 expression was inversely correlated with the EF ($r = -0.28$, $P = 0.003$) and was higher in patients with LV dysfunction (Figure 3A). Linear regression analyses attested that TGFBR1 was associated with LV dysfunction at 4-months ($P = 0.003$). The serum markers creatine phosphokinase and troponin T predicted TGFBR1 expression ($P = 0.03$ and $P = 0.003$ by linear regression, respectively), suggesting that TGFBR1 is responsive to infarct size. All together, these results show that TGFBR1 expression is associated with LV function in an independent cohort.

Prognostic performance of TGFBR1

The prognostic value of TGFBR1 in the cohort of 115 acute MI patients was first evaluated using ROC curve analysis, which reported an AUC of 0.72 (Figure 3B). As a comparison, peak levels of TnT and CPK provided an AUC of 0.64 (Figure 3B). CPK or troponin T did not improve the prognostic value of TGFBR1 (not shown), suggesting that this value is independent of infarct size. Reclassification analyses reported a NRI of 8.2% when TGFBR1 was added to TnT prediction (Table 4).

In the validation cohort, 7 patients (6%) had a previous MI (Table 1). In the 108 patients who presented with a first MI, the predictive value of TGFBR1 had an AUC of 0.72, identical to the AUC reported for the whole validation cohort (Figure 3B). Therefore, although it is expected that a population of patients with first infarcts would better reflect post-MI LV remodeling, the presence of few patients with a second infarct did not affect the predictive value of TGFBR1.

We next investigated the additive value of TGFBR1 to a mixed clinical model including age, gender and time to reperfusion, all known to determine the extent of LV remodeling. We observed significant correlations between the EF measured at 4-months and each of these parameters, patients of older age ($R = -0.35$, $P = 0.0002$), females ($R = 0.20$, $P = 0.02$), and presenting late after chest pain onset ($R = -0.26$, $P = 0.007$) having the highest risk of impaired EF (EF ≤ 40%). By multiple logistic regression, however, only age was a significant predictor of impaired EF ($P < 0.001$). The clinical model predicted LV function with an AUC of 0.73 (Figure 3C), comparable to the AUC provided by TGFBR1 alone (AUC = 0.72, Figure 3B). Adding TGFBR1 to the clinical model increased its AUC to 0.76 (Figure 3C). Reclassification analyses attested that TGFBR1 was able to reclassify 17.7% of patients misclassified by the clinical model (Table 5).

Together, these data confer a significant prognostic value to TGFBR1.

Prognostic performance of TGFB1

We then evaluated the ability of TGFB1, the ligand of TGFBR1, to predict LV dysfunction. TGFB1 was measured in the plasma obtained at presentation in the 115 patients of the validation cohort. As observed for TGFBR1, TGFB1 was inversely correlated with EF ($r = -0.20$, $P = 0.04$) and was over-expressed in patients with LV dysfunction (Figure 3D). Linear regression revealed a significant association between TGFB1 and LV dysfunction ($P = 0.006$) and ROC curves reported a modest prognostic value with an AUC of 0.66 (Figure 3E). Adding TGFB1 to TGFBR1 did not result in a statistically detectable improvement in prediction (not shown). Therefore, TGFB1 is also associated with LV function but does not provide an additive value to TGFBR1.

The TGFB1-TGFBR1 axis in the heart

To investigate the physiological relevance of our findings, we subjected rats to LAD-occlusion, a standard animal model of MI. The amount of total TGFB1 in the heart was increased 2 months after MI (Figure 4A).

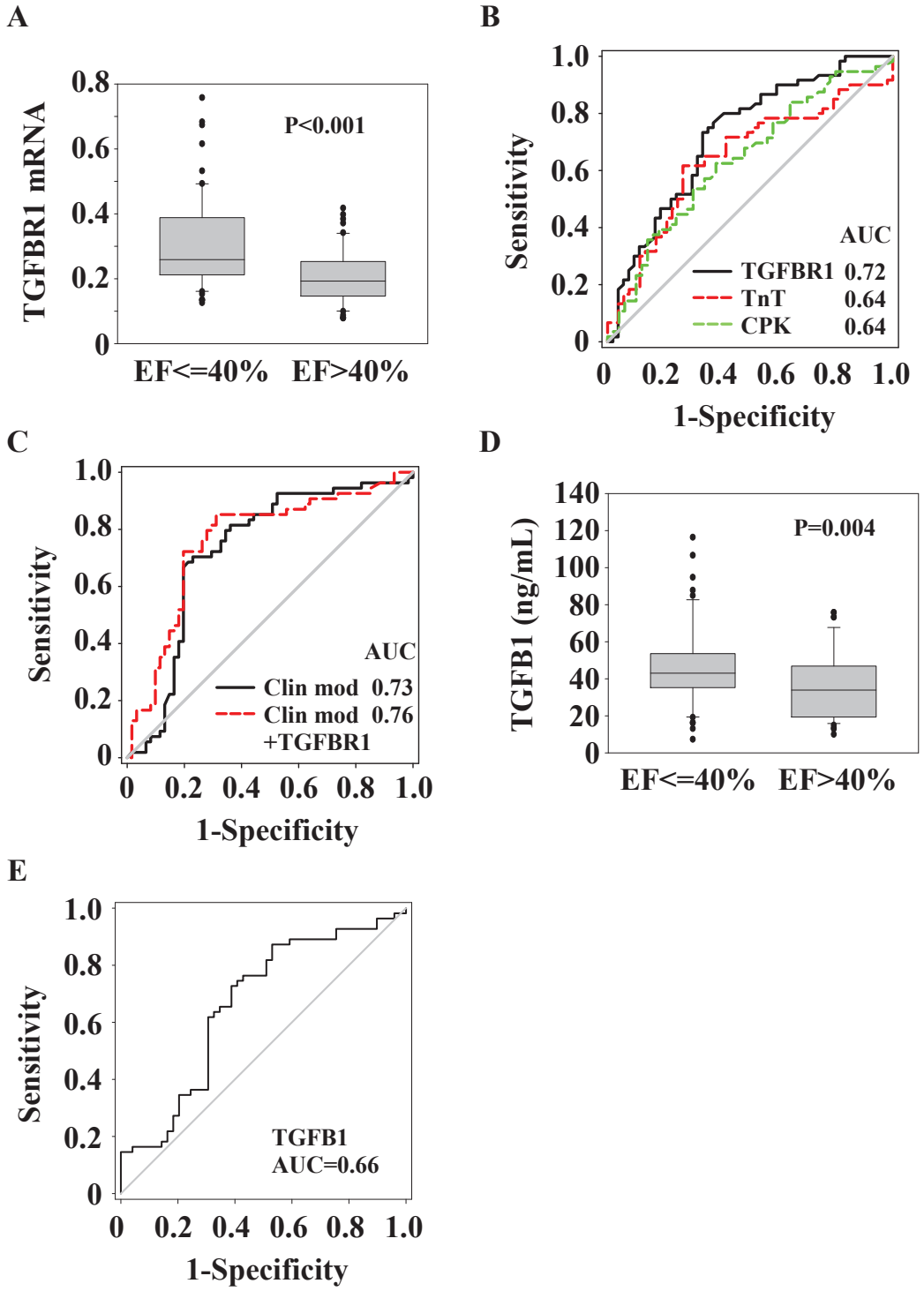


Figure 3 Expression levels and prognostic values of TGFBR1 and TGFB1. Blood samples from 115 MI patients obtained upon admission were used to measure TGFR1 mRNA expression in blood cells by quantitative PCR and TGFB1 plasma level by ELISA. TGFBR1 mRNA expression was normalized to SF3A1. (A and D) Box-plots showing that TGFBR1 and TGFB1 are over-expressed in patients with LV dysfunction (EF ≤ 40%) compared to patients with preserved LV function (EF > 40%) assessed at 4-months follow-up. The lower boundary of the box indicates the 25th percentile, the line within the box marks the median, and the upper boundary of the box indicates the 75th percentile. Whiskers (error bars) above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. (B-C-E) ROC curve analysis showing the performance of TGFBR1 and TGFB1 measured at presentation, peak levels of TnT and CPK, and a mixed clinical model (Clin mod; including age, gender and time to reperfusion) to predict LV dysfunction. AUCs are indicated.

Table 4 Reclassification performance of TGFBR1 over TnT.

	TnT			TnT + TGFBR1			
Class	EF > 40%	EF ≤ 40%	Correctly classified (%)	EF > 40%	EF ≤ 40%	Correctly classified (%)	NRI (%)
EF > 40%	**32**	23	59.3	**38**	20	70.4	
EF ≤ 40%	22	**38**	62.2	16	**41**	67.2	
Total	54	61	60.1	54	61	68.7	8.2

Correct classifications appear in bold. NRI: net reclassification index.

However, the amount of activated TGFB1 was not increased (not shown), suggesting that the up-regulation of TGFB1 expression in the heart of MI animals reflects an increase of the latent form. Total TGFB1 expression did not significantly correlate with LV function, as assessed by the EF at 2-months (Figure 4B). Interestingly, there was a positive correlation between TGBF1 and LV remodeling, as assessed by the variation of end-diastolic and end-systolic volumes between 48 hours and 2 months after MI. Rats with the largest degree of remodeling (increased LV volumes) had the highest levels of TGFB1 (Figure 4C-D).

Faintly expressed in the heart of healthy animals (sham), TGFBR1 was up-regulated in the border zone but not in the remote zone 2-months after MI (Figure 4E). TGFBR1 was highly expressed 2 weeks after MI, but not after 2 days (Figure 4F). Trichrome Masson staining showed the presence of collagen deposition and fibrosis in the necrotic part of the heart after 2 months (Figure 4G). Therefore, the TGFB1-TGFBR1 axis is activated in cardiac tissue after experimental MI in rats and correlates with LV remodeling.

Discussion

Based on the concepts of systems biology, this study was designed to identify new prognostic biomarkers after acute MI. First, using a test cohort of 32 patients, we observed that LV dysfunction after MI (4-months EF < 40%) had a biosignature in blood cells in the acute phase. Among the genes associated with LV dysfunction, 28 were linked to angiogenesis, which is known to play a key role in cardiac repair. Then, using clustering analysis of a network of protein-protein interactions built with these 28 angiogenic genes, we isolated a group of 3 genes -TGFBR1, PTK2, ITK- which predicted LV function with and AUC of 0.89. In an independent validation cohort of 115 MI patients, TGFBR1 was found to have a prognostic value which may become clinically useful. Finally, we showed that the TGFB1-TGFBR1 is activated after MI in rats and correlates with the extent of remodeling.

Left ventricular remodeling is a highly complex phenomenon involving diverse biological processes, such as inflammation, regulation of extracellular matrix turnover, fibrosis, cell death, and angiogenesis. Such complex diseases can be approached with systems-based concepts. We chose angiogenesis to filter the relatively high number of genes (525) found to be differentially expressed between patients with or without LV dysfunction. It is clear that other family of genes involved in remodeling may also be worth studying. It is expected that genes involved in multiple biological pathways or sharing many interactions with other genes may be more susceptible to play significant roles in remodeling and have a prognostic value. Accordingly, TGFBR1 was a node in the network of 16 angiogenic proteins shown in Figure 2B and was connected to 6 other proteins, suggesting a central role in angiogenesis. A more global approach, which could be used for future studies, would be to widen the search for biomarkers to all pathways known to play a role in LV remodeling, and not to restrain to a specific pathway such as angiogenesis.

Transcriptional profiling has emerged as an interesting tool to study cardiovascular diseases and ultimately to personalize therapeutic strategies [15]. A key feature of our study is the use of readily available blood cells, rather than cardiac biopsies. While it may be argued that transcriptomic analysis of cardiac tissues would more accurately reflect the myocardial response to MI, it is accepted that several cardiovascular conditions including coronary artery disease [16] and chronic HF [17] are characterized by specific transcriptomic biosignatures in blood cells. Our study shows for the first time that TGFBR1 expression level in blood cells

Table 5 Reclassification performance of TGFBR1 over a clinical model including age, gender and time to reperfusion.

	Clinical model			Clinical model + TGFBR1			
Class	EF > 40%	EF ≤ 40%	Correctly classified (%)	EF > 40%	EF ≤ 40%	Correctly classified (%)	NRI (%)
EF > 40%	**43**	22	79.6	**43**	17	79.6	
EF ≤ 40%	11	**39**	63.9	11	**44**	72.1	
Total	54	61	71.3	54	61	75.6	17.7

Correct classifications appear in bold. NRI: net reclassification index.

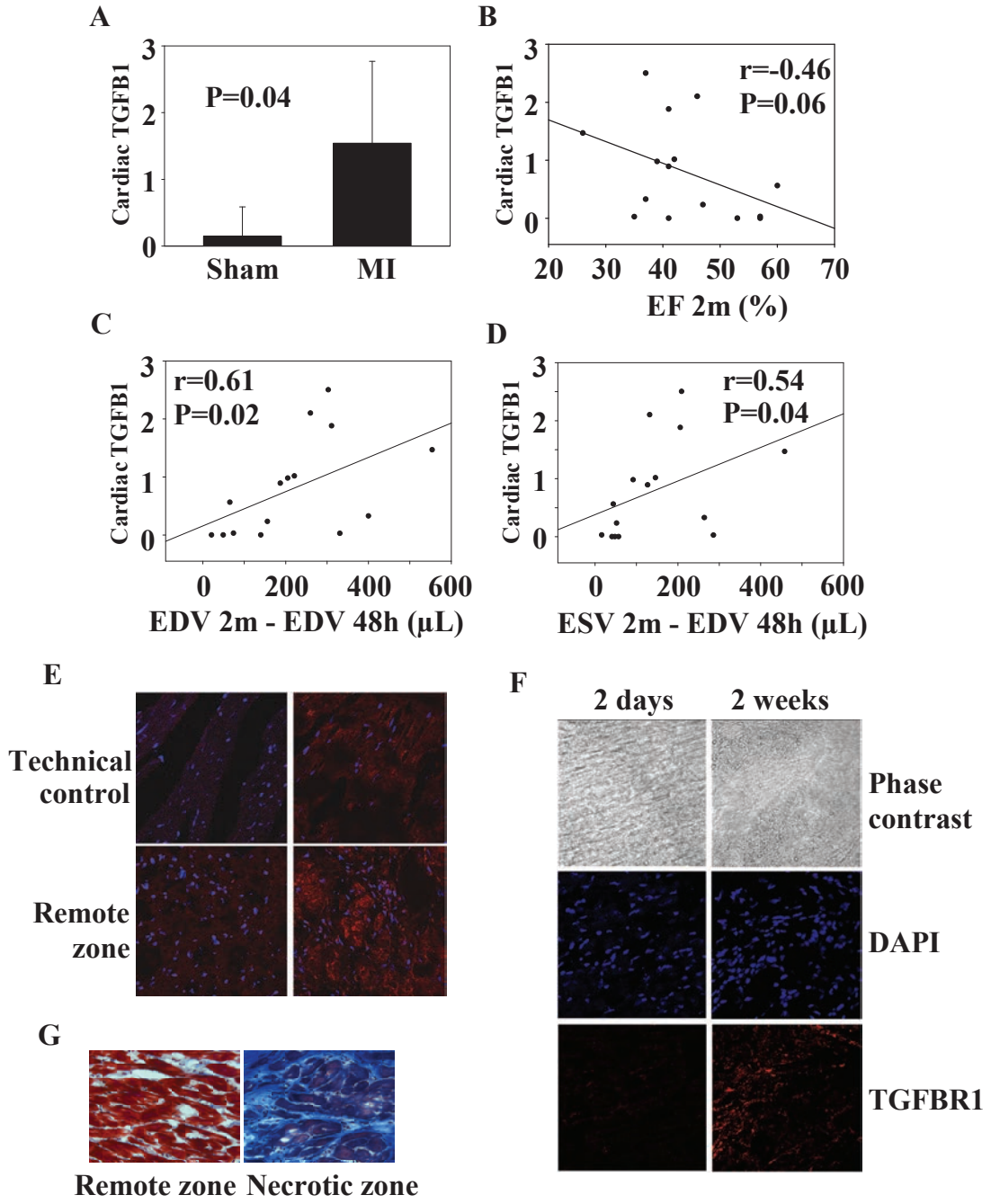


Figure 4 The TGFB1-TGFBR1 axis in rats after MI. 17 rats were subjected to MI through permanent ligation of the LAD coronary artery. 4 rats were sham-operated. Rats were assessed by PET to determine LV volumes and EF 48 hours and 2 months after ligation. Rats were sacrificed after 2 days (n = 3), 2 weeks (n = 3) or 2 months (n = 11). At sacrifice, hearts were harvested. (A) Total TGFB1 measured by ELISA in cardiac samples is up-regulated 2 months after MI. Data are expressed in pg of TGFB1 per µg of total cardiac proteins. Shown are mean ± 95% CI (n = 4 for sham, n = 11 for MI). (B) TGFB1 expression in the heart mildly correlates with 2-months EF. (C-D) TGFB1 expression correlates with the variations of LV end-diastolic and end-systolic volumes between 48 hours and 2 months. Correlation coefficients and P values are indicated. (E) Immunohistochemical analysis of TGFBR1 expression in cardiac slices. The technical control without anti TGFBR1 antibody attests for the specificity of the detection. TGFBR1 staining appears in red colour and nuclei appear in blue. TGFBR1 expression is up-regulated in the border zone of MI rats. Representative pictures of sham-operated rats (upper panels) and MI rats (lower panels) are shown. (F) TGFBR1 expression in the border zone 2 days and 2 weeks after MI. TGFBR1 expression is up-regulated in the border zone 2 weeks after MI. Representative pictures are shown. (G) Masson trichrome staining showing collagen deposition and fibrosis in the necrotic zone of the heart 2 months after MI. Representative pictures from a MI rat are shown.

obtained at presentation in acute MI patients has prognostic value for long-term LV remodeling.

In addition, we have observed an association between TGFB1, which has prognostic values for remodeling and hypertrophy in patients with hypertension and aortic stenosis [18,19], and LV function. This association was not as robust as TGFBR1, and the prognostic value of TGFBR1 was not found to be improved by TGFB1 determination. Interestingly, TGFBR1 added some value to the prediction of TnT, a marker of infarct size known to affect LV remodeling. The reclassification of 8.2% of patients misclassified by TnT is clinically relevant. Similarly, the reclassification of 17.7% of patients misclassified by a standard risk factor model based on age, gender and time to reperfusion, is pertinent.

The integration of multiple biomarkers is thought to improve the estimation of the course of cardiovascular diseases [20], although this assumption has been questioned [21]. Heidecker and coworkers reported that a group of 45 genes identified from endomyocardial biopsies predicted 5-year outcome of new onset HF patients with a sensitivity of 74% and a specificity of 90% [22]. More recently, a panel of 5 plasma proteins involved in extracellular matrix turnover was demonstrated to be a more accurate predictor of LV hypertrophy than any single biomarker [23]. Alternatively, combining biomarkers representing diverse disease mechanisms has also been shown to add incremental risk stratification value in patients with non ST-elevation acute coronary syndrome [24]. Our data showing that TGFBR1 has an additive value to traditional markers are consistent with the concept that multiplication of biomarkers may be clinically useful.

More than 80% of the patients enrolled in this study were males. The low number of females enrolled (6 in the test cohort and 17 in the validation cohort) prevented us from investigating whether gender contributes to the prognostic value of TGFBR1. However, TGFBR1 expression was not different between women and men (not shown), suggesting that gender may not influence the prognostic value of TGFBR1.

Activation of the TGFB1-TGFBR1 pathway is mainly associated with stimulation of fibrosis, although it also affects LV hypertrophy, matrix metabolism, inflammation, and angiogenesis [25-27]. After MI, this pathway triggers the switch from inflammation to fibrosis [28-30]. TGFBR1 expression has been reported to be higher in the infarcted region of pig hearts after permanent coronary ligation compared to the remote region [31]. Our data in rats confirm and extend these observations. It is believed that biomarkers should reflect the pathophysiology, and our experiments in rats provide valuable proof for this. Inhibition of TGFBR1 activity by orally active specific inhibitors [28,32] or competitive inhibition of TGFB1 by a soluble form of TGFBR2 [33] dampens cardiac remodeling after MI. Other strategies to block TGFB, which have been recently reviewed [34], may also be tested to limit cardiac remodeling

Endothelial progenitor cells participate in cardiac revascularization and healing after acute MI. However, considering their extremely low frequency in the circulation, these cells are certainly not the main source of TGBFR1 signal measured by microarrays. Circulating monocytes-macrophages may most probably account for the majority of TGFBR1 expression. Interestingly, these cells secrete many cytokines, growth factors and fibrotic factors which regulate LV remodeling and cardiac healing. The higher expression of TGFBR1 in patients with low EF is consistent with the more robust activation of inflammation observed in these patients, as attested by higher white blood cells counts (not shown). Whole blood cells profiling can be affected by shifts in leukocyte populations. However, the proportions of circulating monocytes were comparable between patients with low EF and patients with high EF, suggesting that this confounding factor did not importantly affect our results. It would be interesting to accurately determine which cell type(s) express TGFBR1 in the heart, and whether TGFBR1 expression is regulated in cells involved in cardiac healing. The animal model of coronary artery ligation used in the animal study is a valuable tool to answer these questions.

The main limitation of the present study relies in the small number of patients enrolled. This is particularly relevant for the test cohort used in microarray experiments. Nevertheless, using a different and quantitative technique, we were able to validate our findings from this small cohort in an independent cohort of more than 100 patients. The relevance of our findings depends on the confirmation of the prognostic value of TGFBR1 in larger patient populations. In addition, all human blood samples were collected at presentation and measurement of TGFBR1 expression at different time-points after acute MI could provide valuable informations. Finally, mutations in TGFBR1 gene, known to affect vascular integrity in Marfan and Loeys-Dietz syndromes [35,36], have to be taken into consideration for the design of probes to measure TGFBR1 expression and for the design of specific therapeutic inhibitors.

Conclusions

We have shown that TGFBR1 expression in blood cells of acute MI patients is associated with LV remodeling. If confirmed in independent studies, this new biomarker may become clinically useful to identify patients with acute MI who are at risk of adverse outcome and may benefit from novel therapies.

Methods

Patients

Patients with acute MI were enrolled in a national MI registry and treated with primary percutaneous coronary intervention. Acute MI was defined by the presence of chest pain < 12 hours, significant ST elevation (> 1 mm), completely occluded major coronary artery (TIMI O flow in LAD, CX or RCA), peak (≈ 24 hours) creatine phosphokinase (CPK) level > 600 units/L and peak troponin T (TnT) level > 0.03 ng/mL. Blood samples obtained shortly (5 min) after mechanical reperfusion, via an arterial catheter and into PAXgene™ tubes (BD Biosciences, Erembodegem, Belgium), were used for determination of TGFBR1 expression. TGFB1 was measured in plasma extracted from citrated tubes collected after mechanical reperfusion. Time to reperfusion was recorded by dedicated nurses as the delay between chest pain onset evaluated by the patient and presentation. CPK activity was assessed with a Roche IFCC method on a Cobas c501 instrument (Roche, Prophac, Luxembourg). TnT was assessed with a 4th generation assay from Roche performed on a Cobas e601 equipment (Roche). TGF-B1 was measured with the human TGF-B1 ELISA kit (ref DB100B, R&D Systems, Oxon, UK). LV function was assessed by echocardiography 4 months after MI, and LV remodeling was defined by a LV ejection fraction (EF) ≤ 40%. The protocol has been approved by the local ethics committee (National committee of ethics in research of the Grand-Duchy of Luxembourg) and informed consent has been obtained from all subjects.

Microarrays

Transcriptomic analysis of blood cells was performed as previously described [7]. Total RNA was extracted from whole blood cells of MI patients using the PAXgene™ blood RNA kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). A second purification and concentration step was performed with the RNeasy® MinElute™ kit (Qiagen). RNA quantity was measured using the ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop® Technologies, Wilmington, USA). RNA quality was assessed using the 2100 Bioanalyzer® apparatus (Agilent Technologies, Massy, France) with the RNA 6000 Nano chips. Only high quality RNA (OD_{260}/OD_{280} > 1.9 and OD_{260}/OD_{230} > 1.7) and un-degraded RNA was considered for further analysis. A common reference RNA (Universal Human Reference RNA, Stratagene Europe, Amsterdam, The Netherlands) was used in conjunction with patient's RNA to provide an internal reference standard for comparisons of relative gene expression levels across arrays. Messenger RNAs were amplified using the Amino Allyl MessageAmp™ kit (Ambion®, Cambridgeshire, United Kingdom), starting with one μg of total RNA. Five μg of each amino allyl aRNA were labeled with Cy3 or Cy5 (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom). Dye coupling to RNA was measured using the ND-1000 NanoDrop® spectrophotometer. Coupling yield > 5% was a prerequisite for further analysis. 750 ng of each amino allyl aRNA labeled Cy3 or Cy5 (reference RNA or patient RNA) were combined and hybridized on oligonucleotide microarrays representing 25,000 genes [14]. Four replicates and a dye-swap were performed. Scanning was performed with an Axon 4000B scanner and data were acquired with the GenePix Pro 6® software (Molecular Devices, Berks, UK). Spot finding and raw data quantification were performed using the MAIA® freeware. A Lowess non linear normalization was performed and genes that were not present in at least 3 microarrays of 4 were filtered out. Data are available at the Gene Expression Omnibus database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/) under the accession number GSE11947.

Before statistical analysis, genes not present in at least 50% of the patients were filtered out. Supervised analysis was performed using the Significance Analysis of Microarrays software using 2-class unpaired test and 100 permutations. Heat maps were drawn using the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) software [37].

Quantitative PCR

The expression of mRNAs in blood cells of MI patients obtained upon admission was determined by quantitative PCR. Total RNA was extracted from blood cells collected in PAXgene® blood RNA tubes. PCR was performed using a CFX96 device and the IQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, Nazareth, Belgium). SF3A1 was used for normalization.

Network of protein-protein interactions

Genes known to be associated with angiogenesis in humans were retrieved from the Entrez-Gene database [38] with the query: "angiogenesis" AND "homo sapiens". The Human Protein Reference Database (release 9) [39] was then interrogated to identify all annotated protein-protein interactions associated with these genes. These interactions were used as inputs to build a network, which was visualized and analyzed with Cytoscape [40]. Clusters of highly interconnected proteins were identified by the MCODE plug-in network clustering algorithm [41].

In vivo experiments and biochemical analyses

Myocardial infarction was induced in 17 anesthetized Wistar rats (Charles Rivers Laboratories; 8-11 weeks; 310-380 g) by permanent occlusion of the left anterior descending (LAD) coronary artery as previously described [42,43]. An additional 4 rats were sham-operated. All rats were monitored *in vivo* 48 hours after

surgery and after 2 months with the use of a high resolution dedicated small animal positron emission tomography (PET) system with ^{18}F-FDG (IBA, Nancy, France) as a tracer and a premedication by acipimox, as previously described [44]. LV end-diastolic volume (LVEDV) was obtained on contiguous gated short-axis slices by the Quantitative Gated SPECT software [45]. The extent of remodeling was assessed by the change in LVEDV between 48-hours and 2-months after surgery (Δ LVEDV). At sacrifice, blood samples were collected, hearts were harvested, snap frozen and embedded in OCT. Parts of cardiac tissue were rinsed in NaCl and stored at -80°C for protein extraction. These experiments were conducted in accordance with the regulations of the Animal Welfare Act of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and protocols were approved by local Ethics Committee and by the Regional Veterinary Department.

For immunohistochemistry and collagen-specific Masson Trichrome staining (Dako, Leuven, Belgium), 8 μm frozen heart sections were generated. Primary antibody used was a rabbit polyclonal anti TGFBR1 antibody (Abcam, Cambridge, UK). Alexa Fluor®568-coupled donkey anti-rabbit antibodies (Jackson ImmunoResearch, UK) were used as secondary antibodies. Images were recorded on a confocal microscope (Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510) with a 40× objective using the LSM 510 META software. DAPI (blue) staining was used to reveal nuclei.

The TGFB1 ELISA kit (ref MB100B, R&D Systems) was used to measure TGFB1 in cardiac tissue. 50 μg of total proteins from each heart were assayed. This assay detects activated TGFB1 with a sensitivity of 4.6 pg/mL. To measure total TGFB1, latent TGFB1 is activated by acidification with hydrochloric acid prior to assay. Coefficient of variation intra-assay is < 4% and coefficient inter-assay is < 9%.

Statistical analysis

Comparisons between means of two groups were performed with the Mann-Whitney test. Categorical variables were compared using the Fisher exact test. Correlation between biomarker levels and the EF class was estimated with the Spearman test. All tests were two-tailed and were preceded by a normality test (Shapiro-Wilk). A P value < 0.05 was considered statistically significant. The SigmaPlot (v. 11.0) was used to carry-out statistical tests.

Prognostic performances of single genes were evaluated using receiver operating characteristic (ROC) curves and the area under the ROC curves (AUC), as well as linear regression models. Logistic regression models with ridge parameter of 1.0E-8 used to evaluate the predictive performances of multiple markers were implemented and tested using 10-fold cross-validation on the Weka (v. 3.4) data mining platform [46].

Reclassification analyses have been performed to evaluate the additive value of TGFBR1 to TnT and to a mixed clinical model. The net reclassification index (NRI) was calculated as the difference in proportions moving up and down among cases and controls: [Pr(up|case)-Pr(down|case)]-[Pr(up|control)-Pr(down|control)].

Acknowledgements

We thank Céline Jeanty, Malou Gloesener and Loredana Jacobs for expert technical assistance. This study was supported by grants from the Society for Research on Cardiovascular Diseases, the Ministry of Culture, Higher Education and Research, and the National Funds of Research of Luxembourg. M.B. is recipient of a fellowship from the National Funds of Research of Luxembourg (grant # PhD-AFR 08-024).

Author details

[1]Laboratory of Cardiovascular Research Centre de Recherche Public-Santé, Luxembourg, L-1150, Luxembourg. [2]Nancyclotep Experimental Imaging Platform, Nancy, F-54500, France. [3]Division of Cardiology, Centre Hospitalier, Luxembourg, L-1210, Luxembourg.

Authors' contributions

YD conceived the study and prepared the manuscript; MB performed in vivo experiments; SR performed in vitro experiments; PYM and FM participated in animal experiments; LZ analyzed microarray data; FA and DRW participated in study design and revised the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 10 August 2011 Accepted: 5 December 2011
Published: 5 December 2011

References

1. Torabi A, Cleland JG, Khan NK, Loh PH, Clark AL, Alamgir F, Caplin JL, Rigby AS, Goode K: **The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction.** *Eur Heart J* 2008, **29**:859-870.
2. Ezekowitz JA, Kaul P, Bakal JA, Armstrong PW, Welsh RC, McAlister FA: **Declining in-hospital mortality and increasing heart failure incidence in elderly patients with first myocardial infarction.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **53**:13-20.
3. Schocken DD, Benjamin EJ, Fonarow GC, Krumholz HM, Levy D, Mensah GA, Narula J, Shor ES, Young JB, Hong Y: **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.
4. de Kam PJ, Nicolosi GL, Voors AA, van den Berg MP, Brouwer J, van Veldhuisen DJ, Barlera S, Maggioni AP, Giannuzzi P, Temporelli PL, Latini R, van Gilst WH: **Prediction of 6 months left ventricular dilatation after myocardial infarction in relation to cardiac morbidity and mortality. Application of a new dilatation model to GISSI-3 data.** *Eur Heart J* 2002, **23**:536-542.
5. Azuaje F: **What does systems biology mean for biomarker discovery?** *Exp Opin Med Diagn* 2009, **4**:1-10.
6. Azuaje F, Devaux Y, Wagner DR: **Integrative pathway-centric modeling of ventricular dysfunction after myocardial infarction.** *PLoS One* 2010, **5**:e9661.
7. Devaux Y, Azuaje F, Vausort M, Yvorra C, Wagner DR: **Integrated protein network and microarray analysis to identify potential biomarkers after myocardial infarction.** *Funct Integr Genomics* 2010, **10**:329-337.

8. Nepomuceno-Chamorro I, Azuaje F, Devaux Y, Nazarov PV, Muller A, Aguilar-Ruiz JS, Wagner DR: **Prognostic transcriptional association networks: a new supervised approach based on regression trees.** *Bioinformatics* 2011, **27**:252-258.
9. Gerber BL, Rochitte CE, Melin JA, McVeigh ER, Bluemke DA, Wu KC, Becker LC, Lima JA: **Microvascular obstruction and left ventricular remodeling early after acute myocardial infarction.** *Circulation* 2000, **101**:2734-2741.
10. Bolognese L, Carrabba N, Parodi G, Santoro GM, Buonamici P, Cerisano G, Antoniucci D: **Impact of microvascular dysfunction on left ventricular remodeling and long-term clinical outcome after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction.** *Circulation* 2004, **109**:1121-1126.
11. Nijveldt R, Beek AM, Hirsch A, Stoel MG, Hofman MB, Umans VA, Algra PR, Twisk JW, van Rossum AC: **Functional recovery after acute myocardial infarction: comparison between angiography, electrocardiography, and cardiovascular magnetic resonance measures of microvascular injury.** *J Am Coll Cardiol* 2008, **52**:181-189.
12. 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.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:12890-12895.
13. Azuaje F, Devaux Y, Vausort M, Yvorra C, Wagner DR: **Transcriptional networks characterize ventricular dysfunction after myocardial infarction: A proof-of-concept investigation.** *J Biomed Inform* 2010, **43**:812-819.
14. Le Brigand K, Russell R, Moreilhon C, Rouillard JM, Jost B, Amiot F, Magnone V, Bole-Feysot C, Rostagno P, Virolle V, Defamie V, Dessen P, Williams G, Lyons P, Rios G, Mari B, Gulari E, Kastner P, Gidrol X, Freeman TC, Barbry P: **An open-access long oligonucleotide microarray resource for analysis of the human and mouse transcriptomes.** *Nucleic Acids Res* 2006, **34**:e87.
15. Margulies KB, Bednarik DP, Dries DL: **Genomics, transcriptional profiling, and heart failure.** *J Am Coll Cardiol* 2009, **53**:1752-1759.
16. Wingrove JA, Daniels SE, Sehnert AJ, Tingley W, M E, Rosenberger S, Buellesfeld L, Grube E, Newby LK, Ginsburg GS, Kraus WE: **Correlation of Peripheral-Blood Gene Expression With the Extent of Coronary Artery Stenosis.** *Circ Cardiovasc Genet* 2008, **1**:31-38.
17. Cappuzzello C, Napolitano M, Arcelli D, Melillo G, Melchionna R, Di Vito L, Carlini D, Silvestri L, Brugaletta S, Liuzzo G, Crea F, Capogrossi MC: **Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells of chronic heart failure patients.** *Physiol Genomics* 2009, **38**:233-240.
18. Almendral JL, Shick V, Rosendorff C, Atlas SA: **Association between transforming growth factor-[beta]1 and left ventricular mass and diameter in hypertensive patients.** *J Am Soc Hypertens* 2010, **4**:135-141.
19. Villar AV, Cobo M, Llano M, Montalvo C, Gonzalez-Vilchez F, Martin-Duran R, Hurle MA, Nistal JF: **Plasma Levels of Transforming Growth Factor-î²1 Reflect Left Ventricular Remodeling in Aortic Stenosis.** *PLoS One* 2009, **4**: e8476.
20. Zethelius B, Berglund L, Sundstrom J, Ingelsson E, Basu S, Larsson A, Venge P, Arnlov J: **Use of multiple biomarkers to improve the prediction of death from cardiovascular causes.** *N Engl J Med* 2008, **358**:2107-2116.
21. Ware JH: **The limitations of risk factors as prognostic tools.** *N Engl J Med* 2006, **355**:2615-2617.
22. Heidecker B, Kasper EK, Wittstein IS, Champion HC, Breton E, Russell SD, Kittleson MM, Baughman KL, Hare JM: **Transcriptomic biomarkers for individual risk assessment in new-onset heart failure.** *Circulation* 2008, **118**:238-246.
23. Zile MR, Desantis SM, Baicu CF, Stroud RE, Thompson SB, McClure CD, Mehurg SM, Spinale FG: **Plasma Biomarkers That Reflect Determinants of Matrix Composition Identify the Presence of Left Ventricular Hypertrophy and Diastolic Heart Failure.** *Circ Heart Fail* 2011, **4**:246-256.
24. Oemrawsingh RM, Lenderink T, Akkerhuis KM, Heeschen C, Baldus S, Fichtlscherer S, Hamm CW, Simoons ML, Boersma E: **Multimarker risk model containing troponin-T, interleukin 10, myeloperoxidase and placental growth factor predicts long-term cardiovascular risk after non-ST-segment elevation acute coronary syndrome.** *Heart* 2011, **97**:1061-1066.
25. Koitabashi N, Danner T, Zaiman AL, Pinto YM, Rowell J, Mankowski J, Zhang D, Nakamura T, Takimoto E, Kass DA: **Pivotal role of cardiomyocyte TGF-beta signaling in the murine pathological response to sustained pressure overload.** *J Clin Invest* 2011, **126**:2301-2312.
26. Pepper MS: **Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity.** *Cytokine Growth Factor Rev* 1997, **8**:21-43.
27. Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG: **Transforming growth factor (TGF)-[beta] signaling in cardiac remodeling.** *J Mol Cell Cardiol* 2011, **51**:600-606.
28. Ellmers LJ, Scott NJA, Medicherla S, Pilbrow AP, Bridgman PG, Yandle TG, Richards AM, Protter AA, Cameron VA: **Transforming Growth Factor-{beta} Blockade Down-Regulates the Renin-Angiotensin System and Modifies Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction.** *Endocrinology* 2008, **149**:5828-5834.
29. Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, Wang X-F, Frangogiannis NG: **Essential Role of Smad3 in Infarct Healing and in the Pathogenesis of Cardiac Remodeling.** *Circulation* 2007, **116**:2127-2138.
30. Kapur NK: **Transforming Growth Factor-î²**. *Circ Heart Fail* 2011, **4**:5-7.
31. Mukherjee R, Rivers WT, Ruddy JM, Matthews RG, Koval CN, Plyler RA, Chang EI, Patel RK, Kern CB, Stroud RE, Spinale FG: **Long-Term Localized High-Frequency Electric Stimulation Within the Myocardial Infarct: Effects on Matrix Metalloproteinases and Regional Remodeling.** *Circulation* 2010, **122**:20-32.
32. Tan SM, Zhang Y, Connelly KA, Gilbert RE, Kelly DJ: **Targeted inhibition of activin receptor-like kinase 5 signaling attenuates cardiac dysfunction following myocardial infarction.** *Am J Physiol-Heart and Circ Physiol* 2010, **298**:H1415-H1425.
33. Okada H, Takemura G, Kosai K-i, Li Y, Takahashi T, Esaki M, Yuge K, Miyata S, Maruyama R, Mikami A, Minatoguchi S, Fujiwara T, Fujiwara H: **Postinfarction Gene Therapy Against Transforming Growth Factor-{beta} Signal Modulates Infarct Tissue Dynamics and Attenuates Left Ventricular Remodeling and Heart Failure.** *Circulation* 2005, **111**:2430-2437.
34. Hawinkels LJAC, ten Dijke P: **Exploring anti-TGF-î²** therapies in cancer and fibrosis.** *Growth Factors* 2011, **29**:140-152.
35. Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Hellemans J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, Dietz HC: **A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2.** *Nat Genet* 2005, **37**:275-281.
36. Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, De Backer JF, Oswald GL, Symoens S, Manouvrier S, Roberts AE, Faravelli F, Greco MA, Pyeritz RE, Milewicz DM, Coucke PJ, Cameron DE, Braverman AC, Byers PH, De Paepe AM, Dietz HC: **Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor.** *N Engl J Med* 2006, **355**:788-798.
37. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP: **Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:15545-15550.
38. **The Entrez-Gene Database.** [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez].
39. Peri S, Navarro JD, Amanchy R, Kristiansen TZ, Jonnalagadda CK, Surendranath V, Niranjan V, Muthusamy B, Gandhi TK, Gronborg M, Ibarrola N, Deshpande N, Shanker K, Shivashankar HN, Rashmi BP, Ramya MA, Zhao Z, Chandrika KN, Padma N, Harsha HC, Yatish AJ, Kavitha MP, Menezes M, Choudhury DR, Suresh S, Ghosh N, Saravana R, Chandran S, Krishna S, Joy M, Anand SK, Madavan V, Joseph A, Wong GW, Schiemann WP, Constantinescu SN, Huang L, Khosravi-Far R, Steen H, Tewari M, Ghaffari S, Blobe GC, Dang CV, Garcia JG, Pevsner J, Jensen ON, Roepstorff P, Deshpande KS, Chinnaiyan AM, Hamosh A, Chakravarti A, Pandey A: **Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans.** *Genome Res* 2003, **13**:2363-2371.
40. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T: **Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks.** *Genome Res* 2003, **13**:2498-2504.
41. Bader GD, Hogue CW: **An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks.** *BMC Bioinformatics* 2003, **4**:2.
42. Maskali F, Franken PR, Poussier S, Tran N, Vanhove C, Boutley H, Le Gall H, Karcher G, Zannad F, Lacolley P, Marie PY: **Initial infarct size predicts subsequent cardiac remodeling in the rat infarct model: an in vivo serial pinhole gated SPECT study.** *J Nucl Med* 2006, **47**:337-344.

43. Maskali F, Poussier S, Marie PY, Tran N, Antunes L, Olivier P, Plenat F, Maitrejean S, Zannad F, Karcher G: **High-resolution simultaneous imaging of SPECT, PET, and MRI tracers on histologic sections of myocardial infarction.** *J Nucl Cardiol* 2005, **12**:229-230.
44. Poussier S, Maskali F, Tran N, Person C, Maureira P, Boutley H, Karcher G, Lacolley P, Regnault V, Fay R, Marie PY: **ECG-triggered (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging of the rat heart is dramatically enhanced by acipimox.** *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2010, **37**:1745-1750.
45. Germano G, Kiat H, Kavanagh PB, Moriel M, Mazzanti M, Su HT, Van Train KF, Berman DS: **Automatic quantification of ejection fraction from gated myocardial perfusion SPECT.** *J Nucl Med* 1995, **36**:2138-2147.
46. Frank E, Hall M, Trigg L, Holmes G, Witten IH: **Data mining in bioinformatics using Weka.** *Bioinformatics* 2004, **20**:2479-2481.

Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:
http://www.biomedcentral.com/1755-8794/4/83/prepub

doi:10.1186/1755-8794-4-83
Cite this article as: Devaux *et al.*: Transforming growth factor β receptor 1 is a new candidate prognostic biomarker after acute myocardial infarction. *BMC Medical Genomics* 2011 **4**:83.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central