



HAL
open science

Rôles des cytokines IL-6 et MCP-1 dans le recrutement précoce de macrophages antiinflammatoires lors de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde : rôle de l'inflammasome NLRP3

Alexandre Paccalet

► **To cite this version:**

Alexandre Paccalet. Rôles des cytokines IL-6 et MCP-1 dans le recrutement précoce de macrophages antiinflammatoires lors de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde : rôle de l'inflammasome NLRP3. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1103 . tel-04139943

HAL Id: tel-04139943

<https://theses.hal.science/tel-04139943v1>

Submitted on 24 Jun 2023

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.

N°d'ordre NNT : 2021LYSE1103



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale N° 205
École Doctorale Interdisciplinaire Science Santé

Spécialité de doctorat : Science Santé
Discipline : Physiologie cardiovasculaire

Soutenue publiquement le 23/06/2021, par :
Alexandre Paccalet

**Rôles des cytokines IL-6 et MCP-1 dans le
recrutement précoce de macrophages anti-
inflammatoires lors de la phase aiguë de
l'infarctus du myocarde**

Devant le jury composé de :

Dr Ebba Brakenhielm	DR2 Inserm, Université de Rouen Normandie	Rapporteuse
Pr Denis Angoulvant	PUPH, Université de Tours	Rapporteur
Pr Fabrice Prunier	PUPH, Université d'Angers	Examineur
Pr Emmanuelle Canet Soulas	PU, Université Claude Bernard Lyon 1	Examinatrice
Dr Claire Crola Da Silva	IR2 Inserm, Université Claude Bernard Lyon 1	Directrice de thèse
Dr Thomas Bochaton	PH, Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur de thèse
Pr Michel Ovize	PUPH, Université Claude Bernard Lyon 1	Membre invité

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-Président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALLIER
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES & DEPARTEMENTS DE SCIENCES & TECHNOLOGIE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur M. Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurances (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Institut National du Professorat et de l'Éducation	Administrateur Provisoire : M. Pierre CHAREYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Remerciements

Je souhaite sincèrement remercier les membres du jury pour le temps consacré à l'évaluation de mes travaux de thèse ainsi que pour l'intérêt qu'ils portent à notre sujet de recherche.

Aux rapporteurs de ce travail :

Dr Ebba Brakenhielm, c'est un grand plaisir de vous compter parmi les membres de mon jury. Votre expertise en inflammation cardiovasculaire apporte à ce travail une valeur indispensable. Je vous en suis très reconnaissant.

Pr Denis Angoulvant, vous me faites l'honneur de juger cette thèse et je vous en remercie. Vous avez une place particulière dans ce travail ayant notamment orienté Thomas vers la recherche. J'ai pu apprécier durant vos différentes présentations, votre maîtrise de la recherche translationnelle. Votre expertise clinique combinée à votre accessibilité et votre sympathie sont des atouts majeurs à cette thèse.

Aux examinateurs de ce travail :

Pr Emmanuelle Canet-Soulas, je te remercie d'avoir accepté l'évaluation de mes travaux. J'ai découvert au cours de ces années la proximité entre l'inflammation cérébrale et cardiaque, et pouvoir compter sur ton expertise de l'inflammation est donc un atout majeur. J'espère que nous poursuivrons nos collaborations à l'avenir.

Pr Fabrice Prunier, c'est un honneur de vous compter parmi mon jury. Votre expertise dans le domaine de la cardioprotection tant clinique que pré-clinique ajoute une plus-value indéniable à ce travail.

A mes jurys de comité de suivi de thèse :

Aux docteurs **Jennifer Rieusset**, **Elise Belaidi-Corsat**, **Fabienne Rajas**, merci d'avoir accepté de prendre sur votre temps pour m'aider dans mon projet de thèse, les discussions durant ces CST m'ont été très bénéfiques et je vous en remercie.

Au **Dr Anne-Sophie Bidaux**, au **Pr Pedro Da Silva**, vous avez suivi ce projet durant trois années, merci pour toutes vos suggestions, pour tous vos commentaires, pour vos coups de pression enveloppés dans des mots plus polis. J'admire vos connaissances scientifiques et pouvoir compter sur vous à mes côtés a été un réel plaisir. Merci également d'être les personnes que vous êtes dans la vie de tous les jours. Je vous suis très reconnaissant de votre soutien.

Je souhaite également remercier le **Dr Sandrine Giraud**, vous avez été ma conseillère pédagogique durant mes deux premières années universitaires et sans votre soutien et votre aide, je n'aurais pas pu concilier mon sport de haut niveau avec mes études que j'aurais sans doute abandonnées. Je vous en suis très reconnaissant.

A toutes les personnes qui m'ont accompagné durant cette thèse :

Pr Michel Ovize, Merci Michel de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans votre laboratoire. Vous m'avez appris à visualiser mes résultats d'un point de vue clinique, avec ces fameux : « And so what ? ». Vous m'avez permis de travailler sur la cohorte HIBISCUS qui m'a beaucoup apportée. Vous m'avez également soutenu et encouragé dans chacune de mes démarches et je vous en remercie. Enfin merci d'avoir eu ce regard bienveillant durant

l'ensemble de ma thèse. C'est un réel honneur d'avoir pu travailler dans votre laboratoire. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance.

Claire Crola Da Silva et Thomas Bochaton. Quel plaisir de travailler avec vous durant ces quatre années. Vous avez accueilli à bras ouvert un master, qui n'avait même pas trouvé de stage, qui voulait venir une demi-journée pour pouvoir faire du vélo et qui ne connaissait rien. Après cette belle entrée en matière, vous avez changé ma vie au sens premier du mot. Vous m'avez transmis cet amour de la recherche et je vous en remercie. Quelle aventure de passer ces quatre années à vos côtés.

Claire. Que dire, tu as eu confiance en moi dès le premier jour et je t'en remercie. Tu m'as tout appris sur le plan scientifique, chaque manip, chaque analyse. Tu as été un soutien irremplaçable durant ces années. Tu as toujours encouragé mes choix comme pour débiter la thèse « tu es vraiment sûr ??? » ou pour demander le financement de 4^{ème} année « t'es sûr tu ne veux pas partir car tu peux... » haha. Tu es devenue durant ces années bien plus qu'une directrice de thèse, une réelle amie. J'ai adoré toutes ces quilles tombées pour la science autour de ces grands discours avec Pedro et les enfants. Je pourrais en écrire des tonnes je vais m'arrêter là. Tout simplement MERCI.

Thomas. Merci d'être toujours présent, toujours positif, enthousiaste et partant pour de nouvelles études. Tu m'as appris la base de mon travail et tu m'as transmis ton enthousiasme permanent. A tous nos grands moments autour de nos centaines de plaques d'ELISA, à notre œuvre d'art et à nos craquages, aux « On va être riche » et à tous nos titres pour le futur Lancet. Merci de m'avoir appris tant de choses. J'ai eu beaucoup de chance de travailler avec toi et de pouvoir compter sur toi à tout moment de cette thèse. Tes précieux conseils sont bien imprimés. Je t'attends de pieds fermes à Boston et je reviendrai pour continuer nos travaux dans ta tour de recherche ! MERCI pour tout.

Gabriel Bidaux, j'ai d'abord été impressionné par cet aplomb à toutes épreuves, puis fasciné par ce niveau de connaissance et de culture. Merci Gab de m'avoir transmis ta passion de la recherche. Merci pour toutes ces heures de tableau blanc, pour tous ces conseils, pour toute l'aide que tu m'as apporté sur le projet et pour toutes ces remises en question. Comme diraient certains, tu m'as pris sous ton aile et je t'en suis très reconnaissant. J'apprends tous les jours à tes côtés et suis admiratif un peu plus chaque jour. J'espère, mais ça tu le sais déjà, que nous continuerons à travailler ensemble pendant de longues années. Mais surtout, au-delà du travail, je suis fier de pouvoir te compter parmi mes amis. Quel plaisir à préparer ces différents trails, toujours plus haut et plus long, à partager ces repas et nos visions des choses. A toutes nos grandes discussions et à celles à venir. Merci pour tout !

A mes collègues :

Ludovic Gomez. Merci Ludo pour tout ce que tu m'as apporté tant sur le plan personnel que professionnel. Merci de m'avoir appris l'isolation, le théorème du trépied et bien plus encore. Après 17 ans de vélo, j'ai appris de nouvelles choses sur celui-ci également. Merci pour ton amitié et tous tes conseils malgré nos caractères parfois explosifs dirons-nous haha. J'espère que nous resterons en contact et que vous viendrez à Boston.

Mélanie Paillard-Gomez. MP, merci pour ta bonne humeur permanente et ton hyper activité. Avec une bonne paire de boules Quies, travailler avec toi est un réel plaisir ;) ! Merci de parler tout le temps, d'avoir un avis sur tout et surtout de le donner ! Merci d'être le fond sonore

officiel de nos sorties de course à pieds, j'avoue aujourd'hui, on ne t'écoute pas toujours. J'espère que nous continuerons à travailler en collaboration. En revanche Thomas et moi attendons toujours l'invitation au congrès Leducq !

Yves Gouriou. Désolé d'avoir dit que les triathlètes sont tous des peintres et désolé d'avoir utilisé l'expression moteur de tondeuse à gazon haha. Tu m'as formé à la microscopie et je t'en remercie sincèrement. J'ai passé quatre super années à discuter sport mais pas que ;) avec toi. J'ai adoré retrouver mon groupe de petits vieux au café le matin. Merci également pour tous ces moments passés hors labo, ne changes pas. Si j'ai un western à faire un jour, je sais vers qui me tourner ;) . J'attends déjà que tu viennes avec mon pote Simon nous voir. Je n'oublie pas ton adage : « On n'a qu'une vie !!! ».

Fabrice Gonnot. Ou devrais-je dire lieutenant des franc-machons ! Merci pour toutes tes blagues douteuses, pour tes fous rires communicatifs, pour toutes tes petites astuces cuisine « rajoute 1kg de graisse de canard, c'est meilleur ». Merci pour tes bons plans vin et ta joie de vivre ! Mais aussi merci pour tes cours de biomol pour les nuls. J'ai aimé ces grands débats sans fin lors des repas du midi et ton besoin de contradiction. Merci pour tous ces bons moments !

Christophe Chouabe. Christophe, j'ai tout d'abord adoré le prof à la fac, mais quand j'ai connu la personne, j'ai mieux compris pourquoi. Merci pour toutes ces discussions autour du sport, de nos parcours, merci pour tes cours d'electrophi. Tu m'as permis d'enseigner en TP durant cette thèse et je t'en remercie. Surtout ne change rien mais je sais que ce n'était pas prévu ;) . Au fait, n'oublie pas, « rouge et bleu sont nos couleurs, lyonnais est notre cœur ».

Bruno Pillot. A toi aussi Bruno merci pour toutes tes blagues douteuses. Merci pour tout ce que tu as réalisé pour mon projet. Merci pour ta bonne humeur permanente, même quand on est très chiant avec toi (et je ne l'ai pas été qu'une fois^^). J'ai bien retenu tous les petits conseils glissés discrètement au détour d'une discussion en salle de chir.

Noëlle Gallo-Bona. Merci Noëlle pour ta bienveillance quotidienne. Merci de nous avoir laissés un bout de paillasse pour faire nos ELISA. On savait vers qui se tourner pour trouver le réconfort, tu étais un peu notre maman à tous. Profite bien de ta retraite.

Delphine Baetz. Merci delph pour ton aide et ton soutien durant ces années. Même si je suis une « tête de con » haha ça a été un réel plaisir de travailler avec toi. Tu es une chouette personne.

Mégane Lo-Grasso. Merci Mégane pour ta bonne humeur permanente, je suis juste déçu de n'avoir jamais rencontré Morgane ;p !

Andrea Kaczmarczyk et Murielle Robert. Merci pour votre soutien durant cette thèse, vous faisiez partie du petit groupe de vieux du matin haha. Même si avec mon caractère, ça n'a pas toujours été facile, je vous remercie pour votre aide.

Fabien Van Coppenolle. Un grand merci Fabien de m'avoir permis de m'inscrire au master sans stage et surtout de m'avoir présenté à Claire et Thomas. Sans toi, je ne serais pas là aujourd'hui. Je t'en suis très reconnaissant.

Sylvie Ducreux. Merci pour tous les moments passés au labo, ne lâche pas la course à pieds, prochain défi un trail longue distance ?

Marlène Wiart. Merci Marlène pour ces petits challenges lors de mes présentations. J'ai apprécié discuter avec toi de ces mécanismes inflammatoires. Merci également pour ta sympathie. J'espère que l'on continuera de collaborer.

Laura Mechtouff. J'ai pris énormément de plaisir à travailler avec toi sur cette cohorte STROKE. Je te remercie sincèrement de m'avoir impliqué dans ces projets. J'espère que nous continuerons de travailler ensemble à l'avenir et que ton séjour à Milan te sera très bénéfique.

Christophe Soulage. Merci pour tes conseils et ta bienveillance. Merci de m'avoir appris quelques mots compliqués ;)

Lionel Augeul, merci Lionel d'avoir formé Claire à l'informatique haha. J'ai aimé notre vision commune des revues de processus ;). Merci pour tout ce que tu as fait sur mon projet.

Christelle Leon. Merci pour ton soutien durant ces années et ton aide précieuse.

René Ferrera. Merci René pour ta bienveillance et tes encouragements permanents. Comment ne pas évoquer cette gentillesse, vous formez un sacré trio avec Chris et Jo. Ne changez rien ;).

Joseph Loufouat. Sacré Jo, merci pour tous tes petits filons sur les futures recrues du plus grand président. Quel plaisir de charrier Chris sur les défaites du club de national qu'il supporte. Allez l'OL !!! Et passe le bonjour au président Aulas.

Simon Leboube. J'ai pris énormément de plaisir à te former et à travailler avec toi. Notre projet TASCØ a un grand avenir ! A tous ces bons moments au labo et en dehors. J'espère que l'on continuera de collaborer dans la tour Cardio de Thomas ;). Ne change rien.

Denis Ressnickoff et Bruno Chapuis. Merci pour votre aide pour la microscopie et votre sympathie.

Enfin à mon bureau de championnes, cette thèse n'aurait pas été la même sans vous, **Sally Badawi, Zeina Harkous, Maya Dia, Nolwenn Tessier, Mallory Ducrozet**, vous avez été plus que de simples collègues, que dire sur tous ces moments passés ensemble, quel plaisir d'être à vos côtés tous les jours.

Sally, my spiritual Sister! The two years working with you were amaaaazing. I enjoyed every moment, the paper ball war, the French and Lebanese lessons, the long hours trying to understand and absorb what daddy explains us in 5 min on the white board... I miss your bad mood days "No it's not science, it has to work...", your "oui je fou" and your "gene A and gene

B" explanations. To resume, I missed you. See you in the winner's office workshop in the Seychelles! Yalla Shiril!

Zeina, you were the office's key pillar, our Switzerland spirit during the fight. I missed the Arabic word, the "c'est pas acceptable monsieur Paccalet" and the little paper on the desk each evening. You took care of us every single day. Living beside you was like nothing can impact your mood, you were always calm and comforting for others. Thank you for just being you! I truly missed you! See you soon in Boston!!!

Maya, I get the chance to meet the Princess of Liban! We walk side by side since our day one in the lab and I enjoyed every moment. Except the fact that you took way too much selfies and you used too much Instagram, you are a tremendous person. Even if I did not often say it, you were my support in the lab. The last couple of months without you were kind of weird. Enjoy Paris, but I don't want to see daily pictures of "Maya in Paris" on Insta.

Mallory, mallolo, pepe la tentatrice et j'en passe. Nous avons et nous continuons de passer de supers moments ensemble. J'attends avec impatience que tu ouvres ton bar, même si j'ai peur pour ton stock et ton foie. Merci d'être plus performante que le petit paumé pour décrire les lieux de vie lyonnaise et merci de prendre du temps sur ton emploi du temps de ministre pour nous ! On se voit bientôt !

Nolwenn, Nonol. Nous avons formé un super binôme ! Quel plaisir de travailler avec toi sur nos projets, même si tu es un peu dictatrice sur les bords. Je ne sais même pas quoi dire tant j'aurais de chose à raconter. Quand je pense qu'au début tu ne me parlais pas, puis une amitié s'est tissée durant ces années. Je suis vraiment très heureux de te compter parmi mes amis. Essaie d'être un peu plus sympa avec **Pierre** et de ne pas lui faire faire tout le boulot à la maison STP ! J'ai hâte de venir vous voir dans votre bel appart. Tu me manques un peu quand même !

A mes amis :

Laura Iannuzzo. Merci de m'avoir sociabilisé ! Lol, même si ton sale caractère de mafieuse sicilienne te joue des tours tu es une personne formidable et je suis fier que tu fasses partie de mes amis. J'apprécie chaque moment partagé ensemble, surtout les aléas de portes... Vive la Sicile et vive Ballo !

Domitille Rajot. Faire ta connaissance en même temps que celle de lolubiquitaire a été un tournant. Que de souvenir durant cette année de master, et durant tous ces moments partagés par la suite. Je reste encore aujourd'hui fasciné par ta vitesse de réaction haha. Je suis fier que l'on soit amis !

Pierre Bourlot. Merci d'avoir toujours soutenu mes choix et adapté le programme. J'ai pu compter sur toi pendant sept ans comme entraîneur mais surtout comme ami.

Clement Venturini. Que de moments partagés sur et en dehors du vélo. Vivre H24 (presque) avec toi durant ces années a été un réel plaisir. Tu n'as toujours pas assimilé ce que je faisais maintenant mais je suis tout de même très fier de te compter parmi mes amis les plus proches. Tu sais la place que tu as !

William Brousse. Que dire, je suis fier de compter sur toi dans les bons comme dans les mauvais moments. A ces moments partagés sur le vélo mais surtout à tous ces moments partagés en dehors. A ton arrogance, à tes manières de fils unique. Merci d'être la personne que tu es ! A tous les moments qu'il nous reste à écrire ensemble.

A ma famille :

Mes oncles et tantes, **Annick, Fabrice, Jean-Philippe, Karine, Agnès**, merci pour votre soutien et votre amour, merci pour tous ces moments partagés.

Mes cousines et cousins, **Anthony, Julie, Yohann, Mélanie, Mathilde, Simon, Clémence**, merci pour tous ces moments passés ensemble, même si on ne se voit pas souvent vous avez une place dans mon cœur.

Philippe et Pascale, merci pour votre gentillesse et votre soutien. A **Estelle, Sébastien, Liam, Louan, Clémence, Vincent, Johann et Pascaline** merci pour tous ces bons moments passés et à venir !

Mes grand parents, **mamie** et **papi**, merci de m'avoir toujours soutenu et de m'avoir toujours encouragé dans chacun de mes choix, mamie, je ne suis pas cardiologue ni docteur en pharmacie haha. A mon **grand-oncle Albert** et à **marraine Josette**, merci pour tout ce que vous nous avez apporté, merci pour votre soutien et votre aide. Merci pour tous les bons moments partagés. A ma grand-mère, **mémé**, merci pour tout l'amour et tout le soutien que tu m'apportes. A tous ces bons moments passés ensemble, à **pépé**, qui aurait été fier, et qui m'a donné tant d'amour. Je ne serais pas la personne que je suis sans vous. Merci

Mes frères et sœurs, je suis extrêmement fier de vous. **Rebecca**, à tous nos moments partagés ensemble, à notre complicité, à notre collocation. A **Fabien** et à mon adorable filleul **Jules**. A ton sale caractère et ton calme légendaire. **Natacha**, à tous ces bons moments passés, à nos incrustes chez l'autre pour se faire payer à manger, à nos prises de bec et à nos attaques kungfu. **Dimitri**, à notre collocation, à ces bons moments, à tes remontées de bretelles, à ces moments à l'aérodrome et au rugby. J'ai énormément de chance de pouvoir compter sur vous. Vous êtes ma force.

Mes **parents**, pour leur amour et leur soutien infaillible, merci de m'avoir encouragé dans tous mes choix, merci de m'avoir inculqué ces valeurs du travail et de persévérance. Vous êtes mes deux plus grands modèles. Je ne saurais jamais vous remercier suffisamment pour tout ce que vous m'apportez tous les jours. Je vous aime.

Marie-Anaïs. A cette histoire que l'on a construite depuis maintenant cinq années, mais surtout à toutes les belles pages qu'il nous reste à écrire. Une aventure se termine pour laisser place à une encore plus grande à tes côtés. Je suis très privilégié de partager ta vie et de pouvoir me reposer sur toi. Merci de m'avoir soutenu dans les moments délicats, de m'avoir stimulé et aidé au quotidien. Merci de m'aimer tel que je suis et merci d'être la personne que tu es. Je t'aime.

Résumé de thèse

L'infarctus du myocarde touche environ 80 000 personnes par an en France chaque année. Malgré l'amélioration de la prise en charge des patients avec notamment le développement des techniques de reperfusion, la mortalité associée demeure trop élevée. Durant l'ensemble de la séquence d'ischémie et de reperfusion, un statut inflammatoire s'installe au niveau local et systémique.

Ce projet de thèse a pour but de mieux décrire les événements précoces afin d'améliorer les stratégies de cardioprotection visant l'inflammation dans l'infarctus du myocarde en se concentrant sur les sécrétions cytokiniques et l'infiltration des macrophages.

Les travaux de thèse sont divisés en trois axes de travail avec un premier axe visant à déterminer les cinétiques de sécrétions cytokiniques dans une cohorte de patients souffrant d'un infarctus du myocarde avec élévation du segment ST. S'appuyant sur un modèle *in vivo* d'infarctus du myocarde, le second axe a pour but d'évaluer la cinétique d'infiltration cardiaque de macrophages en trois dimensions durant les 24 premières heures post infarctus en corrélation avec les sécrétions cytokiniques. Enfin, un troisième axe de travail s'appuie sur un modèle *in vitro* de culture de cardiomyocytes adultes primaires pour déterminer si les cardiomyocytes participent au recrutement et à l'activation précoce des macrophages.

Cette étude translationnelle a permis de montrer qu'un grand nombre de cytokines étaient secrétées post infarctus, parmi lesquelles IL-6 et MCP-1 qui atteignent un pic de libération à 24H. Des taux circulants élevés d'IL-6 et de MCP-1 sont associés à la survenue d'évènements secondaires majeurs chez le patient. Nous avons également démontré que les cardiomyocytes souffrant sont au moins en partie responsable de ces sécrétions systémiques et induisent un recrutement de macrophages anti-inflammatoires. Ce recrutement de macrophages anti-inflammatoire est observé également *in vivo* dans le modèle pré-clinique d'infarctus du myocarde. Enfin nous avons démontré qu'une réduction de ce recrutement précoce de macrophages anti-inflammatoires était bénéfique en réduisant la taille d'infarctus.

L'ensemble des résultats de cette thèse démontrent l'importance de la notion de temporalité dans la régulation de l'inflammation post infarctus et suggèrent qu'une activation trop précoce des mécanismes anti-inflammatoires pourrait être délétère.

Abstract

Cardiovascular diseases remain the leading causes of mortality worldwide. Among cardiovascular diseases, myocardial infarction results from a coronary artery occlusion. This ischemic pathology activates inflammation mechanisms that could lead to secondary complications. Despite improved therapies, such as reperfusion, clinical management of complications remains a real challenge. Thus, understanding inflammatory mechanism development after myocardial infarction remains a major public health issue. The objective of the study is to evaluate the cytokines secretions and macrophages infiltration in the very acute phase of myocardial infarction.

The thesis project is divided in three main axes, the first aimed to decipher the kinetics of the cytokine secretions in patients suffering from myocardial infarction with ST segment elevation. The second axis, based on a murine model of myocardial infarction, is performed to evaluate the macrophage infiltration in whole organ in the first 24 hours of reperfusion in correlation with the systemic inflammatory status evaluated by the quantification of cytokine secretions in the sera. The third axis aimed to evaluate *in vitro* the ability of primary adult cardiac myocyte to induce macrophages recruitment and activation in response to an hypoxia-reoxygenation stress.

This translational study demonstrates that several cytokines are secreted in response to myocardial infarction. Among cytokines, IL-6 and MCP-1 release reach a peak at 24h and a high level of those two cytokines is associated with the occurrence of major adverse cardiac event. We demonstrated that cardiac myocytes are at least partly responsible for these IL-6 and MCP-1 secretions and induce an anti-inflammatory macrophages recruitment. The acute anti-inflammatory macrophages recruitment is observed in the pre-clinical model of myocardial infarction. We finally shown that a reduction of acute anti-inflammatory macrophages leads to reduce infarct size.

Taking together, the study results highlight the importance of the temporal kinetics of inflammation regulation and suggest that a too early anti-inflammatory mechanism activation may be deleterious.

Table des matières

Préambule	15
Listes des publications	16
1. Publications acceptées.....	16
2. Publications en cours de révision	18
3. Publications en préparation	19
Listes des figures	20
Liste des tableaux	21
Listes des abréviations	22
Introduction.....	25
1. L'infarctus du myocarde.....	25
1.1. Épidémiologie et Physiopathologie de l'infarctus du myocarde	27
1.2. Prise en charge du patient STEMI	29
2. Pathologie de l'ischémie-reperfusion	30
2.1. L'ischémie	30
2.2. La Reperfusion	31
2.3. Mise en place de la mort cellulaire durant la séquence d'ischémie-reperfusion .	32
2.4. Les modèles d'ischémie-reperfusion	34
2.5. Les stratégies de cardioprotection	35
a) Conditionnement ischémique.....	37
b) Conditionnement pharmacologique.....	39
2.6. A la recherche de nouvelles cibles pour la cardioprotection.....	40
3. L'inflammation	41
3.1. Les différents types cellulaires impliqués dans la réponse inflammatoire	41
3.2. Le recrutement et l'infiltration des cellules immunitaires	43
a) Les chimiokines	43
b) Les molécules d'adhésion	44
4. L'immunité innée.....	46
4.1. Ses différentes fonctions	46
4.2. Les mécanismes de reconnaissance et d'activation mis en jeu	47
5. Inflammation et réponse immunitaire innée dans l'infarctus du myocarde	49
5.1. Les macrophages résidents.....	49
5.2. Différentes vagues de recrutement post infarctus.....	51
a) Recrutement de neutrophiles	51
b) Recrutement de monocytes.....	52
c) Recrutement de macrophages pro-inflammatoires.....	53
d) Recrutement de macrophages de type anti-inflammatoire	54
5.3. L'inflammation : nouvelle cible dans la cardioprotection.....	55
a) Modulation de l'activité des neutrophiles	56
b) Modulation de l'activation des macrophages.....	57
c) L'inhibition du système du complément.....	58

d) L'inhibition de différentes cytokines.....	59
e) Autres traitements anti-inflammatoires	61
But du projet.....	63
Matériel et méthodes	66
1. Caractéristiques des Animaux	66
2. Modèles cellulaires	66
2.1. Cultures primaires de cardiomyocytes de souris.....	66
2.2. Culture primaire de macrophages murins issus de la moelle osseuse	67
2.3. Protocole d'hypoxie-réoxygénation <i>in vitro</i>	67
2.4. Protocole de différenciation des macrophages	68
2.5. Modèle <i>in vitro</i> d'évaluation du taux de recrutement des macrophages	69
2.6. Modèle d'activation des macrophages par le milieu conditionné hypoxie- réoxygénation des cardiomyocytes	70
2.7. Caractérisation phénotypique des macrophages par cytométrie en flux.....	71
2.8. Traitement des cellules avec l'inhibiteur pharmacologique de la voie de signalisation STAT3	72
2.9. Traitement des milieux conditionnés avec anticorps neutralisants	73
3. Modèle <i>in vivo</i> d'infarctus du myocarde	74
4. Développement de la méthode de transparence du cœur.....	76
5. Protocole d'imagerie des cœurs entier en trois dimensions.	80
6. Quantification des sécrétions de cytokines par la technique d'ELISA.....	82
7. Évaluation des sécrétions cytokiniques dans la cohorte de patients HIBISCUS STEMI.	83
8. Statistiques.....	84
Résultats	85
1. Évaluation de la cinétique des sécrétions d'IL6 et MCP-1 dans le sérum de patients STEMI	85
2. Évaluation de la cinétique d'IL-6 et MCP-1 dans le sérum de souris après un infarctus du myocarde	92
3. Analyses des sécrétions cytokiniques des cardiomyocytes	95
4. Recrutement des macrophages par les cardiomyocytes	100
5. Évaluation du recrutement de macrophages anti-inflammatoires dans la phase précoce de l'ischémie-reperfusion <i>in vivo</i>	103
6. Évaluation du rôle de MCP-1 et d'IL-6 dans le recrutement des macrophages par les cardiomyocytes	106
7. Différenciation des macrophages par le milieu conditionné des cardiomyocytes..	110
8. Évaluation de l'effet d'un traitement <i>in vivo</i> avec STATTIC sur la taille d'infarctus	113
9. Bilan des résultats.....	115
Discussions et perspectives	117
1. Sécrétion de MCP-1 et d'IL-6 dans les modèles d'infarctus du myocarde.....	118
2. Recrutement de macrophages anti-inflammatoires	120
3. Rôle cardioprotecteur de l'inhibition de la voie de signalisation STAT3	122
4. Perspectives générales.....	126

Publications	127
1. Publications en lien avec le projet de thèse.....	127
1.1. A Dynamic Transcriptional Analysis Reveals IL-6 Axis as a Prominent Mediator of Surgical Acute Response in Non-ischemic Mouse Heart	127
a) Introduction	127
b) Publication	128
1.2. An innovative sequence of hypoxia-réoxygénation on adult mouse cardiomyocytes in suspension to perform multilabeling analysis by flow cytometry... 143	
a) Introduction	143
b) Publication	144
1.3. Heat-shock protein 70 as a biomarker of clinical outcomes after STEMI	153
a) Introduction	153
b) Publication	154
1.4. Association of myocardial hemorrhage and persistent microvascular obstruction with circulating inflammatory biomarkers in STEMI patients	157
a) Introduction	157
b) Publication	158
1.5. Kinetics and prognostic value of soluble VCAM-1 in ST-segment elevation myocardial infarction patients.....	171
a) Introduction	171
b) Publication	172
1.6. Myocardial ischemia-reperfusion and diabetes, lessons learned from bedside to bench 181	
a) Introduction	181
b) Publication	183
1.7. Soluble C-Met as a biomarker of clinical outcomes after STEMI	190
a) Introduction	190
b) Publication	191
2. Publications collaboratives portant sur l'ischémie-reperfusion cérébrale.....	192
2.1. Association of Interleukin-6 levels and futile reperfusion after mechanical thrombectomy.....	194
a) Introduction	194
b) Publication	195
2.2. Matrix Metalloproteinase-9 Relationship with Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation in the Era of Thrombectomy.....	201
a) Introduction	201
b) Publication	202
2.3. Matrix Metalloproteinase-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Are Associated With Collateral Status in Acute Ischemic Stroke With Large Vessel Occlusion. 209	
a) Introduction	209
b) Publication	210
2.4. Large vessel cardioembolic stroke and embolic stroke of undetermined source share a common profile of matrix metalloproteinase-9 level and susceptibility vessel sign length	214
a) Introduction	214
b) Publication	215

2.5. A lower admission level of interleukin-6 is associated with first-pass effect in ischemic stroke patients.....	233
a) Introduction	233
b) Publication	233
3. Publications collaboratives	234
3.1. Acute Induction of Translocon-Mediated Ca ²⁺ Leak Protects Cardiomyocytes Against Ischemia/Reperfusion Injury.....	234
a) Introduction	234
b) Publication	235
3.2. Simultaneous assessment of microcalcifications and morphological criteria of vulnerability in carotid artery plaque using hybrid 18F-NaF PET/MRI.	253
a) Introduction	253
b) Publication	254
Bibliographie.....	265

Préambule

Les maladies cardiovasculaires restent aujourd'hui la première cause de mortalité dans le monde avec 17,6 millions de personnes décédées en 2016. Parmi les maladies cardiovasculaires, l'infarctus du myocarde touche environ 80 000 personnes par an en France. L'infarctus du myocarde est la conséquence de l'obstruction d'une artère coronaire, conduisant à l'arrêt du flux sanguin en aval de l'obstruction. Cette pathologie ischémique active différents mécanismes inflammatoires au niveau local et systémique. Malgré les progrès majeurs dans le traitement et la prise en charge des patients, la mortalité liée à l'infarctus du myocarde demeure trop élevée. La gestion des complications secondaires à l'infarctus est donc un enjeu majeur de santé publique.

Afin d'améliorer et de personnaliser les traitements administrés aux patients, il persiste un besoin de compréhension des réponses inflammatoires post infarctus, passant par l'identification de marqueurs inflammatoires caractéristiques et la compréhension de mécanismes sous-jacents. L'identification de marqueurs inflammatoires prédictifs de la survenue de complications post infarctus permettrait une meilleure prise en charge des patients et un suivi à long terme accru afin de limiter ces complications. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires régulant la réponse inflammatoire permettra alors d'identifier de nouvelles cibles ou fenêtres thérapeutiques afin de moduler cette réponse. C'est dans cet objectif à très long terme que cette thèse prend place.

Les travaux de cette thèse s'appuient sur des modèles pré-cliniques d'infarctus du myocarde, avec un modèle cellulaire d'hypoxie-reoxygénation et un modèle murin d'ischémie-reperfusion. Une partie des travaux de thèse ont également été réalisés sur l'étude des marqueurs inflammatoires systémiques dans une cohorte de patients ayant subi un infarctus du myocarde.

Listes des publications

1. Publications acceptées

1. Multiparametric analysis by flow cytometry of mouse adult cardiomyocytes in suspension exposed to hypoxia-reoxygenation

Alexandre Paccalet*, Nolwenn Tessier*, Melanie Paillard, Lucille Païta, Ludovic Gomez, Noëlle Gallo-Bona, Christophe Chouabe, Christelle Léon, Sally Badawi, Zeina Harhous, Michel Ovize and Claire Crola Da Silva.

Am J Physiol Cell Physiol 2020 Feb 1;318(2):C439-C447. doi: 10.1152/ajpcell.00393.2019.

2. Myocardial Ischemia-Reperfusion and Diabetes: lessons learned from bedside to bench

Maya Dia*, **Alexandre Paccalet***, Bruno Pillot, Christelle Leon, Michel Ovize, Claire Crola Da Silva, Thomas Bochaton and Melanie Paillard

Front in Cardiovasc disease. 2021 March DOI: 10.3389/fcvm.2021.660698

3. A Dynamic Transcriptional Analysis Reveals IL-6 Axis as a Prominent Mediator of Surgical Acute Response in Non-ischemic Mouse Heart

Sally Badawi, **Alexandre Paccalet**, Zeina Harhous, Bruno Pillot, Lionel Augeul, Fabien Van Coppenolle, Joel Lachuer, Mazen Kurdi, Claire Crola Da Silva, Michel Ovize, Gabriel Bidaux

Front Physiol. 2019 Oct 31;10:1370. doi: 10.3389/fphys.2019.01370. eCollection 2019

4. Heat Shock Protein 70 as a Biomarker of Clinical Outcomes After STEMI

Thomas Bochaton, **Alexandre Paccalet**, Jeantet P, Crola Da Silva C, Cartier R, Prieur C, Jossan C, Bonnefoy-Cudraz E, Mewton N, Ovize M.

J Am Coll Cardiol. 2020 Jan 7;75(1):122-124. doi: 10.1016/j.jacc.2019.10.044.

5. Association of Interleukin-6 Levels and Futile Reperfusion After Mechanical Thrombectomy

Mechtouff L, Bochaton T, **Paccalet A**, Da Silva CC, Buisson M, Amaz C, Derex L, Ong E, Berthezene Y, Eker OF, Dufay N, Mewton N, Ovize M, Cho TH, Nighoghossian N.

Neurology. 2021 Feb 2;96(5):e752-e757. doi: 10.1212/WNL.0000000000011268.

6. Matrix Metalloproteinase-9 Relationship With Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation in the Era of Thrombectomy

Mechtouff L, Bochaton T, **Paccalet A**, Crola Da Silva C, Buisson M, Amaz C, Bouin M, Derex L, Ong E, Berthezene Y, Eker OF, Dufay N, Mewton N, Ovize M, Nighoghossian N, Cho TH.

Front Neurol. 2020 Jun 9;11:473. doi: 10.3389/fneur.2020.00473. eCollection 2020

7. Matrix Metalloproteinase-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Are Associated With Collateral Status in Acute Ischemic Stroke With Large Vessel Occlusion

Mechtouff L, Bochaton T, Paccalet A, Crola Da Silva C, Buisson M, Amaz C, Derex L, Ong E, Berthezene Y, Eker OF, Dufay N, Mewton N, Ovize M, Cho TH, Nighoghossian N.

Stroke. 2020 Jul;51(7):2232-2235. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.029395. Epub 2020 Jun 17.

8. Acute Induction of Translocon-Mediated Ca²⁺ Leak Protects Cardiomyocytes Against Ischemia/Reperfusion Injury

Al-Mawla R, Ducrozet M, Tessier N, Païta L, Pillot B, Gouriou Y, Villedieu C, Harhous Z, Paccalet A, Crola Da Silva C, Ovize M, Bidaux G, Ducreux S, Van Coppenolle F.

Cells. 2020 May 25;9(5):1319. doi: 10.3390/cells9051319.

9. Simultaneous assessment of microcalcifications and morphological criteria of vulnerability in carotid artery plaque using hybrid 18 F-NaF PET/MRI

Mechtouff L, Sigovan M, Douek P, Costes N, Le Bars D, Mansuy A, Haesebaert J, Bani-Sadr A, Tordo J, Feugier P, Millon A, Luong S, Si-Mohamed S, Collet-Benzaquen D, Canet-Soulas E, Bochaton T, Crola Da Silva C, Paccalet A, Magne D, Berthezene Y, Nighoghossian N

J Nucl Cardiol. 2020 Nov 3. doi: 10.1007/s12350-020-02400-0.

10. Large vessel cardioembolic stroke and embolic stroke of undetermined source share a common profile of matrix metalloproteinase-9 level and susceptibility vessel sign length

Alhazmi H, Bani-Sadr A, Bochaton T, Paccalet A, Crola Da Silva C, Buisson M, Amaz C, Ameli R, Berthezene Y, Eker OF, Ovize M, Cho TH, Nighoghossian N, Mechtouff L

Eur J Neurol. 2021 Mar 7. doi: 10.1111/ene.14806

11. Kinetics and prognostic value of soluble VCAM-1 in ST-segment elevation myocardial infarction patients

Hayek A, Paccalet A, Mechtouff L, Da Silva CC, Ivanes F, Falque H, Leboube S, Varillon Y, Amaz C, de Bourguignon C, Prieur C, Tomasevic D, Genot N, Derimay F, Bonnefoy-Cudraz E, Bidaux G, Mewton N, Ovize M, Bochaton T.

Immun Inflamm Dis. 2021 Feb 8. doi: 10.1002/iid3.409.

12. Association of myocardial hemorrhage and persistent microvascular obstruction with circulating inflammatory biomarkers in STEMI patients

Bochaton T, Lassus J, Paccalet A, Derimay F, Rioufol G, Prieur C, Bonnefoy-Cudraz E, Crola Da Silva C, Bernelin H, Amaz C, Espanet S, de Bourguignon C, Dufay N, Cartier R, Croisille P, Ovize M, Mewton N

PLoS One. 2021 Jan 28;16(1):e0245684. doi: 10.1371/journal.pone.0245684.

13. Soluble C-Met as a biomarker of clinical outcomes after STEMI

Simon Leboube, **Alexandre Paccalet**, Claire Crola Da Silva, Régine Cartier, Cyril Prieur, Ahmad Hayek, Charles De Bourguignon, François Derimay, Gilles Rioufol, Eric Bonnefoy-Cudraz, Michel Ovize, Nathan Mewton, Gabriel Bidaux and Thomas Bochaton

J Am Coll Cardiol. 2021 doi.org/10.1016/j.jacc.2021.03.015

14. A lower admission level of interleukin-6 is associated with first-pass effect in ischemic stroke patients

Laura Mechtouff, Thomas Bochaton, **Alexandre Paccalet**, Claire Crola Da Silva, Marielle Buisson, Camille Amaz, Laurent Derex, Elodie Ong, Yves Berthezene, Nathalie Dufay, Michel Ovize, Nathan Mewton, Tae-Hee Cho, Norbert Nighoghossian, Omer Faruk Eker.

Journal of NeuroInterventional Surgery. 2021 in press

2. Publications en cours de révision

1. Serum soluble Tumor Necrosis Factor Receptor (sTNFR) 1 and 2 are early prognosis markers after STEMI

Paccalet A, Crola Da Silva C, Mechtouff L, Amaz C, Varillon Y, De Bourguignon C, Cartier R, Prieur C, Tomasevic D, Genot N, Leboube S, Derimay F, Riouffol G, Bonnefoy-Cudraz E, Mewton N, Ovize M, Bidaux G, Bochaton T.

En révision dans Frontiers in Pharmacology

2. Leptin serum level is associated with clinical outcome after STEMI

Alexandre Paccalet, Claire Crola da Silva, Simon Leboube, Laura Mechtouff, Mélanie Paillard, Camille Amaz, Yvonne Varillon, Charles de Bourguignon, Regine Cartier, Cyril Prieur, Ahmad Hayek, François Derimay, Gilles Rioufol, Eric Bonnefoy-Cudraz, Nathan Mewton, Michel Ovize, Gabriel Bidaux, Thomas Bochaton.

En révision dans Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases.

3. Virtual histology with X-ray phase-contrast tomography enables myelin mapping of the whole brain

Matthieu Chourrout*, Hugo Rositi*, Elodie Ong, Violaine Hubert, **Alexandre Paccalet**, Awen Autret, Barbara Fayard, Cécile Olivier, Radu Bolbos, Françoise Peyrin, Claire Crola-da-Silva, Olivier Raineteau, Hélène Elleaume, Emmanuel Brun, Fabien Chauveau**, Marlène Wiart**

En révision dans Neuroimage.

4. Prognosis value of serum soluble ST2 level in acute ischemic stroke and STEMI patients in the era of mechanical reperfusion therapy

Laura Mechtouff, **Alexandre Paccalet**, Claire Crola Da Silva, Marielle Buisson, Nathan Mewton, Camille Amaz, Eric Bonnefoy-Cudraz, Tae-Hee Cho, Norbert Nighoghossian, Michel Ovize, Thomas Bochaton

En révision dans Stroke and Vascular Neurology.

3. Publications en préparation

1. Redox imaging of myoglobin reveals injured myocardium in cleared mouse hearts.

Sally Badawi*, **Alexandre Paccalet***, Yves Gouriou, Matthieu Chourout, Chris Berd, Bruno Pillot, Lionel Augeul, Emmanuelle Canet-Soulas, Radu Bolbos, Meryem Tardivel, Antonino Bongiovani, Clemence Leboullenger, Michel Ovize, Claire Crola Da Silva and Gabriel Bidaux.

2. Deciphering the crosslink between STAT3 and MAPKs in ischemia-reperfusion and ischemic postconditioning.

Zeina Harhous*, **Alexandre Paccalet***, Sally Badawi, Bruno Pillot, Lionel Augeul, Fabrice Gonnot, Delphine Baetz, Michel Ovize, Claire Crola Da Silva, Mazen Kurdi and Gabriel Bidaux.

3. Decreased mitochondrial deacetylase activity with age, independently of SIRT3 compromises the beneficial effect of heart ischemic post-conditioning in mice

Villedieu C, Pillot B, Harisseh R, Augeul L, Gallo-Bona N, Harhous Z, Al-Mawla R, Bochaton T, **Paccalet A**, Gharib A, Ovize M, Bidaux G and Baetz D

4. Acute anti-inflammatory macrophages recruitment by cardiac cells in a model of myocardial infarction

Alexandre Paccalet, Sally Badawi, Zeina Harhous, Bruno Pillot, Lionel Augeul, Christelle Leon, Delphine Baetz, Camille Amaz, Charles De Bourguignon, Eric Bonnefoy-Cudraz, Nathan Mewton, Michel Ovize, Gabriel Bidaux, Thomas Bochaton* and Claire Crola Da Silva*

Listes des figures

<i>Figure 1 : Développement du thrombus</i>	25
<i>Figure 2 : Classification des infarctus</i>	28
<i>Figure 3 : Différentes zones du cœur durant l'ischémie</i>	30
<i>Figure 4 : L'angioplastie</i>	31
<i>Figure 5 : Différentes stratégies de conditionnement</i>	36
<i>Figure 6 : Les voies de signalisation de la cardioprotection</i>	38
<i>Figure 7 : Mécanismes d'adhésion cellulaire et de diapédèse des leucocytes</i>	45
<i>Figure 8 : Différentes vagues de recrutement de cellules immunitaire observées dans le cœur après un infarctus.</i>	51
<i>Figure 9 : Axes de travail de la thèse</i>	64
<i>Figure 10 : Protocole in vitro d'hypoxie-réoxygénation (HR)</i>	68
<i>Figure 11 : Protocole de recrutement de macrophages in vitro</i>	69
<i>Figure 12 : Quantification des macrophages recrutés par les cardiomyocytes</i>	70
<i>Figure 13 : Activation des macrophages par le milieu conditionné des cardiomyocytes</i>	71
<i>Figure 14 : Protocole de traitement des cellules avec STATTC et les anticorps neutralisants anti-MCP-1 et anti-IL-6</i>	73
<i>Figure 15 : Protocole d'ischémie-reperfusion in vivo chez la souris</i>	75
<i>Figure 16 : Protocole de transparenisation d'organe utilisant la technique de X-Clarity</i>	78
<i>Figure 17 : Protocole d'immunomarquage sur cœur entier après transparenisation</i>	79
<i>Figure 18 : Microscopie Confocale et à feuillet de lumière</i>	81
<i>Figure 19 : Cinétique de libération d'IL-6 et de MCP-1 chez les patients STEMI</i>	87
<i>Figure 20 : Survenue d'événements cardiaques majeurs en fonction des taux circulants d'IL-6 et de MCP-1 à H24</i>	89
<i>Figure 21 : Cinétique de libération d'IL-6 et de MCP-1 en fonction de la survenue d'événements cardiaques majeurs</i>	91
<i>Figure 22 : Cinétique de libération d'IL-6 et de MCP-1 dans un modèle murin d'infarctus du myocarde</i>	93
<i>Figure 23 : Niveau d'expression de l'ARN messager d'IL-6 et de MCP-1 dans le cœur infarci</i>	94
<i>Figure 24 : Sécrétions cytokiniques par les cardiomyocytes après HR</i>	96
<i>Figure 25 : Représentation des interactions protéines-protéines des cytokines sécrétées par les CMA après HR et principales voies de signalisation régulées par l'ensemble des cytokines sécrétées</i>	98
<i>Figure 26 : Dosage d'IL-6 et de MCP-1 dans le milieu conditionné des cardiomyocytes</i>	99
<i>Figure 27 : Recrutement de macrophages par les cardiomyocytes in vitro</i>	101
<i>Figure 28 : Recrutement de macrophages pro- vs anti-inflammatoires par les cardiomyocytes in vitro</i>	102
<i>Figure 29 : Infiltration in vivo de macrophages anti-inflammatoires dans le cœur infarci évaluée par microscopie à feuillets de lumière</i>	104
<i>Figure 30 : Quantification in vivo du nombre de macrophages anti-inflammatoires infiltrés</i>	105
<i>Figure 31 : Recrutement de macrophages pro- vs anti-inflammatoires par les cardiomyocytes in vitro après ajout d'anticorps neutralisants</i>	107
<i>Figure 32 : Recrutement de macrophages pro- vs anti-inflammatoires induit par les cardiomyocytes in vitro après ajout de STATTC</i>	109
<i>Figure 33 : Phénotypage des macrophages après stimulation avec le milieu conditionné de cardiomyocytes</i>	110
<i>Figure 34 : Détermination du phénotype des macrophages après stimulation par le milieu conditionné de CMA avec ajout d'anticorps neutralisants anti-IL-6 ou anti-MCP-1 ou de l'inhibiteur STATTC</i>	111
<i>Figure 35 : Mesure de l'effet de l'inhibition pharmacologique de STAT3 sur la taille d'infarctus</i>	114
<i>Figure 36 : Schéma bilan des résultats de thèse</i>	116

Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Tableau des différents anticorps utilisés pour le phénotypage des macrophages après incubation avec le milieu conditionné des cardiomyocytes.</i>	<i>72</i>
<i>Tableau 2 : Tableau des différents anticorps utilisés lors du protocole d'immuno-marquage sur cœur entier</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 3 : Tableau listant les Kit ELISA souris utilisés.</i>	<i>82</i>
<i>Tableau 4 : Tableau listant les kit ELISA humain utilisés pour évaluer les cinétiques de libération dans la cohorte HIBISCUS.</i>	<i>83</i>
<i>Tableau 5 : Caractéristiques générales des patients de la cohorte HIBISCUS STEMI</i>	<i>86</i>

Listes des abréviations

0H	Avant l'ischémie
1H	Une heure de reperfusion
24H	Vingt-quatre heures de reperfusion
3DISCO	3D Imaging of Solvant Cleared Organ
3H	Trois heures de reperfusion
6H	Six heures de reperfusion
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BABB	Benzyl Alcool/Benzyl Benzoate
BMDM	Macrophages dérivés de la moelle osseuse (Bone Marrow Derived Macrophages)
C-met	Récepteur Met
CD	Cluster de Différenciation
CIC	Centre d'Investigation Clinique
CLARITY	Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/in situ-hybridization compatible Tissue hYdrogel
CMA	CardioMyocytes Adultes
CRP	C Reactive Protein
CUBIC	Clear Unobstructed Brain Imaging Cocktails and computational analysis
DAMPS	Damage Associated Molecular PatternS
DBE	DiBenzyl Ether
ECG	ElectroCardioGramme
FPKM	Fragment Par kilo base d'exons par million de fragment lu
GM CSF	Granulocyte Macrophages Colony Stimulating Factor
GSK3β	Glycogène Synthase Kinase
H0	Admission
H24	24h après l'admission
H4	4 h après l'admission

H48	48 h après l'admission
HGF	Hépatocyte Growth Factor
HIBISCUS STEMI	CoHorte de patients pour Identifier les marqueurs Biologiques et d'Imagerie des événements Cardiovasculaires chez les patients présentant un infarctus du myocarde avec élévation du segment ST
HMGB1	High Mobility Group Box 1
HR	Hypoxie-Réoxygénation
HSP70	Heat Shock Protein 70
IDM	Infarctus Du Myocarde
IL-	InterLeukine -
IQR	InterQuartile Range
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
JAK	Janus Kinase
LDL	Lipoprotéine de faible Densité
LPS	Lipopolysaccharide S
M1	Un mois après l'admission
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MCSF	Macrophages Colony Stimulating Factor
MGL	Macrophages Galactose C-type Lectin Receptor
MMP-9	Matrix MetalloProteinase 9
NET	Neutrophiles Extracellular Trap
NK	Natural Killer
NSTEMI	Infarctus du myocarde sans élévation du fragment ST
PAMPS	Pattern Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffer Saline
PFA	ParaFormAldéhyde
PRR	Pattern Recognition Receptors
RIP	Receptor Interaction Protein
RISK	Reperfusion Injury Salvage Kinase
SAFE	Survivor Activating Factor Enhancement
SB	Stopping Buffer

SEM	Écart Standard à la Moyenne
SHAM	Contrôle chirurgie
STAT3	Signal Transducteur and Activator of Transcription 3
STEMI	Infarctus du myocarde avec élévation du fragment ST
TLR	Toll Like Receptor
TNF-	Tumor Necrosis Factor
TTC	Chlorure de Triphényltétrazolium
VCAM-1	VasCular endothelial Adhesion Molecule 1

Introduction

1. L'infarctus du myocarde

Malgré les progrès croissants dans la prévention et le traitement des pathologies cardiovasculaires, celles-ci demeurent la cause principale de morbidité/mortalité mondiale.^{1,2} La sédentarité, l'alimentation et le vieillissement de la population contribuent d'une manière générale au maintien de la forte influence de ces maladies sur le monde actuel. Les maladies cardiovasculaires sont divisées en plusieurs classes, telles que les accidents vasculaires cérébraux, les artériopathies périphériques, ou encore les cardiopathies coronariennes. Ces cardiopathies coronariennes sont décrites comme des pathologies impliquant les vaisseaux alimentant le muscle cardiaque, et parmi celles-ci nous pouvons identifier l'infarctus du myocarde.

L'infarctus du myocarde (IDM) correspond à la mort cellulaire d'une partie du tissu cardiaque en aval de l'obstruction d'une artère coronaire. Il peut se développer, au sein de ces artères coronaires, un phénomène d'athérosclérose. L'athérosclérose est une réaction inflammatoire chronique, évolutive et dynamique conduisant à la formation de plaques d'athéromes qui, à long terme, peuvent entraîner l'obstruction de l'artère (**Figure 1**).

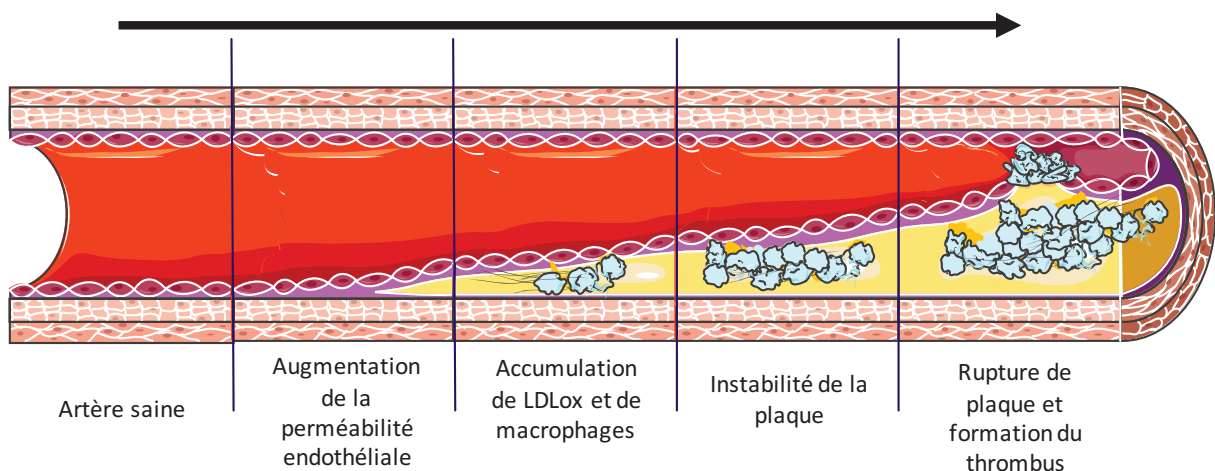


Figure 1 : Développement du thrombus : Différentes étapes du développement de la plaque d'athérosclérose et de la formation du thrombus.

Au cours de la phase initiale, les conditions hémodynamiques induisent une modification des cellules endothéliales conduisant à l'augmentation de la perméabilité endothéliale³. Suite à cette augmentation, les lipoprotéines de faible densité (LDL) s'accumulent contre la paroi interne de l'endothélium de l'artère touchée. Ces LDL vont s'oxyder et de nouveau favoriser la dysfonction endothéliale en activant le recrutement et l'adhésion de cellules immunitaires, principalement des monocytes. Une fois infiltrés, les monocytes se différencient en macrophages et éliminent les LDL oxydés par phagocytose. Une trop grande accumulation de lipides sous membranaires entraîne une saturation des macrophages qui ne parviennent plus à éliminer efficacement ces lipides. Les macrophages se transforment alors en cellules spumeuses et constituent la strie lipidique, premier stade de l'athérosclérose. Un foyer inflammatoire et lipidique va alors se former sous la paroi endothéliale. La mort de ces cellules spumeuses va entraîner la formation de corps apoptotiques et de gouttelettes lipidiques, entraînant un recrutement *de novo* de cellules immunitaires et l'entretien de la plaque³. En plus de l'accumulation de lipides et de cellules immunitaires, les cellules musculaires lisses de la paroi du vaisseau vont se multiplier et produire une grande quantité de matrice extracellulaire afin de former une chape fibreuse autour du corps athéroscléreux. Deux types de plaques se distinguent alors, les plaques avec une chape fibreuse épaisse et un amas lipidique faible seront décrites comme plaques stables, et les plaques avec une chape fibreuse fine mais une forte accumulation lipidique seront décrites comme plaques instables⁴. Les différents mécanismes physiques (force de cisaillement), inflammatoires, cellulaires, peuvent entraîner des ruptures de plaques dans les plaques instables. Cette rupture de la chape fibreuse va entraîner la mise en contact de facteurs thrombogènes du centre lipidique avec le sang et les facteurs coagulants⁵. Un thrombus va alors se former et obstruer le vaisseau conduisant à un arrêt de l'apport sanguin dans le tissu en aval, entraînant l'infarctus du myocarde⁶.

1.1. Épidémiologie et Physiopathologie de l'infarctus du myocarde

En 2019, les maladies cardiovasculaires restent l'une des principales causes de mortalité mondiale. L'incidence des maladies cardiovasculaires en Europe est estimée à 1 115 cas pour 100 000 habitants. L'incidence de l'infarctus du myocarde est, elle, fortement disparate en fonction des pays, mais est en moyenne de 178 cas/ 100 000 chez les hommes et 83 cas pour les femmes en Europe⁷.

Après occlusion de l'artère coronaire par le thrombus, une diminution ou un arrêt du flux sanguin en aval sont observés. Deux catégories de patients sont alors discriminées rapidement selon les données de l'électrocardiogramme afin d'orienter au plus vite vers les stratégies thérapeutiques adaptées (**Figure 2**).

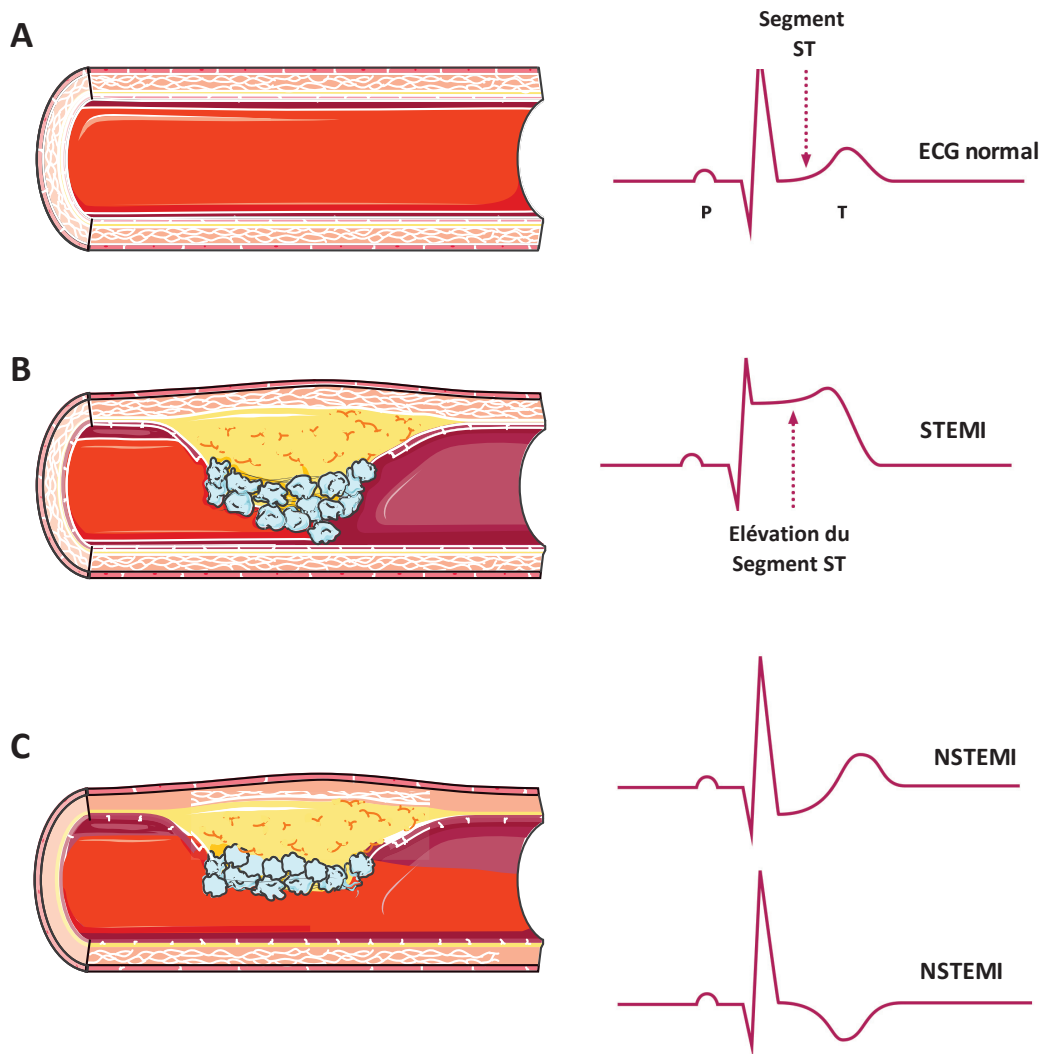


Figure 2 : Classification des infarctus : Représentation schématique de l'occlusion artérielle et sa caractérisation grâce à l'électrocardiogramme. Profils caractéristiques des artères saines (A), de l'infarctus du myocarde avec élévation du segment ST (B) et de l'infarctus du myocarde sans élévation du segment ST (C).

Les patients présentant un syndrome coronarien aigu avec sus-décalage du segment ST (STEMI : ST Elevation Myocardial Infarction) (**Figure 2B**), par rapport à l'ECG normal (**Figure 2A**), sont les patients les plus à risques. Le décalage du segment ST est signe d'une occlusion complète de l'artère coronaire (**Figure 2B**). Le patient STEMI nécessite donc une prise en charge urgente puisque le tissu en aval de l'obstruction n'est plus irrigué et la nécrose tissulaire débute⁸.

Les patients dont le flux coronaire n'est pas totalement aboli présentent un syndrome coronarien aigu sans sus-décalage du segment ST⁹ (**Figure 2C**) appelé également NSTEMI. Nous traiterons au cours de cette thèse uniquement de patients STEMI.

1.2. Prise en charge du patient STEMI

Entre la survenue de l'ischémie et la reperfusion, le patient subit différents traitements visant à la fois à réduire le temps d'ischémie, et à améliorer les fonctions cardiaques à la reperfusion. Dans un premier temps pris en charge par le SAMU, le patient subit un électrocardiogramme (ECG) afin de confirmer l'infarctus, puis un traitement anticoagulant est administré durant le transport vers une unité de cardiologie interventionnelle. Le traitement anticoagulant fait très majoritairement appel à l'utilisation de deux différents types d'héparine : l'héparine non fractionnée et l'héparine de bas poids moléculaire. A l'admission à l'hôpital, un nouveau traitement anticoagulant est administré au patient ainsi qu'un traitement antiagrégant plaquettaire double avec l'administration d'inhibiteur de la cyclo-oxygénase 1 (tel que l'Aspirine) et d'un inhibiteur des récepteurs P2Y12 (tels que le Prasugrel ou le Clopidogrel ou encore Ticagrelor). Le patient est ensuite transféré en salle de coronarographie diagnostique et interventionnelle. C'est à ce moment que la reperfusion est réalisée. Plus ce délai entre les premiers symptômes et la reperfusion est réduit, plus la survie des patients est augmentée et les fonctions cardiaques préservées. La reperfusion est réalisée selon deux techniques, soit pharmacologique avec la thrombolyse, soit interventionnelle avec une coronarographie suivie d'une angioplastie. Le choix entre les techniques est basé sur un critère de délai avant l'angioplastie. Si le premier contact médical est intervenu moins de 120 minutes avant l'angioplastie, alors celle-ci est réalisée. Dans le cas contraire, la fibrinolyse est préférée⁸.

Malgré une nette amélioration de la prise en charge du patient et une forte diminution de ce temps de reperfusion ces dix dernières années, la mortalité et la morbidité restent élevées. Une meilleure compréhension de la pathologie de la maladie est donc nécessaire pour à la fois diminuer la survenue de l'infarctus, et améliorer les traitements et la survie des patients. Cette compréhension est importante à différents degrés : du niveau cellulaire jusqu'au niveau de l'organisme entier.

2. Pathologie de l'ischémie-reperfusion

2.1. L'ischémie

Lorsque le vaisseau est obstrué par un thrombus, l'afflux sanguin dans le tissu en aval est fortement diminué voire aboli. Cette diminution est appelée ischémie et résulte d'un déséquilibre entre l'apport et la consommation d'oxygène et de nutriments, nécessaires au bon fonctionnement cellulaire. Ce phénomène d'ischémie entraîne une souffrance tissulaire qui peut conduire à de la mort cellulaire, définie à l'origine comme de la nécrose cellulaire.

Durant cette ischémie, nous pouvons identifier dans le cœur trois zones :

- la zone en amont de l'obstruction coronaire qui ne subit pas l'ischémie appelée zone saine.
- la zone qui n'est pas perfusée, en aval de l'obstruction, également appelée zone à risque.
- la zone de mort cellulaire, à l'origine appelée zone de nécrose, représentant la zone où les cellules cardiaques meurent à la suite de la privation d'oxygène et de nutriments. Cette zone se trouve dans le périmètre de la zone à risque (**Figure 3**).

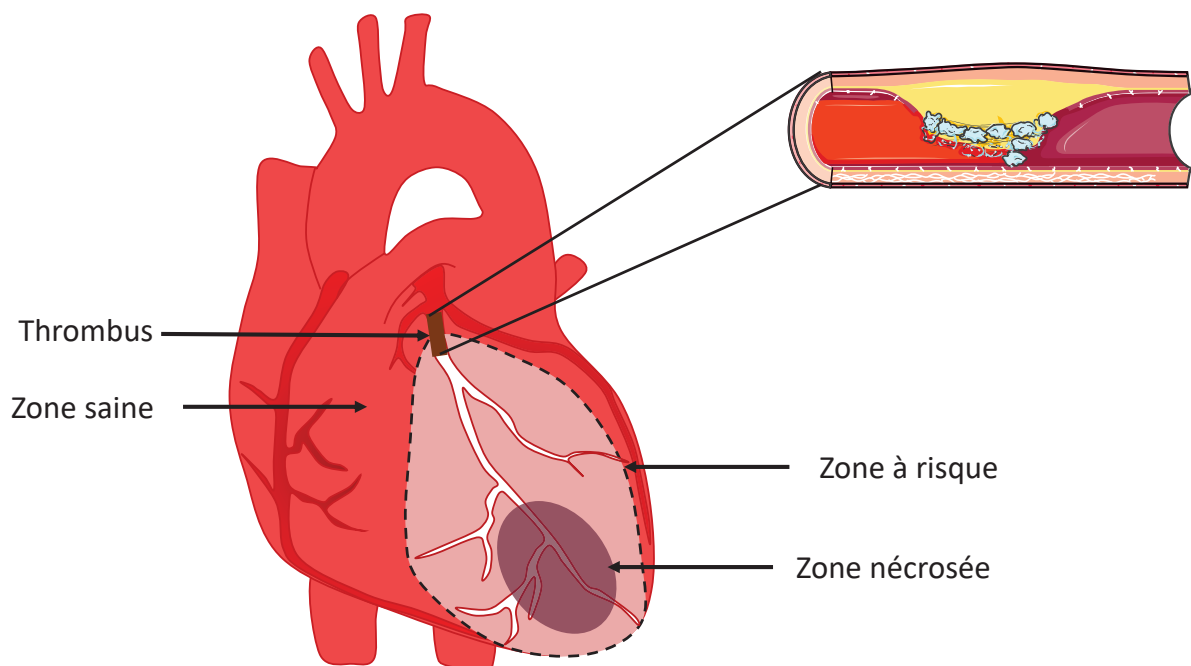


Figure 3 : Différentes zones du cœur durant l'ischémie : représentation schématique de la délimitation de la zone à risque (en pointillé), qui est le tissu en aval du thrombus, et de la zone saine (en rouge). La zone nécrosée se trouve au sein de la zone à risque.

2.2. La Reperfusion

L'unique traitement à l'ischémie est la reperfusion qui consiste à rétablir le flux sanguin par une des techniques présentées précédemment telle que l'angioplastie (**Figure 4**).

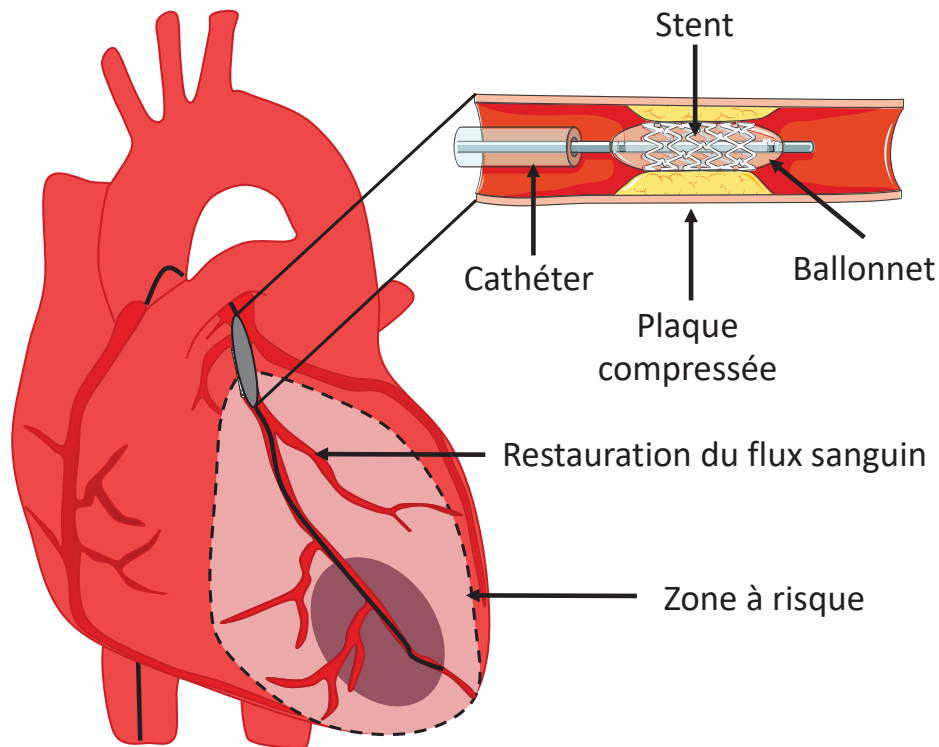


Figure 4 : L'angioplastie : représentation schématique de la stratégie de reperfusion par angioplastie, c'est-à-dire de la restauration du flux sanguin grâce à une intervention mécanique avec un ballonnet et la pose de Stent pour maintenir l'artère ouverte.

Durant la séquence d'ischémie, le phénomène de mort cellulaire s'installe ce qui implique que la reperfusion doit être réalisée le plus rapidement possible¹⁰. Paradoxalement, bien que salvatrice, la reperfusion induit elle aussi de la mort cellulaire que l'on appelle lésions de reperfusion¹¹.

Après la reperfusion, nous pouvons déterminer la zone finale de tissu mort (appelée communément zone nécrosée) et la zone de l'aire à risque qui a survécu à la séquence d'ischémie-reperfusion. Le rapport de ces deux zones permet de définir la taille d'infarctus.

Les lésions de reperfusion se présentent sous différentes formes telles que les arythmies de reperfusion¹², la sidération myocardique, les dommages vasculaires impliquant un flux coronaire ralenti malgré la reperfusion (no-reflow) et la mort cellulaire impliquée par ce

phénomène¹³. L'apport massif de sang entraîne plusieurs paradoxes tels que le paradoxe de l'oxygène, du PH, du calcium ou encore l'influx massif de cellules inflammatoires dans le cœur qui sont en partie responsables de ces lésions de reperfusion¹⁴¹⁵.

2.3. Mise en place de la mort cellulaire durant la séquence d'ischémie-reperfusion

La séquence d'ischémie-reperfusion active différentes voies de mort cellulaire telles que la nécrose, l'apoptose et l'autophagie. Ces voies de mort cellulaire sont les principales mises en jeu dans ce contexte et contribuent en synergie à la pathologie de l'ischémie-reperfusion¹⁶.

La nécrose : La nécrose est considérée comme la principale cause de mort des cardiomyocytes en réponse à cette ischémie-reperfusion. Elle est également décrite comme une mort cellulaire incontrôlée et accidentelle en réponse à un stress. Elle est caractérisée par une dysfonction mitochondriale, un gonflement cellulaire mais une absence de fragmentation du noyau. Durant la séquence d'ischémie-reperfusion, le ralentissement du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale entraîne une chute de la concentration en adénosine tri phosphate (ATP) dans la cellule. Cette diminution d'ATP est accompagnée d'un dérèglement de l'homéostasie ionique, donc du potentiel de membrane induisant, entre autres, la perte d'intégrité de la membrane plasmique et donc la mort cellulaire¹⁷. La mort cellulaire durant la séquence d'ischémie-reperfusion a longtemps été considérée comme uniquement nécrotique. Depuis, de nombreuses études ont montré que d'autres voies de mort cellulaire participent à la pathologie d'ischémie-reperfusion¹⁸.

L'apoptose : la mort cellulaire par apoptose est une mort génétiquement programmée afin de garantir l'homéostasie tissulaire. D'un point de vue morphologique, l'apoptose est caractérisée par un arrondissement de la cellule, une fragmentation de l'ADN et la formation de corps apoptotiques mais avec une conservation de l'intégrité de la membrane plasmique. Les mécanismes moléculaires de l'apoptose sont classiquement divisés en deux voies : extrinsèque et intrinsèque.

- La voie extrinsèque, communément appelée « voie des récepteurs de mort » est une voie médiée par la fixation des ligands (TNF- α , FasL) sur des récepteurs membranaires de mort tels que Fas, TRAIL ou les récepteurs au TNF- α . L'activation de ces récepteurs induit leur trimérisation et le recrutement de protéines adaptatrices contenant des domaines de morts. Cette cascade de signalisation entraîne l'activation de la caspase 8, dite caspase initiatrice, qui va cliver et activer les caspases effectrices 3 et 7. Cette activation des caspases entraîne elle aussi l'activation de nouvelles caspases, induisant *in fine* une protéolyse intracellulaire conduisant à la mort de la cellule.
- La voie intrinsèque correspond à la voie mitochondriale. La perméabilisation mitochondriale en réponse au stress de la séquence d'ischémie-reperfusion conduit à la libération de facteurs pro-apoptotiques (protéines de la famille BCL-2, le cytochrome C, et un répresseur d'inhibiteur de caspases : Smac/DIABLO). Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome C se lie à la protéine Apaf1 et à la pro-caspase 9 pour former un complexe appelé apoptosome. La formation de ce complexe va induire l'activation des caspases effectrices 3 et 7. La protéine Smac/DIABLO, quant à elle, se lie aux protéines inhibitrices de l'apoptose et les inhibe¹⁹.

La nécroptose : Contrairement à ce qui a été décrit pendant de longues années, l'apoptose et la nécrose ne sont pas indépendantes²⁰. En effet, la nécrose peut être induite par des facteurs de l'apoptose. Cette mort cellulaire est appelée nécroptose. La nécroptose peut également être induite par la fixation de ligands des récepteurs aux TNF α ou Fas. L'activité des protéines RIP1 et RIP3 (Receptor Interaction Protein) est un élément central de cette voie de signalisation. L'activation de ces deux protéines va entraîner une multitude de dérèglements cellulaires, tels qu'un dérèglement de l'homéostasie calcique, la formation de radicaux libres de l'oxygène, une souffrance mitochondriale, semblables à la mort par nécrose²¹.

L'autophagie : L'autophagie est un phénomène physiologique utilisé par la cellule afin de dégrader les organites dans le lysosome. Ce processus est induit par des conditions de stress comme le manque de nutriments. Ce mécanisme permet à la cellule de recycler les

acides aminés ou les acides gras afin de réduire sa consommation énergétique²². Ce processus de protection de la cellule peut être délétère si le stress est prolongé comme lors d'une ischémie trop longue. Et l'autophagie peut conduire dans certain cas à l'élimination d'organites essentiels à la survie tels que la mitochondrie (mitophagie) et entraîner la mort cellulaire²³.

2.4. Les modèles d'ischémie-reperfusion

Dans le but de se rapprocher au plus près de la pathologie de l'infarctus du myocarde, différents modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* ont été développés²⁴.

Concernant les modèles *in vitro*, trois grandes catégories se distinguent.

- L'utilisation de lignées cellulaires telles que les cardiomyocytes atriaux de souris HL-1, les cardiomyoblastes de rats H9c2, ou encore la lignée cellulaire de cardiomyocytes humains AC16 permet une utilisation rapide, reproductible et simple de réalisation. Cependant les caractéristiques de ces cellules ne rejoignent pas complètement les caractéristiques morphologiques et métaboliques des cellules ventriculaires souffrant durant l'ischémie-reperfusion.

- L'utilisation de cardiomyocytes adultes primaires (CMA) permet de se rapprocher de cette physiologie mais rend la réalisation des expériences plus compliquée. Les CMA adultes primaires conservent des fonctions contractiles et une activité électrophysiologique, cependant leur utilisation reste limitée dans le temps et empêche l'utilisation de certaines techniques usuelles de transfection. En effet, ils peuvent être conservés quelques jours en culture selon l'espèce dont ils sont issus, mais ne se divisent pas et se différencient après 24 heures. Ces caractéristiques font qu'une utilisation dans la journée d'isolation est préférable^{25,26}. Cette limite technique ne permet donc pas l'utilisation de toutes les méthodologies actuelles. La limitation principale de ces cultures cellulaires résulte dans le fait que ces cellules sont cultivées en deux dimensions, dans des conditions environnementales ne représentant pas précisément les conditions physiologiques. Les contacts directs avec tous les autres types cellulaires, les contacts paracrines, les contraintes mécaniques ne sont alors pas prises en compte. Une des solutions techniques est la co-culture, en insert pour les

communications paracrines, ou directe pour les contacts cellulaires. Cette technique permet de cultiver les CMA sous l'influence des autres types cellulaires.

- L'utilisation de tranches fines de tissu cardiaque (tranches organotypiques) peut également être un intermédiaire entre la culture cellulaire et les méthodes d'étude sur organe entier. Cependant ce modèle, bien que plus proche de la complexité physiologique, est plus coûteux. Il ne permet pas non plus de discriminer les réponses spécifiques des différents types cellulaires²⁷.

D'autres modèles d'études sont alors envisageables avec les modèles *ex vivo*. La méthode de perfusion rétrograde d'un cœur isolé *ex vivo* a été développée par Oskar Langendorff en 1895²⁸. Cette technique permet les mesures de la taille d'infarctus en réponse à une ischémie-reperfusion, l'évaluation des fonctions cardiaques, l'étude des sécrétions de vésicules extracellulaires... Cependant, cette technique pratiquée sur un organe *ex vivo* implique des contraintes de manipulation, de maintien de l'activité cardiaque, de maintien de la température et ne tient pas compte de la réponse systémique de l'organisme.

Enfin, les modèles *in vivo* se rapprochent plus de la physiologie retrouvée lors de la séquence d'ischémie-reperfusion. Cependant, qu'ils soient des modèles d'ischémie transitoire ou permanente, il faut tenir compte du fait que ce sont des modèles qui miment les réponses. Les animaux sont anesthésiés et opérés afin de réaliser la procédure, ce qui influe fortement sur différents facteurs mesurés par la suite²⁹. Par ailleurs, l'ischémie est réalisée par ligature ou clampage de l'artère et non par obstruction de celle-ci par un thrombus.

Différents modèles pré-cliniques sont donc disponibles pour étudier la pathologie de l'infarctus du myocarde et il convient de combiner ces différentes approches dans nos études pour avancer dans la connaissance de la pathologie³⁰. Au cours de cette thèse, les modèles de cellules primaires isolées et d'ischémie-reperfusion *in vivo* chez la souris seront utilisés.

2.5. Les stratégies de cardioprotection

Se regroupent sous le terme de « cardioprotection » toutes les stratégies et mécanismes visant à la préservation de la fonction cardiaque, notamment par la réduction et la prévention

des lésions du myocarde³¹. Comme expliqué précédemment, la pathologie de l'ischémie-reperfusion induit la mort cellulaire des cellules cardiaques, principalement les cardiomyocytes. Le but des stratégies de cardioprotection est donc de réduire cette mortalité cellulaire par différentes approches cardioprotectrices. Depuis 1937 et l'étude de Gross *et al.*³², qui visait à réduire la taille d'infarctus, de nombreuses études ont été menées avec cet objectif. La reperfusion par angioplastie est sans doute la stratégie de cardioprotection la plus efficace à ce jour et son utilisation en pratique courante a entraîné une forte diminution de la mortalité et des complications secondaires telles que récurrence d'infarctus ou AVC chez les patients STEMI³³ (8% des patients pour les stratégies d'angioplastie contre 14% pour les stratégies de thrombolyse intraveineuse). Malheureusement, un trop grand nombre de patients souffrent encore de complication post-infarctus. L'objectif de la cardioprotection est de réduire la mortalité post infarctus et d'améliorer la qualité de vie du patient. Les stratégies de cardioprotection sont communément appelées « conditionnements ». Il en existe différents types représentés dans la **figure 5**.

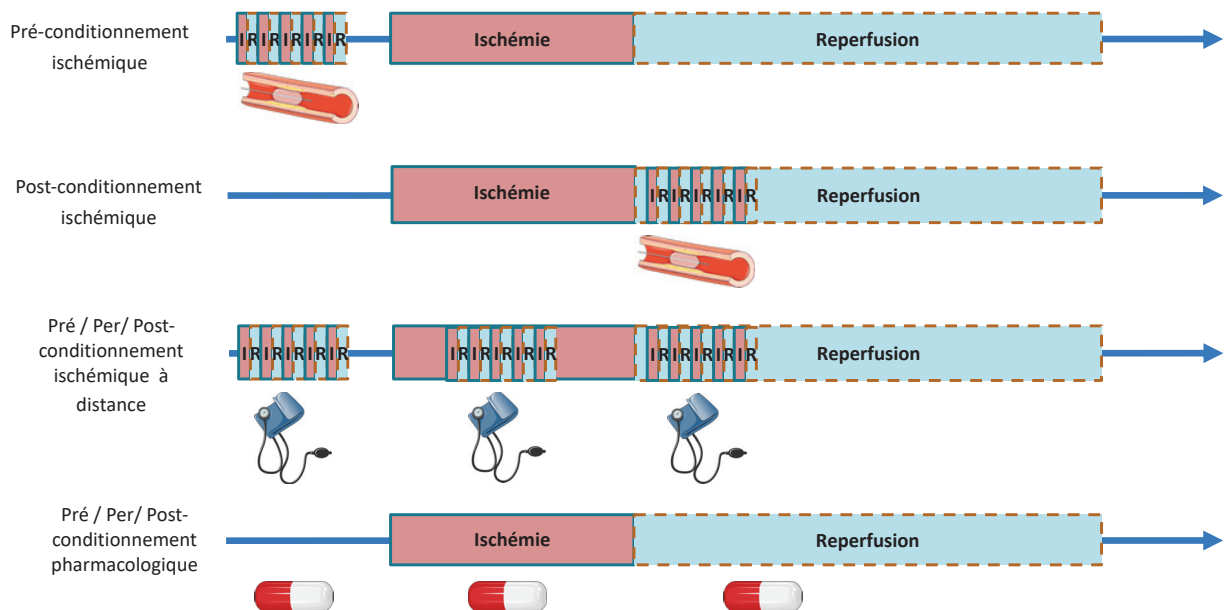


Figure 5 : Différentes stratégies de conditionnement: Représentation schématique du préconditionnement-ischémique, du post-conditionnement ischémique, des conditionnements ischémiques à distance et des conditionnements pharmacologiques.

a) Conditionnements ischémiques

Plusieurs types de conditionnements ischémiques ont tout d'abord été décrits en fonction du moment où ils sont appliqués lors de la séquence d'ischémie-reperfusion (**Figure 5**). Ces stratégies consistent à des séquences d'occlusion/reperfusion de l'artère coronaire réalisées avant l'ischémie (pré-conditionnement) ou après l'ischémie (post-conditionnement). Chez le patient, dans le cadre de l'infarctus du myocarde, seul le post-conditionnement est envisageable au moment de la prise en charge du patient et de l'angioplastie. Ces stratégies de conditionnement peuvent également être réalisées à distance sur une artère d'un organe périphérique (conditionnement à distance)^{34,35}.

Le pré-conditionnement ischémique s'est montré efficace dans la diminution de la taille d'infarctus sur différents modèles animaux d'ischémie-reperfusion³⁶⁻⁴⁰ et dans certains essais cliniques^{41,42}. Par ailleurs, le pré-conditionnement ischémique fonctionne également sur les lésions ischémiques d'autres organes^{43,44}.

Le post-conditionnement ischémique permet également une diminution de la taille d'infarctus dans différents modèles pré-cliniques d'infarctus du myocarde⁴⁵⁻⁴⁹ et chez le patient STEMI⁵⁰. En revanche, les études cliniques portant sur le post-conditionnement ischémique à distance n'ont pas confirmé les résultats très prometteurs observés dans les modèles pré-cliniques^{51,52}.

Deux principales voies de signalisation intracellulaires sont activées en réponse aux différents conditionnements. Ces deux voies désormais bien décrites sont les voies RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinase) et SAFE (Survivor Activating Factor Enhancement) (**Figure 6**).

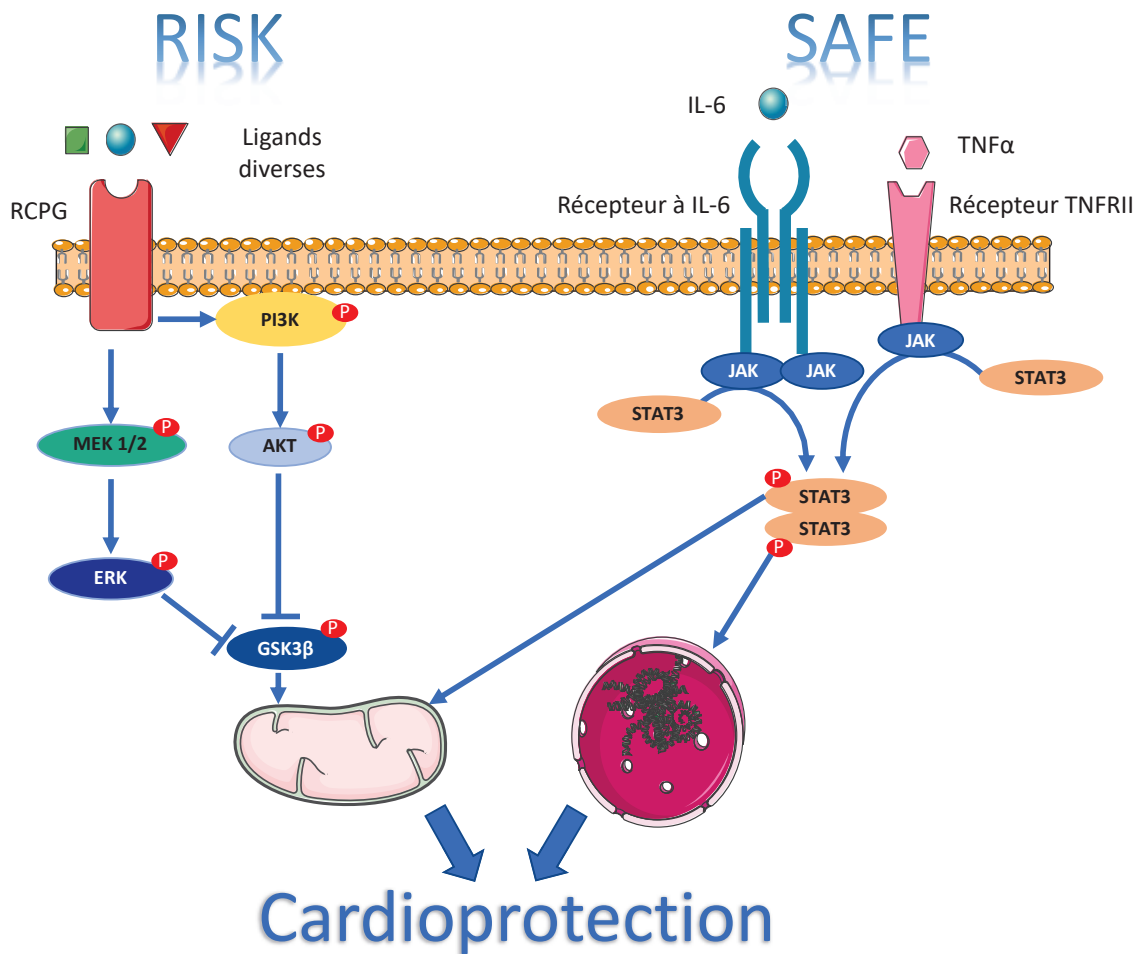


Figure 6 : Les voies de signalisation de la cardioprotection : Représentation schématiques des différents acteurs moléculaires intervenant dans les voies RISK et SAFE, impliquées dans les mécanismes de cardioprotection.

La **voie RISK** : La voie RISK a été la première décrite par l'équipe de Yellon *et al.*⁵³⁻⁵⁸. La voie RiSK se compose d'une cascade de signalisation médiée par la voie PI3K-AKT. Une autre voie anti-apoptotique est également activée par la voie RISK avec l'activation de la voie MEK/ERK. Ces deux voies de phosphorylation ont pour effecteur final une protéine kinase : la Glycogène Synthase Kinase (GSK3β)⁵⁹. L'activation de cette voie va, entre autres, conduire à protéger la mitochondrie d'une surcharge calcique et à inhiber les facteurs pro-apoptotiques.

La **voie SAFE** : La voie SAFE a été quant à elle décrite pour la première fois dans le modèle de pré-conditionnement par l'équipe de Lecour *et al.*⁶⁰ puis a été étudiée dans plusieurs espèces animales^{61,62}. Cette voie de signalisation met en jeu la fixation du TNF-α à son récepteur TNFRII. La fixation au récepteur entraîne la phosphorylation de Janus kinase (JAK) puis du facteur de transcription STAT3 (Signal Transduceur and Activator of Transcription

3). La protéine STAT3 est alors transloquée dans le noyau et active l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que les membres de la famille BCL₂⁶³ ou des facteurs antioxydants⁶⁴. Il réduit également l'expression de facteurs pro apoptotiques⁶⁵. L'effet de STAT3 n'est pas uniquement nucléaire, cette protéine joue également un rôle sur la respiration mitochondriale, la régulation de l'homéostasie calcique, le métabolisme et sur la réponse inflammatoire⁶⁶. Par ailleurs, la voie SAFE peut également être activée par la cytokine IL-6 entraînant suite à la fixation sur son récepteur la même cascade de phosphorylation⁶⁷.

L'analyse des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans les stratégies de conditionnement a donné lieu au développement des conditionnements pharmacologiques qui peuvent être également appliqués en pré, en per ou en post-conditionnement.

b) Conditionnements pharmacologiques

Un très grand nombre de molécules pharmacologiques appliquées en pré-conditionnement ou post-conditionnement ont montré des effets bénéfiques sur la protection cardiaque dans des modèles animaux d'infarctus du myocarde, en revanche, la translation à la clinique s'avère décevante.

L'utilisation d'un traitement au Delcasertib, inhibiteur des protéines kinase delta conduit chez 1010 patients STEMI à des résultats neutres⁶⁸.

De même, un traitement avec du nitrite, chez 229 patients STEMI n'a pas conduit à une réduction de la taille d'infarctus⁶⁹ alors que des résultats précliniques s'étaient montrés encourageants⁷⁰.

Plusieurs études ont porté sur la protection de la mitochondrie et sur la régulation de sa surcharge calcique conduisant à la transition de perméabilité. Malgré des résultats précliniques très encourageants avec plusieurs agents pharmacologiques tels que le TRO40303⁷¹ ou encore la cyclosporine A⁷², visant tous deux à inhiber la fuite calcique mitochondriale, n'ont pas apporté les résultats espérés dans les essais cliniques^{73,74}.

Les deux approches de conditionnement ischémique et pharmacologique ont donc fournies des résultats précliniques très intéressants, malheureusement, les translation de ces

stratégies pour des études cliniques restent encore compliquées et de nouvelles perspectives de protection émergent⁷⁵.

2.6. A la recherche de nouvelles cibles pour la cardioprotection

Face à ces résultats, de nombreuses questions se sont posées sur la pertinence des études pré-cliniques. Cibler un seul mécanisme à un instant « T » ne semble pas fonctionner chez le patient. De nouvelles études tentent alors de miser sur une approche multiparamétrique⁷⁶. Certaines études se basent sur l'utilisation simultanée de plusieurs traitements visant à protéger le cardiomyocyte durant la reperfusion et réduire la taille d'infarctus^{77,78}, en espérant observer un effet synergique. Ainsi, par exemple, une combinaison de traitement par post conditionnement ischémique couplé à un traitement pharmacologique, un agoniste du récepteur du glucagon like peptide-1, conduit à une potentialisation de la réduction de la taille d'infarctus comparé aux contrôles simplement traités avec l'un des deux conditionnements⁷⁷. Cependant, bien que le cardiomyocyte soit la cellule contractile du cœur, et occupe environ 75% du volume cardiaque⁷⁹, ils ne représentent environ que 30% des cellules cardiaques⁸⁰. Il apparaît donc nécessaire de tenir compte de ces cellules cardiaques environnantes⁸¹ mais également de la réponse systémique de l'infarctus du myocarde. Ainsi les cardiofibroblastes, autre cellule résidente cardiaque, jouent un rôle majeur dans la réponse à l'infarctus notamment par une activation de l'inflammation⁸¹. Certaines études ont également visé à moduler en parallèle la réponse cardiaque et la réponse systémique avec des résultats très encourageants^{82,83}. Cette réponse systémique est médiée par l'inflammation. L'inflammation est encore considérée comme une cible récente dans le domaine de la cardioprotection mais joue un rôle actif dans plusieurs phases de la pathologie et ouvre donc de nouvelles voies thérapeutiques⁸⁴. Avant d'envisager des thérapies efficaces il apparaît encore nécessaire de mieux comprendre les mécanismes inflammatoires en réponse à l'infarctus du myocarde.

3. L'inflammation

Historiquement, l'immunité signifie la protection contre les maladies. Les cellules et les organes agissant dans l'immunité sont inclus dans le système immunitaire. La fonction physiologique du système immunitaire est la défense de l'organisme face aux microbes, ou aux substances dangereuses pour le bon fonctionnement de celui-ci. La défense immunitaire est médiée par une réponse séquentielle et coordonnée de deux types d'immunité :

- L'immunité innée qui est essentielle pour une réponse rapide, via des acteurs et mécanismes mis en place avant même l'infection, et qui reconnaissent des signaux communs aux agents infectieux ou non infectieux.
- L'immunité adaptative est une réponse spécifique à une stimulation déjà rencontrée. Le système immunitaire acquis reconnaît et réagit à un large nombre de facteurs appelés antigènes. La réponse adaptative est spécialisée.

Les deux immunités fonctionnent en parallèle avec l'immunité innée qui initie des premiers signaux de danger stimulant par la suite la réponse adaptative.

3.1. Les différents types cellulaires impliqués dans la réponse inflammatoire

La réponse immunitaire met en jeu différents organes et différents types cellulaires.

Les cellules jouant un rôle spécialisé dans la réponse immunitaire adaptative et innée sont principalement les cellules phagocytaires, les cellules dendritiques, les lymphocytes, les « Natural Killers » (NK). Toutes ces cellules immunitaires sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse et vont être différenciées en fonction de leurs lignées. Deux grandes lignées sont décrites, la lignée myéloïde incluant les phagocytes, les cellules dendritiques et la lignée lymphoïde incluant les lymphocytes. Ces cellules sont identifiées en fonction de leurs morphologies, leurs mécanismes d'action mais également en fonction de l'expression de certaines protéines membranaires : les clusters de différenciation (CD). Ainsi, une nomenclature basée sur ces clusters de différenciation est utilisée pour caractériser des familles de cellules immunitaires :

Les **cellules phagocytaires** incluant les neutrophiles et les macrophages sont des cellules qui ont pour fonctions principales d'ingérer et d'éliminer les microbes ou les débris cellulaires. La réponse des cellules phagocytaires est caractérisée par le recrutement des cellules sur le site de la lésion, la reconnaissance et l'activation par les microbes ou débris cellulaires suivi de leurs ingestions et destructions. Les cellules phagocytaires sont également capables de communiquer avec les autres types cellulaires par contact direct ou par contact paracrine.

Les **cellules mastocytes, éosinophiles, et basophiles** : Ces trois types cellulaires jouent un rôle dans les deux immunités et partagent la caractéristique commune de présenter des granules de sécrétion cytoplasmiques contenant différents médiateurs inflammatoires ou antimicrobiens. Les mastocytes sont notamment fortement impliqués dans la réponse aux allergies. Les granules de sécrétions des cellules éosinophiles contiennent elles des enzymes qui vont détruire les agents infectieux.

Les **cellules dendritiques** sont des cellules résidentes dans les différents tissus mais également circulantes. Ces cellules sont des senseurs de l'environnement avec deux rôles centraux : initier la réponse innée et également capturer les antigènes des microbes pour les présenter aux cellules de la réponse adaptative.

Les **lymphocytes** sont l'unique type cellulaire de la réponse immunitaire adaptative, et expriment des récepteurs antigènes spécifiques. Il existe plusieurs millions de clones de lymphocytes circulants dans l'organisme, capable de reconnaître individuellement plusieurs millions d'agents pathogènes. Le rôle des lymphocytes est de moduler l'immunité acquise. Il existe deux classes de lymphocytes, les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ces deux types de lymphocytes sont classés différemment en fonction de leurs maturations. Ainsi les lymphocytes T terminent leurs maturations dans le thymus et les lymphocytes B dans la moelle osseuse. Les lymphocytes B produisent les anticorps pour la réponse humorale et les lymphocytes T sont des médiateurs de l'immunité cellulaire.

Les cellules **Natural Killer** sont quant à elles des cellules de l'immunité innée mais avec une morphologie lymphoïde et des fonctions similaires aux lymphocytes T sans pour autant présenter les récepteurs aux antigènes. La fonction principale de ces cellules est de reconnaître les agents infectieux, ou les cellules en souffrance et de les éliminer⁸⁵.

3.2. Le recrutement et l'infiltration des cellules immunitaires

Les cellules responsables de l'immunité sont des cellules sentinelles circulant en permanence via le sang et les vaisseaux lymphatiques. Ce flux induit trois principales fonctions : apporter les leucocytes sur le site de l'infection ou de la lésion pour qu'ils exercent leurs fonctions, transporter les lymphocytes depuis leurs sites de production aux organes lymphoïdes secondaires pour leur maturation, et ensuite des organes lymphoïdes secondaires vers le site de l'infection. Cette migration est finement régulée par différents facteurs. Les cellules endothéliales au niveau du site de la lésion sont activées par les sécrétions cytokiniques des cellules immunitaires résidentes telles que les macrophages ou les cellules dendritiques, ou par les sécrétions des cellules résidentes du tissu ; augmentant ainsi l'expression à leurs surfaces de molécules d'adhésion et augmentant la sécrétion de chimiokines. Ce processus de recrutement est en grande majorité commun à plusieurs types de leucocytes. Il se divise donc en plusieurs étapes et implique plusieurs médiateurs.

a) Les chimiokines

Les chimiokines sont une famille de cytokines présentant une structure semblable et jouant un rôle chimioattractant pour des cellules immunitaires. La plupart de ces chimiokines sont des polypeptides de 8 à 12 kDa. Il existe quatre grandes familles discriminées en fonction du nombre et la localisation de leurs résidus cystéine. Nous pouvons donc distinguer les chimiokines CC où les deux résidus sont adjacents, la famille CXC où les résidus sont séparés par un acide aminé et les familles CX3C (séparés par trois acides aminés) et C qui sont moins courantes. Ces chimiokines sont produites par différents types cellulaires et l'expression de celles-ci entraînent le recrutement de certaines cellules spécifiques de l'immunité. Ces cellules sont recrutées en fonction de l'expression à la surface de celles-ci de récepteurs spécifiques appelés CCR, CXCR, CX3CR ou encore CR. L'action de ces chimiokines est double :

- grâce à un gradient de concentration, les chimiokines guident les leucocytes vers le site lésé et augmentent leur adhésion à l'endothélium en augmentant l'expression des molécules d'adhésion que sont les sélectines et les intégrines à la surface des cellules endothéliales.

- les chimiokines sont aussi impliquées dans le développement des organes lymphoïdes secondaires et l'activation des lymphocytes. Elles sont également importantes pour la migration des cellules dendritiques vers le site de la lésion.

b) Les molécules d'adhésion

Les seconds médiateurs sont les molécules d'adhésion endothéliales. Pour que le leucocyte soit infiltré sur le site de la lésion, il doit d'abord franchir la paroi vasculaire. Il doit donc se fixer sur la paroi de l'endothélium. Cette fixation sur l'endothélium est médiée par deux classes de molécules appelées sélectines et intégrines ainsi que leurs ligands respectifs. Il existe trois types de sélectines : les P-sélectines, les L-sélectines et les E-sélectines. Les P- et E-sélectines sont exprimées en réponse à une activation de l'endothélium principalement par des facteurs pro-inflammatoires sécrétés par les cellules immunitaires résidentes ou par une activation des cellules endothéliales par l'histamine ou encore la thrombine. La fixation de ces sélectines à leurs ligands est la phase initiale de la fixation du leucocyte à la paroi de l'endothélium avec une liaison qui reste de faible affinité. La seconde phase implique la fixation aux intégrines. Les intégrines sont des protéines de surface qui permettent l'adhésion à d'autres cellules ou à la matrice extracellulaire. Il existe environ une trentaine d'intégrines⁸⁶. Les intégrines exprimées à la surface des cellules immunitaires interagissent avec leurs ligands présents à la surface des cellules endothéliales et inversement.

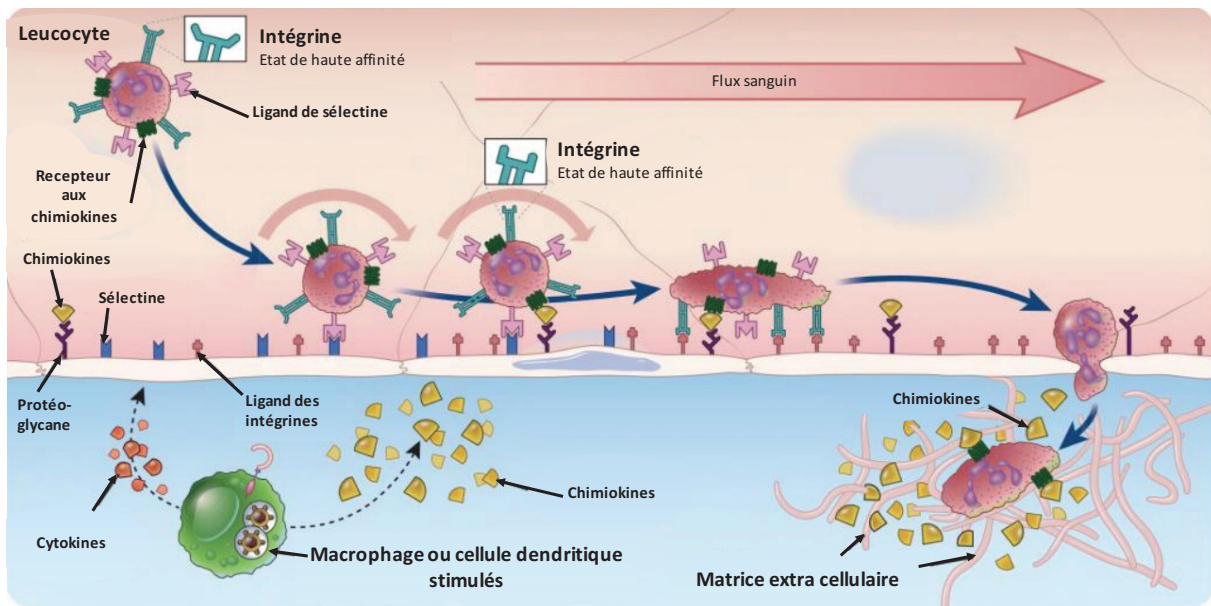


Figure 7 : Mécanismes d'adhésion cellulaire et de diapédèse des leucocytes : représentation schématique des mécanismes d'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium et de la diapédèse des leucocytes dans le tissu, adaptée du livre *Cellular and Molecular Immunology* (Abbas et al.).

Le leucocyte va rouler le long de la paroi grâce à ces adhésions de faible affinité régies par les sélectines. Ce ralentissement va permettre la mise en place de l'adhésion intégrine ligand, augmentant par la suite l'affinité de l'intégrine pour son récepteur⁸⁷ entraînant un arrêt du leucocyte sur la paroi endothéliale. Le phénomène de diapédèse ou transmigration, consistant à la migration du leucocyte entre les cellules endothéliales est alors possible. Le gradient de chimiokines dans le tissu va alors guider la cellule vers le site de lésion (**Figure 7**).

L'immunité joue un rôle majeur dans la réponse à l'infarctus du myocarde tant au niveau local que systémique. Bien que les deux types d'immunité soient impliqués dans cette réponse, la réponse immunitaire innée est la réponse la plus rapide pour tout type de lésion. Dans le contexte de l'infarctus du myocarde, la rapidité d'intervention est très importante. Nous avons donc concentré nos études sur l'immunité innée durant cette thèse.

4. L'immunité innée

Le terme d'immunité innée se réfère à des mécanismes de défenses qui sont toujours présents dans l'organisme, et la réponse ne nécessite pas une première exposition à l'agent pathogène. Elle est d'un point de vue phylogénétique, la partie la plus ancienne de l'immunité⁸⁸. Certains médiateurs de l'immunité innée chez les mammifères sont même fortement similaires à ceux retrouver dans les plantes comme les facteurs de reconnaissance⁸⁹. Les composants majeurs de l'immunité innée sont la surface de l'épithélium, les cellules résidentes sentinelles telles que les cellules dendritiques ou les macrophages résidents, les leucocytes avec les monocytes, les Natural Killer et d'autres mécanismes solubles tels que le système du complément⁸⁵.

4.1. Ses différentes fonctions

Les fonctions du système inné sont multiples, comme bloquer l'entrée de corps étranger dans l'organisme au niveau des barrières épithéliales, telles que la peau, la paroi gastro intestinale et la paroi des voies respiratoires. La réponse immunitaire innée est également la réaction initiale pour prévenir, contrôler ou éliminer les agents pathogènes étrangers. La virulence d'un microbe peut être améliorée par sa capacité à résister ou échapper à la réponse innée^{90,91}. Les effecteurs de l'immunité innée éliminent les cellules mortes ou souffrantes et initient le processus de réparation tissulaire. Ce rôle est particulièrement important dans la pathologie de l'infarctus du myocarde⁹². Cette première réponse innée stimule dans un second temps la réponse adaptative. Enfin la réponse immunitaire innée peut-être divisée en deux parties, la réponse inflammatoire qui correspond au recrutement de cellules immunitaires sur le site de la lésion, et la réponse antivirale qui limite ou inhibe la réplication virale et détruit le virus ou les cellules infectées.

L'activation de l'immunité innée est basée sur un système de reconnaissance des pathogènes ou des cellules endommagées qui reconnaît une faible diversité de motifs moléculaires (environ 1000) mais qui sont hautement conservés⁹³.

4.2. Les mécanismes de reconnaissance et d'activation mis en jeu

Le système de l'immunité innée reconnaît des structures moléculaires produites par les agents pathogènes. Les substances qui stimulent cette réponse immunitaire sont souvent communes à différentes classes de microbes et sont appelées PAMPs pour « Pathogen Associated Molecular Patterns ». Différentes classes de PAMPs sont distinguées avec les acides nucléiques, qui permettent de reconnaître les virus ou certaines bactéries, les protéines telles que la piline ou la flaggeline qui permettent de reconnaître les bactéries, les lipides membranaires tels que le LPS (lipopolysaccharide) qui permettent de reconnaître les bactéries gram négative, ou encore les polysaccharides tels que le mannane qui permettent d'identifier les infections fongiques⁹⁴.

Les acteurs de l'immunité innée reconnaissent également des molécules endogènes produites ou relarguées par les cellules souffrantes ou mortes. Ces substances sont appelées DAMPs pour « Damage Associated Molecular Patterns ». Ces DAMPs sont produits par les cellules souffrant d'infections, mais peuvent être également relargués lors d'une inflammation stérile que l'on trouve dans certaines pathologies telles que les maladies neurodégénératives, la goutte ou encore l'infarctus du myocarde.^{95,96}. Plusieurs classes de DAMPs sont décrites avec les DAMPs d'origine intracellulaire comme les protéines nucléaires type HMGB1 (High Mobility Group Box 1)⁹⁷, les DAMPs mitochondriaux (ADN mitochondrial, peptides formylés, cytochrome C, ATP, succinate, cardiolipine)⁹⁸, des cristaux tels que l'acide urique⁹⁹, les protéines de la famille S100¹⁰⁰, les protéines induites par le stress hypoxique (HSPs)¹⁰¹. L'origine de ces DAMPs peut aussi être extracellulaire avec des protéines de la matrice extracellulaire telles que certains glycoaminoglycanes¹⁰².

Le système de l'immunité innée utilise différents types de récepteurs cellulaires présents dans différents compartiments, ainsi que certaines molécules solubles pour reconnaître les DAMPs et les PAMPs. Ces récepteurs sont appelés PRR pour « Pattern Recognition Receptors ». Ces récepteurs ne sont pas exprimés par les cellules saines, ou alors dans des compartiments cellulaires où les acteurs de l'immunité innée n'ont pas accès en conditions normales. Les molécules solubles reconnaissant ces substances vont faciliter leur élimination. Différents types de récepteurs et senseurs de l'immunité innée sont décrits tels que les Toll-like receptors¹⁰³, les Nod-like receptors¹⁰⁴, les Rig-Like receptors¹⁰⁵, ou encore les senseurs cytosoliques de l'ADN¹⁰⁶.

Le système du complément est, quant à lui, un composant soluble du système immunitaire inné qui joue un rôle dans la défense contre les pathogènes présents dans la circulation. Les protéines du système du complément jouent un rôle d'opsonisation du microbe et influent sur le recrutement de cellules phagocytaires. Nous pouvons également retrouver une activation du système du complément au niveau tissulaire¹⁰⁷. Il joue également un rôle dans l'élimination de cellules apoptotiques¹⁰⁸.

5. Inflammation et réponse immunitaire innée dans l'infarctus du myocarde

Durant la séquence d'ischémie et de reperfusion, une partie des cellules cardiaques vont mourir et libérer des DAMPs. Ces DAMPs vont activer les cellules immunitaires résidentes entraînant la cascade de réaction de l'inflammation. Ce phénomène inflammatoire est appelé dans ce cas une inflammation stérile. L'activation de cette inflammation stérile va entraîner une activation puis une infiltration de cellules immunitaires dans le cœur.

Les premières cellules de l'immunité activées sont les cellules résidentes cardiaques. Le cœur est composé de deux principaux types de cellules immunitaires résidentes, les macrophages et les cellules dendritiques^{80,109}.

5.1. Les macrophages résidents

En conditions normales, des macrophages sont déjà présents dans le tissu et agissent en sentinelle. Ces macrophages résidents sont présents dans la plupart des organes tels que la peau, le cerveau, le cœur, les reins, les intestins... Ces macrophages peuvent être très abondants¹¹⁰ pouvant représenter de 5 à 15% de la totalité des cellules selon les organes¹¹¹. En fonction de leurs localisations et de leurs fonctions, ces macrophages portent différents noms tels que les cellules de Kupffer dans le foie, la microglie dans le cerveau ou les macrophages alvéolaires dans les poumons. D'une manière générale, ces macrophages remplissent des fonctions très importantes comme le développement et le maintien tissulaire en éliminant les débris cellulaires, en jouant un rôle d'immunosurveillance, en présentant les antigènes à l'immunité adaptative ou encore en éliminant les pathogènes¹¹². Une grande diversité de macrophages est donc présente dans les organes, avec des phénotypes très hétérogènes¹¹³. Ces macrophages sont installés dans l'organe dès les premiers stades embryonnaires et se renouvellent par prolifération locale dans la plupart des cas^{112,114}. Dans certains tissus comme le colon, ces macrophages ont une durée de demi vie assez faible d'environ trois semaines et sont constamment renouvelés par les monocytes circulants^{115,116}. A l'inverse, moins de 2% des macrophages résidents cardiaques¹¹⁷, moins de 17% des macrophages aortiques¹¹⁸, et moins de 5% des macrophages alvéolaires sont issus de la

circulation¹¹⁹. La microglie est constituée uniquement de macrophages d'origine embryonnaire et n'est pas renouvelée par des macrophages dérivés de la moelle osseuse en conditions saines^{120,121}.

Dans le cœur, ces macrophages résidents jouent un rôle dans le développement de la vasculature¹²² et dans la régénération de celle-ci dans le cœur de souris nouveau-nés¹²³. Au cours du vieillissement, le profil de ces macrophages évolue et entraîne des dysfonctions dyastoliques^{124,125}. Dans les conditions normales, les macrophages résidents cardiaques murins ont plutôt un profil anti-inflammatoire¹²⁶ mais en cas d'activation, ils sont capables de développer une activité phagocytaire¹²⁷. La principale explication réside dans le changement de phénotype de ces macrophages influencé par le changement du microenvironnement local¹²⁷. Ces macrophages sont en première ligne de défense, et à la suite d'un infarctus, Heidt *et al.* ont identifié que les macrophages résidents sont complètement éliminés après 24 heures de reperfusion. Quatre jours après l'infarctus, la population de macrophages résidents est renouvelée par les monocytes circulants. Dans le cœur humain, deux populations de macrophages résidents ont été initialement décrites et dichotomisées en macrophages inflammatoires (CCR2+) ou anti-inflammatoires (CCR2-). D'un point de vue clinique, le nombre élevé de macrophages CCR2+ est associé à une persistance de la dysfonction systolique et à un remodelage du ventricule gauche chez des patients opérés pour l'implantation d'une assistance circulatoire gauche¹²⁷.

Après activation par les DAMPs libérés par les cellules souffrantes, ces macrophages vont sécréter des facteurs pro-inflammatoires via l'activation de IRF3 et la production d'interféron de type 1¹²⁸ activant le recrutement de leucocytes. De plus, au moment de la reperfusion, le flux sanguin est restauré et les protéines solubles du système de complément sont exposées aux cellules endothéliales et au myocarde souffrant¹²⁹. Ces protéines entretiennent la stimulation des cellules immunitaires et activent le recrutement massif de neutrophiles via le complexe CD11b-CD18¹³⁰. Les sécrétions des cellules résidentes et l'activation des cellules endothéliales sont également fortement impliquées dans ce processus. Ces ensembles de signaux pro-inflammatoires vont déclencher un recrutement de cellules immunitaires au niveau du cœur décrit en plusieurs vagues (**Figure 8**).

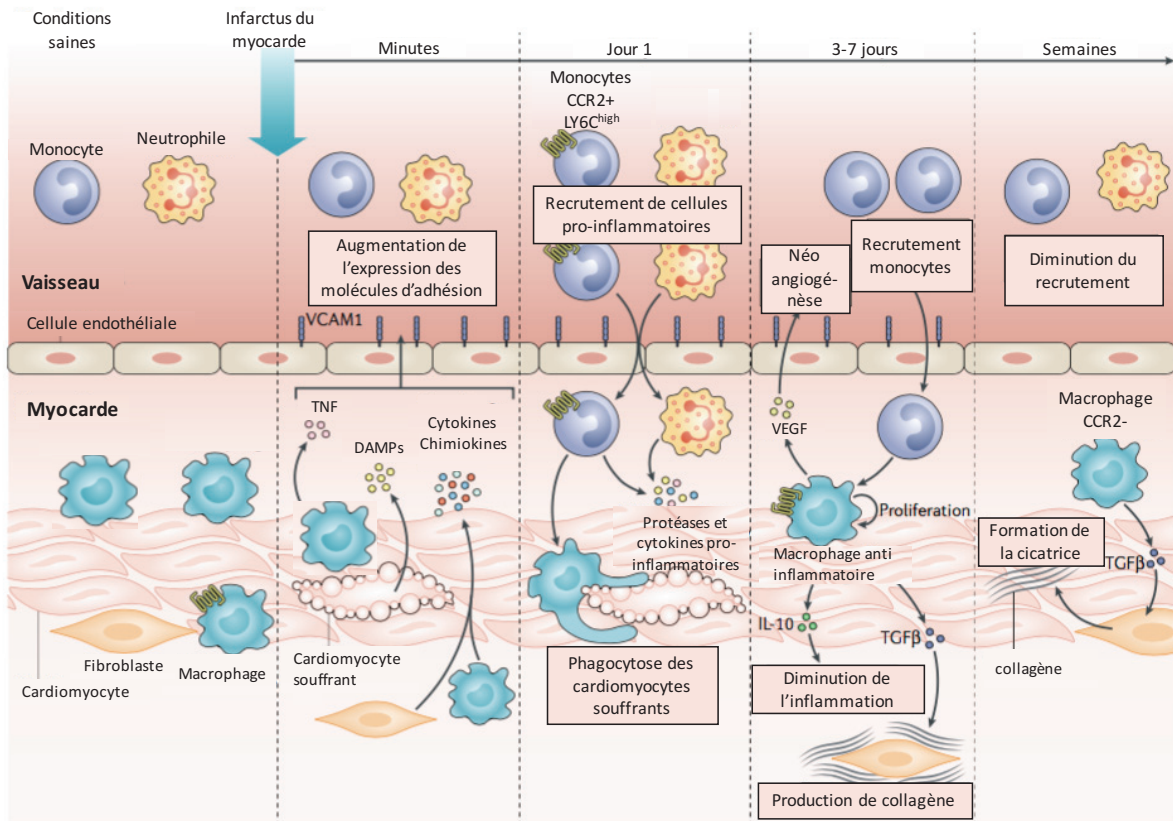


Figure 8 : Différentes vagues de recrutement de cellules immunitaire observées dans le cœur après un infarctus. Adapté de Swirski et Nahrendorf¹³¹.

5.2. Différentes vagues de recrutement post infarctus

a) Recrutement de neutrophiles

Les neutrophiles sont la population de cellules immunitaires circulantes la plus abondante dans le sang avec environ 4400 cellules par mm^3 représentant environ 40 à 60% de la population⁸⁵. Les neutrophiles circulent comme des cellules rondes de 10 à 15 micromètres de diamètre. Ces cellules possèdent un noyau multilobé qui permet de les distinguer morphologiquement. Ce sont les premières cellules recrutées pour faire face à une agression et leur rôle principal est de phagocyter les microbes ou les débris cellulaires. Activés, les neutrophiles vont également libérer massivement leurs granules contenant des enzymes ou autres substances dégradant les microbes mais également le tissu¹³². Plusieurs sous types de neutrophiles sont distingués¹³³, jouant des rôles différents. Ainsi certains neutrophiles vont produire des filaments extracellulaires de chromatine décondensée appelés NET

(Neutrophiles Extracellular Trap) dont le rôle peut-être bénéfique par leurs actions anti-infectieuses et délétères par leur rôle pro coagulant par exemple¹³⁴. Les neutrophiles vont également activer la suite de la réponse inflammatoire et le recrutement d'autres types cellulaires tels que les monocytes par la production de chimiokines et cytokines pro-inflammatoires^{135,136}. Malgré ce rôle majeur, les neutrophiles sont assez rapidement éliminés du tissu et ne sont présents dans le tissu que quelques jours¹³⁷.

La libération de DAMPs par les CMA¹³⁸ et les cellules du myocarde en souffrance conduisent à une libération de chimio-attractants et des activateurs des neutrophiles tels que TNF α , IL-1, IL-6, IL-8¹³⁹. Les neutrophiles sont alors recrutés rapidement au niveau de la zone lésée¹⁴⁰ (quelques minutes) et leur extravasation est facilitée par les macrophages résidents. L'activation de la voie TLR9/MyD88/CXCL5 dans les macrophages résidents conduit à la sécrétion de CXCL5 et CXCL2 facilitant respectivement l'adhésion et le « rolling » des neutrophiles sur la paroi endothéliale¹⁴¹. Un médiateur important de l'infiltration de neutrophiles est la cytokine IL-6. L'IL-6 est une cytokine d'environ 25kDa qui joue un rôle pléiotrope dans l'inflammation. Sa production au niveau locale est relayée par un signal systémique avec l'induction de la sécrétion par le foie de certaines protéines telles que la protéine réactive C (CRP), les sérum amyloïdes ou le fibrinogène¹⁴². Dans le cœur, les CMA souffrant secrètent de l'IL-6¹⁴³ et cette cytokine stimule l'adhésion des neutrophiles¹⁴⁴. Bien que les conditions hypoxiques allongent la durée de vie des neutrophiles dans le tissu¹⁴⁵, ceux-ci sont assez vite éliminés de l'organe. Après ce recrutement précoce, une seconde vague de recrutement des monocytes est décrite en deux temps.

b) Recrutement de monocytes

Les monocytes sont des cellules mononuclées circulantes qui représentent entre 2 et 8% des cellules immunitaires présentes dans le sang⁸⁵. Les monocytes sont dérivés des précurseurs hématopoïétiques assez rapidement via la stimulation de MCS-F (macrophage colony stimulating factor) ou GM-CSF (granulocyte macrophages colony stimulating factor)¹⁴⁶. Lorsque les monocytes sont infiltrés dans l'organe, nous parlons de macrophages. Les macrophages ont été découverts par Elie Metchnikoff qui a décrit ces cellules phagocytaires, cette découverte de l'activité phagocytaire lui a permis d'obtenir en 1908 le prix Nobel¹⁴⁷.

Mais la grande avancée dans la connaissance des macrophages s'est produit plus récemment avec notamment les travaux de Zanvil Cohn et de ses collaborateurs¹⁴⁸. La principale fonction des macrophages réside dans leur activité phagocytaire mais ils jouent également un rôle dans la transition vers l'immunité adaptative¹⁴⁹, ou encore dans la réparation tissulaire avec la stimulation de l'angiogénèse¹⁵⁰. Ainsi, en fonction de leurs différents rôles, mais aussi de leurs marqueurs de surface (CD), nous pouvons distinguer plusieurs types de macrophages¹⁵¹. En effet, sont classiquement décrits deux grands sous types de macrophages, les macrophages M1 à phénotype pro-inflammatoire et les macrophages M2 à phénotype anti-inflammatoire. Cette division dichotomique date des années 1990 où une stimulation des macrophages à l'IL-4 a montré une réponse différente au niveau génique des macrophages¹⁵² en comparaison aux stimulations classiquement utilisées¹⁵³. La terminologie M1/M2 a alors été proposée plus tard par Mills en se basant sur la réponse du métabolisme à l'arginine des macrophages de souris C57BL/6 et BalB/C et comparant celui-ci à la réponse des lymphocytes Th1 et Th2 dans ces mêmes modèles¹⁵⁴. En effet les macrophages M1 ont une réponse similaire aux lymphocytes Th1 et les macrophages M2 aux lymphocytes Th2. Les avancées technologiques ont permis d'identifier depuis, plusieurs sous types de phénotypes de macrophages, démontrant que cette nomination dichotomique est en réalité plus complexe. Plusieurs marqueurs sont communs à tous les macrophages et permettent de les distinguer des autres types cellulaires tels que les marqueurs F4/80, CD11b, ou encore CD68.

c) Recrutement de macrophages pro-inflammatoires

Les macrophages M1 sont décrits comme producteurs de cytokines pro-inflammatoires, médiateurs de la résistance aux pathogènes, avec de hautes capacités phagocytaires mais induisant également des lésions tissulaires. Ils sont différenciés et activés suite à une stimulation à l'interféron gamma¹⁵⁵ et/ou au LPS¹⁵⁶. Les macrophages secrètent alors massivement des cytokines telles que l'IL-1 β , du TNF, de l'IL-12, ou encore de l'IL-18¹⁵⁷. Ils expriment des récepteurs de surface caractéristiques avec une forte expression du récepteur CCR2, du complexe majeur d'histocompatibilité II, des marqueurs CD68, CD80, CD86. Chez la souris, nous pouvons également isoler les macrophages M1 car ils présentent une forte expression du complexe antigène des lymphocytes LY6C¹⁵⁸. Au niveau de la régulation transcriptionnelle de la polarisation, interviennent les facteurs de régulation STAT1, NF- κ B, la

protéine activatrice AP-1, et le facteur de régulation de l'interféron IRF5¹⁵⁹. Un autre sous type de macrophages peut aussi être décrit avec des macrophages M4 qui présentent les caractéristiques des M1 sans l'action phagocytaire¹⁶⁰.

Dans le cas de l'infarctus, une première vague d'infiltration de macrophages pro-inflammatoires est décrite aussi bien dans les modèles animaux avec les monocytes LY6C^{high}¹⁶¹ que chez l'homme avec les monocytes CD14^{high} et CD16^{low}¹⁶². Ces macrophages ont une forte capacité phagocytaire et jouent le rôle d'élimination des débris, mais libèrent également des espèces radicalaires de l'oxygène, et des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α ¹⁶¹. Au niveau transcriptionnel et post transcriptionnel, ces macrophages sont identifiables par l'expression de LYVE1, CD26, CD86, MRC1¹⁶³. Cette phase initiale est essentielle pour la clairance des débris et la réparation cardiaque¹⁶⁴. En revanche, une persistance de cette phase pro-inflammatoire dans le tissu augmente les débris tissulaires, entraîne une diminution des fonctions ventriculaires, et peut conduire à long terme à l'insuffisance cardiaque^{165,166}. Trois jours après l'infarctus, une seconde population de macrophages est décrite dans le cœur, des macrophages anti-inflammatoires¹⁶¹.

d) Recrutement de macrophages de type anti-inflammatoire

Une seconde population de macrophages présente des caractéristiques anti-inflammatoires. Ces macrophages M2 sont appelés également alternatifs. Une stimulation des macrophages non différenciés avec de l'IL-4, IL-13 ou encore IL-10 induit leur différenciation en M2^{167,168}. Ces macrophages produisent une grande quantité d'IL-10¹⁶⁹ et jouent un rôle dans la réparation tissulaire, l'angiogenèse et certaines pathologies allergiques^{150,170,171}. Les macrophages M2 sont également caractérisés par une expression de marqueurs tissulaires spécifiques. Ainsi, un des marqueurs le plus couramment utilisé pour identifier ces macrophages est le récepteur au mannose ou CD206^{172,173}. D'autres marqueurs sont également discriminants pour identifier les macrophages M2 tels que FIZZ1 et YM1¹⁷⁴, arginase 1¹⁷⁵, MGL (Macrophages Glactose C-type Lectine receptor)¹⁷⁶, une forte expression de CX3CR1 ou une faible expression de LY6C chez la souris¹⁵⁸. La polarisation en macrophages M2 est notamment sous le contrôle des facteurs de transcription STAT6, IRF4¹⁵⁹, NF-kB p50¹⁷⁷. En fonction de

toutes ces caractéristiques, plusieurs sous types de macrophages M2 sont décrits avec les macrophages M2a, M2b, M2c^{168,178}.

Dans la pathologie de l'infarctus du myocarde, une phase décrite comme réparatrice intervient après trois jours dans le cœur. Les macrophages infiltrés changent de phénotype sécrétant de l'IL-10, du TGF- β ou encore du VEGF¹⁷⁹. Cette différenciation dépendrait en partie du facteur de transcription Nr4a1. En effet, une déplétion de cette protéine entraîne une diminution de la réparation tissulaire, une augmentation de la fibrose et des signes d'insuffisance cardiaque^{179,180}. Ces macrophages avec un profil plutôt anti-inflammatoire sont caractérisés par l'expression de marqueurs tels que ARG1, MSR1, CD206¹⁶³. Plus tardivement, une nouvelle infiltration de monocytes est observée, accompagnée d'une prolifération locale des macrophages déjà infiltrés. Ce mécanisme permet aux macrophages de rester dans le cœur durant plusieurs semaines¹⁸¹. Cet environnement entretient la prolifération des myofibroblastes et leur migration dans la zone infarctée où ils synthétisent de la matrice extracellulaire^{182,183}, à l'origine de la fibrose.

En revanche, concernant les macrophages, ces phénotypes très marqués ne sont pour autant pas figés, la polarisation des macrophages est un phénomène très dynamique. Ainsi, un même macrophage peut évoluer d'un phénotype à un autre en fonction du microenvironnement tissulaire dans lequel il se trouve¹⁸⁴. Malgré ces descriptions très précises, la différenciation des macrophages est donc en réalité un continuum orchestré par le microenvironnement^{151,185}.

5.3. L'inflammation : nouvelle cible dans la cardioprotection

L'inflammation joue un rôle prépondérant dans l'infarctus du myocarde. Les différentes vagues de recrutement sont finement régulées par plusieurs cascades d'événements. Différentes études ont tenté de moduler ces réponses inflammatoires.

a) Modulation de l'activité des neutrophiles

Plusieurs études concernent les effets de la modulation de la réponse des neutrophiles sur la fonction cardiaque. Dans un modèle pré-clinique d'ischémie-reperfusion, une injection d'anticorps dirigés contre les neutrophiles avant l'ischémie conduit à une réduction de taille d'infarctus de 43%¹⁸⁶. Jolly *et al.* ont également démontré également une diminution de la taille d'infarctus de 43,2% pour les animaux contrôles à 26,6% de la zone à risque pour des animaux en condition de neutropénie. De manière très intéressante, lorsque l'occlusion est prolongée, cette diminution passe de 46,4 à 31,5%, suggérant que la mort cellulaire pour les temps longs est alors en majorité consécutive à la privation d'oxygène et de nutriments¹⁸⁷. L'inhibition de l'activité des neutrophiles en pré-conditionnement et en post-conditionnement chez le rat entraîne également une diminution de la taille d'infarctus mesurée à 24H¹⁸⁸. Ces résultats pré-cliniques suggèrent donc que les neutrophiles sont une potentielle cible thérapeutique afin de limiter les lésions à la suite d'un infarctus. Cependant, certaines études pré-cliniques ciblant les neutrophiles ont présenté des résultats neutres. En effet, la modulation de molécules chimio attractantes des neutrophiles n'a pas apporté de différence significative sur les fonctions cardiaques et la réponse inflammatoire^{189,190}. L'inhibition de l'adhésion des neutrophiles avec l'utilisation d'un anticorps dirigé contre CD18 dans une cohorte de 394 patients STEMI ayant subi une thrombolyse n'a pas présenté de différence sur la taille d'infarctus ou la perfusion coronarienne¹⁹¹. L'inhibition du complexe CD11b-CD18 dans une cohorte de 420 patients STEMI reperfusés par angioplastie n'a pas présenté d'effet cardioprotecteur à court terme¹⁹².

Il est donc bien établi que les neutrophiles sont des acteurs précoces de la réponse inflammatoire dans l'infarctus du myocarde, mais la translation à la clinique n'a pas apporté les résultats escomptés. Les raisons sont diverses mais l'implication d'un grand nombre d'acteurs, la complexité de la réponse et la cinétique de traitement sont des pistes à explorer pour améliorer ces translations.

b) Modulation de l'activation des macrophages

Comme pour les neutrophiles, un très grand nombre d'études pré-cliniques s'est porté sur la régulation de l'infiltration, de l'activité ou de la différenciation des macrophages. Ainsi la délétion génétique de CCR2, chez la souris entraîne une amélioration de la fraction de raccourcissement, et une diminution de la dilatation du ventricule gauche à J7 et J28 après une ligature de l'artère interventriculaire antérieure¹⁹³. La délétion génétique de CXCR6, impliqué dans le recrutement de macrophages, conduit également à une réduction de la taille d'infarctus et de la dilatation du ventricule gauche, ainsi qu'à une amélioration de la fraction d'éjection du ventricule gauche et à une diminution de l'infiltration de cellules immunitaires dans le myocarde¹⁹⁴. L'utilisation d'un agoniste des récepteurs à adénosine A 2B, qui diminue l'activation des macrophages, conduit à la diminution de la taille d'infarctus¹⁹⁵. L'utilisation de siRNA dirigés contre CCR2 a permis d'inhiber l'expression de CCR2 spécifiquement dans les monocytes. Cette inhibition conduit à une amélioration de la fraction d'éjection ventriculaire et à une diminution du recrutement de macrophages pro-inflammatoires dans le cœur à la suite d'une ligature permanente de l'artère interventriculaire antérieure¹⁹⁶. Par ailleurs, une déplétion totale de macrophages a montré dans certaines études des résultats opposés avec une augmentation de la taille d'infarctus mais dans un modèle de lésion cardiaque par le froid¹⁹⁷. Comme présenté précédemment, deux phénotypes de macrophages sont observés durant la réponse à l'infarctus. L'amélioration des techniques et des connaissances a permis de cibler précisément la modulation des différentes populations de macrophages. Ainsi, l'inhibition du facteur de transcription IRF5, en partie responsable de la différenciation des monocytes en macrophages pro-inflammatoires, conduit à une réduction de macrophages M1 infiltrés dans l'organe, et à une amélioration des fonctions cardiaques à trois semaines¹⁹⁸. Une délétion du gène codant pour MMP28, conduit à l'inhibition de l'activation des macrophages anti-inflammatoires. Cette inhibition entraîne une augmentation des dysfonctions ventriculaires après un infarctus du myocarde par ligature permanente¹⁹⁹. Dans les modèles de souris ayant subi une délétion génétique du gène TRIF1, le profil anti-inflammatoire des macrophages n'est pas exprimé après un infarctus du myocarde. Cette délétion entraîne une diminution de la réparation tissulaire et une diminution drastique de la survie post infarctus²⁰⁰. De plus, l'injection d'IL-4, stimulant la différenciation des macrophages en macrophages M2, deux jours avant l'opération et immédiatement avant la ligature dans la

cavité péritonéale permet une amélioration de la survie post infarctus et de la réparation tissulaire dans des souris sauvages²⁰⁰. Cette étude souligne donc l'importance des macrophages anti-inflammatoires dans la réparation tissulaire et la survie post infarctus. L'inhibition de l'activation de macrophages M2 apporte parfois des résultats inverses. Le facteur de transcription GATA3 est un activateur de l'inflammation via la différenciation des cellules Th2, la différenciation des lymphocytes Natural killer ou encore le développement des lymphocytes T. GATA3 est également exprimé spécifiquement dans les macrophages de types M2 pour lesquels une délétion du gène GATA3 est accompagné d'une amélioration des fonctions cardiaques après un infarctus, et d'une augmentation de l'infiltration de macrophages pro-inflammatoires²⁰¹.

Ces résultats controversés soulignent la difficulté de cibler les macrophages comme approche thérapeutique. En effet, le caractère hautement dynamique de cette réponse est un facteur qui nécessite d'être encore étudié afin de trouver le bon moment pour utiliser un traitement.

c) L'inhibition du système du complément

Différentes études cliniques ont tenté de moduler l'activation du système du complément. En utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine C1, la taille d'infarctus est réduite sur une très faible population (22 patients) de patients STEMI thrombolysés²⁰². L'inhibition de la cascade du complément a également été réalisée avec l'utilisation du Pexelizumab, anticorps anti-protéine C5, dans différentes études avec des résultats variables. En effet, une injection en bolus juste avant la reperfusion et un maintien du traitement durant 20H n'a pas eu d'effet sur la taille d'infarctus et les événements cliniques dans une cohorte de 343 patients ayant subi une thrombolyse pharmacologique²⁰³. En revanche, sur une cohorte de patients ayant subi une intervention percutanée, aucune différence de taille d'infarctus n'est observée mais une diminution de la mortalité à trente jours est mesurée²⁰⁴. Ces résultats n'ont pas été confirmés par l'étude APEX-MI qui n'observe pas d'effet du même traitement sur la mortalité à trente jours²⁰⁵.

Comme pour la modulation des cellules infiltrées, la régulation pharmacologique du système du complément apporte des résultats variables.

d) L'inhibition de différentes cytokines

Le succès des immunothérapies dans le cancer a conduit à transposer ces méthodes aux maladies cardiovasculaires. L'étude CANTOS fut la première immunothérapie à montrer des résultats positifs dans les maladies cardiovasculaires. Dans cette étude, l'administration de canatuximab, un anticorps monoclonal dirigé contre IL-1 β , administré tous les trois mois entraîne une diminution de la concentration plasmatique de la protéine CRP et une diminution des événements cardiovasculaires chez des patients traités pour athérosclérose ayant déjà subi un infarctus du myocarde²⁰⁶. Dans le traitement de l'infarctus du myocarde, IL-1 β est une cible étudiée depuis de nombreuses années. Les études pré-cliniques ont montré des résultats parfois très encourageants, et parfois plus neutres. L'injection d'un antagoniste du récepteur à l'IL-1 avant l'ischémie entraîne une diminution de la taille d'infarctus et une amélioration de la fraction d'éjection ventriculaire gauche dans un modèle d'ischémie-reperfusion *in vivo*²⁰⁷. Par ailleurs, une délétion du récepteur à l'IL-1 conduit à une diminution de la taille d'infarctus²⁰⁸. Paradoxalement, le traitement des souris avec un anticorps dirigé contre IL-1 β , inhibant donc son action, au moment de la reperfusion, conduit à une diminution de la réparation tissulaire, suggérant un rôle protecteur de l'IL-1 β . Ces études pré-cliniques montrent le double effet de cette cytokine, à la fois protectrice et délétère. Dans une étude clinique portant sur 182 patients, Morton *et al.* ont montré que le traitement journalier des patients durant 14 jours avec un antagoniste des récepteurs à l'IL-1 (Anakinra) conduisait à une réduction de l'inflammation via la mesure de la CRP. En revanche, le groupe traité présentait plus d'événements cardiovasculaires à un an²⁰⁹. Une étude récente apporte quelques espoirs sur ce traitement puisque l'administration d'Anakinra à des patients STEMI, bien que n'entraînant pas de diminution de la mortalité conduit à une diminution de la CRP et à une diminution d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque²¹⁰.

La cytokine IL-6 joue également un rôle central dans la pathologie de l'infarctus du myocarde. Les différents modèles pré-cliniques visant à moduler l'activité de cette cytokine présentent également des résultats contradictoires. L'injection d'un agoniste du récepteur à l'IL-6 entraîne l'augmentation du taux de survie et l'amélioration de la fraction de raccourcissement dans un modèle d'infarctus par ligature permanente²¹¹. L'utilisation de modèle de souris avec une délétion du gène GP-130, qui est le récepteur de l'IL-6, dans les CMA conduit à une augmentation de la mortalité dans un même modèle d'infarctus. Un traitement des souris

avec le complexe IL-6 fixé à son récepteur soluble sIL-6R, qui joue un rôle d'agoniste de l'activité de l'IL-6, entraîne une diminution de la taille d'infarctus et de l'apoptose dans un modèle d'ischémie de 40 minutes suivies d'une reperfusion de 3 heures chez le rat²¹². Au niveau clinique, l'administration d'un anticorps dirigé contre le récepteur à l'IL-6 membranaire et soluble, le Tocilizumab, dans une cohorte de 117 patients non STEMI une heure avant l'angiographie conduit à une diminution de la CRP durant le temps d'hospitalisation, suggérant une diminution de la réponse inflammatoire²¹³. Cette diminution des valeurs de CRP est d'autant plus importante chez les patients traités rapidement après l'apparition des premiers symptômes, suggérant une meilleure action du Tocilizumab dans la phase précoce. Dans une cohorte incluant 28 patients souffrant d'un STEMI ou d'un NSTEMI, une injection de Tocilizumab dans les premières 24 heures suivant l'hospitalisation (12 patients) n'a pas montré d'effets bénéfiques sur la survenue d'évènements cliniques majeurs à 30 jours impliquant toutes causes de mortalité, récurrence d'infarctus du myocarde, rupture de valve, dissection aortique, péricardite, trouble du rythme ou tamponnade cardiaque en comparant à l'injection de placebo (16 patients)²¹⁴. Cependant le faible nombre de patients réduit la puissance statistique et le temps de suivi de ces patients n'était que de 30 jours. Dans une sous analyse de l'étude CANTOS, le groupe de patients traités au Canatuximab présente des taux circulants d'IL-6 réduit de 34,9% par rapport aux patients du groupe placebo. Parmi les patients du groupe traité, les patients présentant un taux circulant d'IL-6 inférieur à la médiane de la population ont une réduction de 33% de la survenue d'évènements cardiovasculaires majeurs (Infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral (AVC), décès de cause cardiovasculaire), une réduction de 57% de la mortalité cardiovasculaire et une réduction de 54% de toutes causes de mortalité²¹⁵. Certes l'étude CANTOS ne porte pas sur des patients ayant subi un infarctus du myocarde mais cette sous analyse démontre le potentiel clinique d'une modulation du taux circulant d'IL-6 dans les maladies cardiovasculaires.

Ainsi, face à la complexité des résultats pré-cliniques, et le manque de consistance dans les résultats cliniques, la modulation de la voie de l'IL-6 dans la phase précoce du STEMI reste une piste thérapeutique intéressante.

Dans la pathologie de l'ischémie-reperfusion, MCP-1 a été fortement étudié au niveau pré-clinique avec des résultats parfois inconsistant²¹⁶. En effet, un traitement avec un anti-MCP1 en pré ou post-conditionnement d'une ligature permanente entraîne une amélioration de la

survie et des fonctions cardiaques chez la souris²¹⁷. L'utilisation de souris transgéniques sur exprimant la protéine MCP1 conduit à une diminution de la taille d'infarctus dans un modèle d'ischémie-reperfusion²¹⁸. Ces données contradictoires montrent qu'une meilleure compréhension du rôle de MCP-1 dans cette pathologie est nécessaire. Aucune étude clinique à ce jour n'a ciblé l'inhibition de MCP-1 même si la sécrétion de MCP-1 dans le sang a été mesurée dans différentes cohortes humaines. De Lemos *et al.* ont mesuré la concentration sanguine de MCP-1 dans deux études menées sur des patients souffrants de syndromes coronariens aigus sous traitement antiplaquettaire ou traités avec des statines. Dans ces deux études, ils ont identifié qu'un taux élevé de MCP-1 à l'admission (prélèvement réalisé dans les 3,5 jours suivant l'admission) était associé à un risque de mort ou de récurrence d'infarctus^{219,220}. Deux autres temps de prélèvement ont également été étudiés à 4 mois et 1 an. L'utilisation des propriétés circulantes de MCP1 comme biomarqueur est une vision très intéressante et déjà proposée dans d'autres pathologies telles que le cancer du sein²²¹. Cependant, avant d'envisager une modulation thérapeutique, il apparaît nécessaire de connaître la cinétique précoce de libération de MCP-1.

Les résultats des différentes études portant sur IL-1 β , l'IL-6 et MCP-1 soulignent la difficulté de cibler les cytokines comme stratégie thérapeutique. Ces résultats contradictoires sont retrouvés également dans des études portant sur IL-8, TNF- α et bien d'autres²²². Les sécrétions sanguines des différentes cytokines et chimiokines suivent une réponse dynamique et ne sont pas linéaires. Afin d'améliorer les traitements, il semble opportun de mieux comprendre ces cinétiques de libération. Une meilleure compréhension de ces cinétiques permettrait de traiter les différentes cibles au bon moment.

e) Autres traitements anti-inflammatoires

D'autres stratégies anti-inflammatoires ont été envisagées au niveau clinique avec des résultats encore divergents. L'utilisation d'un inhibiteur de la Mitogen Activated Protein Kinase p38 (p38MAPK), activateur des voies d'apoptose et de la transcription de cytokines pro-inflammatoires, dans une cohorte de patients non STEMI traités deux fois par jours durant 12 semaines n'a pas montré de diminution significative des événements cliniques²²³. L'utilisation d'un inhibiteur de la lipoprotéine phospholipase A1 n'a pas non plus montré de

différence significative avec le groupe témoin²²⁴. Une étude récente sur un traitement journalier avec une faible dose de Colchicine (0,5 mg/jours), anti-inflammatoire utilisé pour traiter certaines pathologies telles que la goutte, débutée dans les 30 premiers jours post infarctus a été conduite sur 4745 patients. Cette étude, nommée COLCOT, montre des résultats encourageants avec une diminution du nombre d'évènements primaires (composite de : décès pour raison cardiovasculaire, arrêt cardiaque, infarctus du myocarde, AVC ou hospitalisation pour angor nécessitant revascularisation) dans le groupe traité par rapport au groupe placebo (5,5% contre 7,1%, $p=0.02$)²²⁵. Par ailleurs, une sous analyse de cette étude COLCOT démontre qu'un traitement à la colchicine initié dans les trois premiers jours suivant l'infarctus entraîne une diminution plus importante de la survenue des évènements primaires par rapport au traitement placebo (4,3% contre 8,3%, $p=0,007$). Cette diminution est moins importante pour les groupes de patients traités entre 4 et 7 jours (6.0% contre 5.9%) et les patients traités après 8 jours (5.7% contre 7.1%)²²⁶. Ces résultats sont confirmés par l'étude LODOCO2 incluant 5522 patients²²⁷ ayant subi un infarctus au moins six mois en amont de la randomisation. Dans cette étude effectuée sur des patients stables, l'incidence d'évènements primaires (décès pour raison cardiovasculaire, infarctus du myocarde, AVC, ischémie nécessitant revascularisation) est réduite dans le groupe traité à la colchicine (0,5 mg/jours) en comparaison au groupe placebo (2,5 contre 3,6 évènements pour 100 personnes par an, $p<0.001$). En revanche, l'incidence de mortalité non cardiovasculaire est augmentée dans le groupe traité. Une étude australienne portant sur une cohorte de 795 patients n'a pas retrouvé d'amélioration significative sur la survenue d'évènements cardiovasculaires après un traitement à la colchicine avec deux doses journalières de 0,5mg malgré une tendance à la diminution²²⁸. Une augmentation de la mortalité non cardiovasculaire est également observée dans le groupe traité après un suivi d'un an. L'utilisation de la colchicine en traitement post infarctus est donc une piste très encourageante pour réduire la mortalité cardiovasculaire mais une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents semble nécessaire.

Les résultats encourageants de différentes études, et l'implication certaine de l'inflammation dans les lésions d'ischémie-reperfusion soulignent l'importance d'améliorer les connaissances des mécanismes inflammatoires afin de proposer des cibles thérapeutiques à long terme. C'est dans cette optique que ce projet de thèse s'est positionné.

But du projet

Notre étude se concentre sur l'implication de l'inflammation dans l'ischémie-reperfusion cardiaque.

Les différentes phases de l'inflammation dans l'infarctus ont été bien décrites entre J1 et J10 après un infarctus. En revanche, peu d'études se sont concentrées sur la phase précoce de reperfusion, à savoir les 24 premières heures. Nous pensons que les événements inflammatoires prenant place pendant ces premières heures sont cruciaux et déterminent l'évolution des événements plus tardifs, notamment sur les fonctions cardiaques et le remodelage ventriculaire.

Malgré des résultats encourageants dans les modèles pré-cliniques, de nombreux essais thérapeutiques sur différentes cibles se sont révélés inefficaces. Une des raisons de ces échecs pourrait être une méconnaissance de la cinétique des événements dans la phase aiguë de l'infarctus.

Ce projet de recherche a donc pour objectif de décrypter de façon plus précise la séquence des événements inflammatoires pendant les premières 24h.

Comme décrit dans l'introduction, l'inflammation est un phénomène vaste impliquant de nombreux acteurs. Nous avons fait le choix de nous focaliser sur deux aspects de cette réponse inflammatoire :

- d'une part les sécrétions cytokiniques, qui sont les signaux majeurs paracrines régissant cette réponse et la régulation à court et long termes de cette réponse.
- d'autre part à l'infiltration des macrophages dans le myocarde infarci sous la dépendance de facteurs paracrines, principalement les sécrétions cytokiniques.

Nous mettrons en lien ces deux éléments de régulation de l'inflammation. Nous essayerons de comprendre comment ces deux phénomènes apportent un nouvel éclairage sur la séquence inflammatoire prenant place dans le myocarde infarci lors de la phase aiguë de l'infarctus du myocarde et comment cela peut nous aider à constituer une nouvelle cible thérapeutique.

En corrélant ces événements dépendants l'un de l'autre, nous espérons déterminer avec précision les fenêtres thérapeutiques d'application des traitements visant cette phase inflammatoire en s'appuyant sur une approche translationnelle (**Figure 9**).

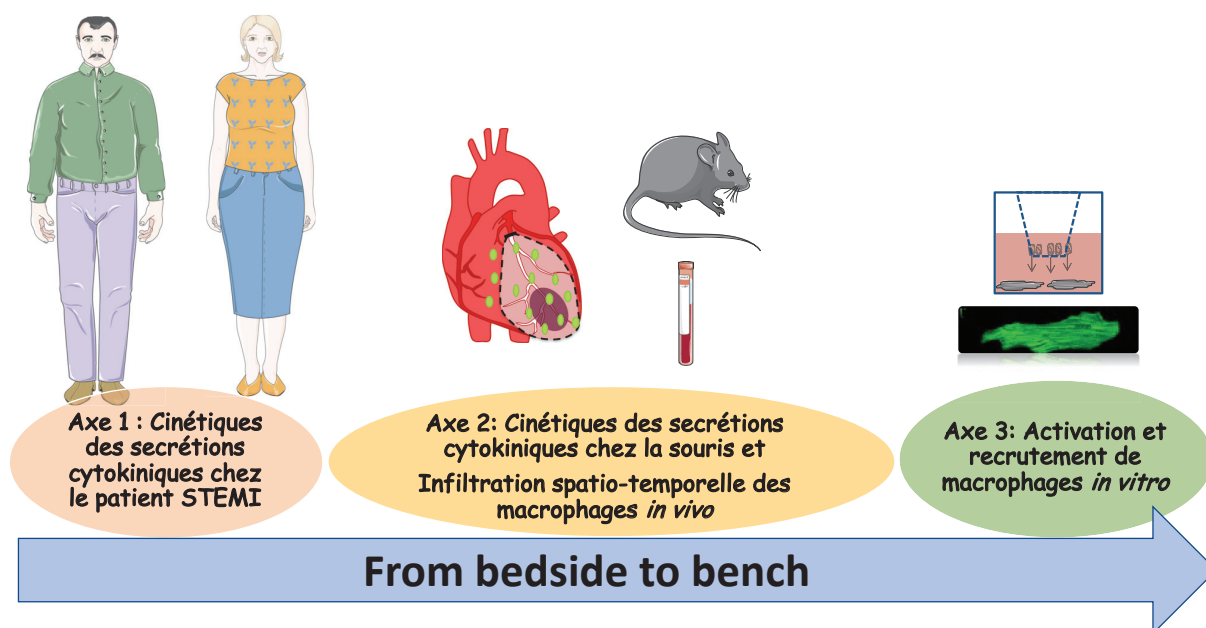


Figure 9 : Axes de travail de la thèse : Ma thèse est divisée en trois grands axes de travail, AXE 1 : étude des sécrétions cytokiniques chez le patient STEMI, AXE 2 : étude des sécrétions cytokiniques chez la souris et mesure *in vivo* de l'infiltration de macrophages post infarctus, AXE 3 : évaluation de l'activation et du recrutement de macrophages par les cardiomyocytes *in vitro*.

Ces travaux de thèse sont donc organisés en trois axes qui ont été menés de front.

AXE 1 : Cet axe a pour but de déterminer la cinétique de sécrétion de nombreuses cytokines d'intérêt dans le sérum de patients STEMI de la cohorte HIBISCUS. Nous bénéficions dans cette cohorte de cinq temps de prélèvements sanguins à l'admission (H0), quatre heures (H4), vingt-quatre heures (H24), quarante-huit heures (H48) et un mois (M1) après l'admission. La corrélation avec les valeurs cliniques nous permettra d'identifier les cytokines jouant un rôle sur le pronostic des patients. Déterminer les cinétiques nous permettra de mieux comprendre les séquences de sécrétions de ces cytokines, ce qui, d'un point de vue thérapeutique apporte une connaissance supplémentaire qui permettrait d'affiner les fenêtres de traitement pour chacune des cytokines d'intérêt.

AXE 2 : Ce second axe basé sur un modèle pré-clinique d'infarctus du myocarde, nous permettra d'établir précisément la cinétique spatio-temporelle de l'infiltration des macrophages durant la phase très précoce, dans le cœur infarcté. En réponse à l'infarctus, l'infiltration de macrophages dans le cœur est décrite à partir du jour 1 de reperfusion, mais n'est pas décrite précisément dans les premières 24 heures. Notre hypothèse est que ce recrutement des macrophages est initié plus rapidement que ce qui décrit dans la littérature

et que cette infiltration pourrait jouer un rôle important dans la régulation de la balance inflammatoire. Ce second objectif s'appuie sur une méthode novatrice de transparisation d'organe. Cette méthode développée initialement dans le cerveau, a été adaptée pour l'étude du cœur. La première année de ma thèse a porté sur la finalisation de la mise au point de la méthode de transparisation, ainsi que la mise au point du protocole d'immunomarquage. Cet axe nous permet de déterminer à la fois la cinétique temporelle de l'infiltration des macrophages dans le cœur en réponse à un infarctus grâce aux différents temps de prélèvement, et à la fois la cinétique spatiale grâce à l'imagerie trois dimensions du cœur entier. Le sérum des animaux, prélevé à différents temps de reperfusion nous permettra de doser les sécrétions cytokiniques dans les 24 premières heures suivant l'infarctus. Une analyse de la corrélation de l'infiltration des macrophages avec les sécrétions cytokiniques sera réalisée afin d'affiner les phases inflammatoires dans le cœur durant les 24 premières heures. Enfin, nous évaluerons la modulation du recrutement précoce des macrophages comme cible thérapeutique.

AXE 3 : Dans ce troisième axe, une approche *in vitro* nous aidera à déterminer si les cellules résidentes cardiaques, notamment les CMA, participent au recrutement précoce de macrophages et donc s'ils peuvent constituer une potentielle cible thérapeutique future.

La combinaison du développement de nouvelles techniques et d'une approche translationnelle permettent de mieux comprendre les cinétiques inflammatoires lors de la phase très précoce de l'infarctus du myocarde.

Matériel et méthodes

1. Caractéristiques des Animaux

Des souris C57Bl/6J (Charles River®) âgées de 8 à 12 semaines sont hébergées dans une animalerie au sein du laboratoire où la température est contrôlée à 23°C, avec un cycle de lumière : 12 heures de jour et 12 heures de nuit. Les souris ont un accès libre à l'eau et la nourriture (Standard Diet / SAFE®). Toutes les procédures sont réalisées en accord avec les principes et les recommandations de la convention Européenne pour la protection des animaux de laboratoire et ont été approuvées par le comité éthique de l'université Claude Bernard Lyon 1 pour l'expérimentation animale (N° dossier : 2018032216064965).

2. Modèles cellulaires

2.1. Cultures primaires de cardiomyocytes de souris

Le protocole d'isolation des CMA est adapté du protocole développé par O'Connell et ses collaborateurs²²⁹. Brièvement, les souris sont héparinées avec 50 µl d'héparine à 5000 IU/ml par injection intrapéritonéale 10 minutes avant l'expérience. Avant de prélever le cœur, les souris subissent une dislocation cervicale puis le cœur est prélevé et monté sur une canule par l'aorte. Cette canule est installée sur une colonne de dissociation et, l'organe est ensuite lavé avec du milieu de perfusion sans calcium pendant trois minutes. L'enzyme de digestion, la collagénase de type II, est ensuite perfusée dans le cœur pendant 2 minutes 30. Puis 15 µL de CaCl₂ à 100 mM (40µM de concentration finale) sont ajoutés dans la solution avec l'enzyme. Le cœur est perfusé avec cette solution durant 5 minutes 30. Toutes les solutions sont maintenues à 37°C. A la fin de la perfusion, le cœur est récupéré dans une boîte de Pétri et les oreillettes sont retirées. Les deux ventricules sont coupés en morceaux puis mis dans une solution de collagénase de type II avec CaCl₂. Des allers-retours à la pipette sont effectués afin de terminer la dissociation des CMA. Du milieu appelé « Stopping Buffer (SB) » est ajouté sur les CMA afin d'arrêter l'action de la collagénase. Ce milieu est composé du milieu de perfusion contenant du FBS à 10% et du calcium 12.5µM. Le protocole se poursuit avec les remontées

en calcium. Cette étape consiste à réintroduire du calcium progressivement dans le milieu des CMA. A la fin de la dissociation, la suspension de CMA est centrifugée pendant 3 minutes à 20 g. Puis une succession de centrifugations avec les mêmes réglages aura lieu :

- 1^{ère} solution : 10 ml de SB + 200 mM de Na-ATP
- 2^{ème} : 10 ml de SB + 100 μ M de CaCl₂
- 3^{ème} : 10 ml de SB + 400 μ M de CaCl₂
- 4^{ème} : 10 ml de SB + 900 μ M de CaCl₂

A cette dernière étape, les CMA sont placés dans du milieu complet (DMEMF12) puis la concentration en protéines totales est dosée par la technique de Lawry. Le comptage des CMA n'étant pas possible en raison de leur taille, nous avons standardisé les expériences en fonction de la concentration en protéines totales (le dosage protéique étant réalisé avec la méthode de Lowry). Les CMA sont ensuiteensemencés dans du milieu complet, ou du milieu d'hypoxie (tyrode) à une concentration de 1mg/ml avant de débiter la séquence.

2.2. Culture primaire de macrophages murins issus de la moelle osseuse

La mise en culture des macrophages est réalisée à partir de la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse (BMDM : Bone Marrow Derived Macrophages). Rapidement, les tibias et fémurs de la souris sont prélevés et placés dans un tube 50ml contenant du PBS (Phosphate Buffer Saline). Puis les os sont plongés rapidement dans l'alcool et les muscles retirés délicatement. L'extrémité des os est alors coupée et une aiguille de 26G y est insérée. La moelle osseuse est alors retirée de l'os en injectant du milieu RPMI. Après centrifugation des cellules de la moelle osseuse 10 minutes à 1000 RPM, les cellules sont resuspendues dans du RPMI complet contenant 25ng/ml de MCSF (Macrophage Colony Stimulating Factor) à une concentration de 300 000 cellules par ml.

2.3. Protocole d'hypoxie-réoxygénation in vitro

Dans le but de se rapprocher *in vitro* du stress observé *in vivo* lors de l'infarctus du myocarde, les cellules peuvent être soumises à un stress d'hypoxie-réoxygénation (HR), qui consiste à priver les cellules de nutriments et d'oxygène pendant un temps déterminé au préalable. Les

différents types cellulaires aux préalable mis en culture dans une boites 12 puits sont soumises à une séquence d'hypoxie de 1H30. Ce protocole a été pré-établi au sein du laboratoire afin d'optimiser les effets de l'hypoxie et de la reperfusion sur les cellules. Durant cette séquence, 500µL de milieu Tyrode, dépourvu en nutriments est ajouté à chaque puits et les cellules sont placées dans un incubateur à hypoxie (Eppendorf - Galaxy 48R). La consigne de 0.5% d'O₂ est atteinte en injectant de l'azote dans l'incubateur. Après la séquence d'hypoxie, les cellules sont replacées dans un incubateur avec une concentration en oxygène atmosphérique et 5% de CO₂, 1.5mL de milieu complet (DMEMF12 complété avec 10% de sérum de veau fœtal, et 1% de pénicilline streptomycine) est ajouté aux cellules.

Dans les conditions HR, le milieu d'hypoxie est conservé et le milieu de réoxygénation est ajouté en supplément. Dans les conditions appelées réoxygénation, le milieu d'hypoxie est retiré et remplacé par le milieu de réoxygénation (**Figure 10**).

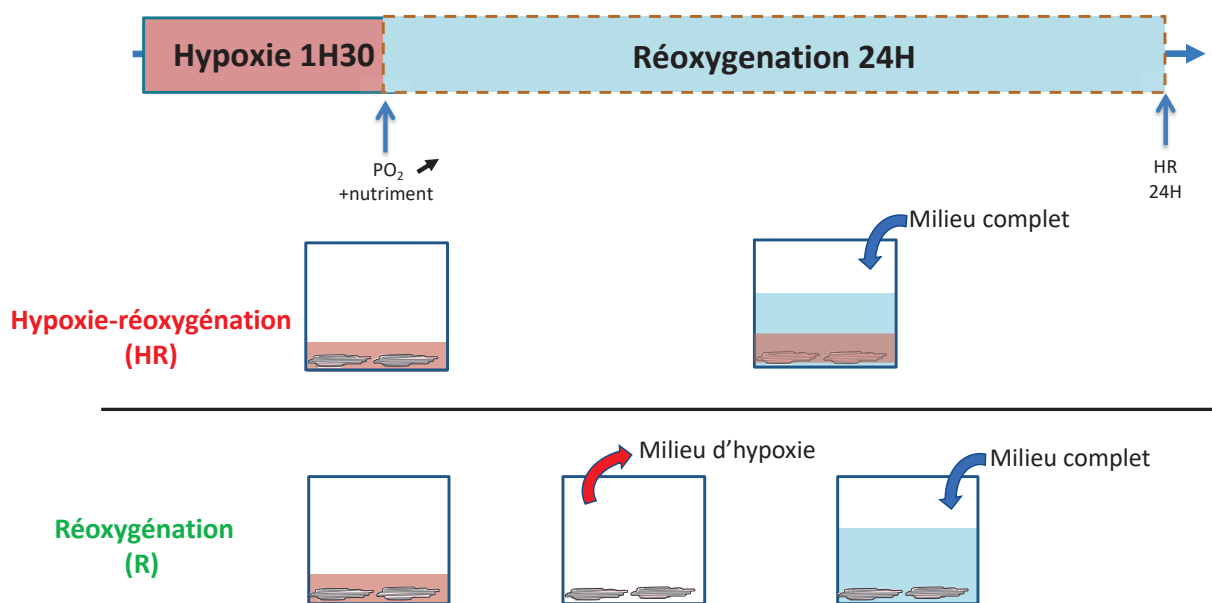


Figure 10 : Protocole *in vitro* d'hypoxie-réoxygénation (HR) : les CMA sont soumis à une séquence d'hypoxie de 1h30 suivie d'une réoxygénation de 24H. Deux conditions expérimentales sont réalisées : une condition HR versus une condition appelée réoxygénation, où le milieu hypoxique a été éliminé.

2.4. Protocole de différenciation des macrophages

Les macrophages sont stimulés par les différents traitements durant 24H. Afin de différencier les macrophages en macrophages anti-inflammatoires, les cellules sont stimulées avec de l'IL-4 à une concentration de 20ng/ml. Pour l'induction des cellules en macrophages de type pro-

inflammatoires, les cellules sont stimulées avec 100ng/ml de LPS combiné à 100 ng/ml d'IFN γ . Ces protocoles de différenciation des macrophages permettent d'obtenir les deux types principaux de macrophages. Cette étape est une étape préliminaire à l'évaluation du taux de recrutement des macrophages. La différenciation nous permettra alors de distinguer quel type de macrophage est préférentiellement recruté par les cellules résidentes.

2.5. Modèle *in vitro* d'évaluation du taux de recrutement des macrophages

Afin de déterminer la cinétique de recrutement des macrophages par les cellules résidentes cardiaques, un modèle *in vitro* a été développé. Les cellules résidentes sont soumises à une séquence d'hypoxie de 1h30, et au moment de la reperfusion, un insert poreux contenant les macrophages préalablement marqués au PKHRed est ajouté dans le puits. L'utilisation d'un insert poreux permet une communication paracrine entre les deux types cellulaires. La taille des pores de 8 μ m permet aux macrophages de migrer s'ils sont attirés par les cellules au fond du puit par chimiotactisme (**Figure 11**).

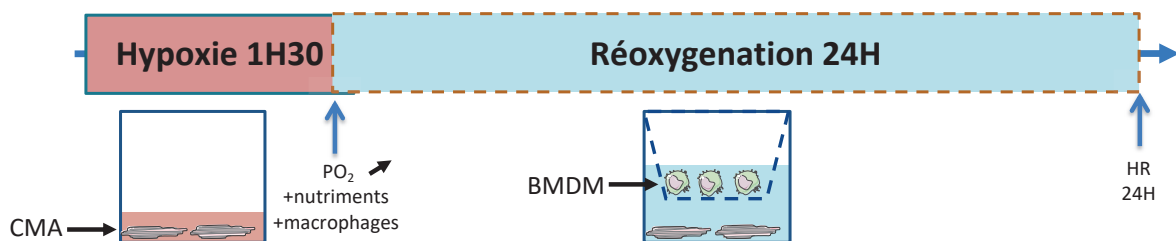


Figure 11 : Protocole de recrutement de macrophages *in vitro* : Les CMA sont soumis à 1H30 d'hypoxie. Au moment de la réoxygénation, les inserts contenant les macrophages sont ajoutés dans les puits contenant les CMA hypoxiés pendant 24H. CMA=cardiomyocytes, BMDM=macrophages dérivés de la moelle osseuse.

Avant la mise en co-culture, les macrophages cultivés sur les inserts poreux (Millipore MCEP12H48) sont marqués avec le colorant vital PKHRed, dilué au 1/5000^{ème} dans le diluant fournis durant 3 minutes à 37 degrés, puis la solution est lavée trois fois avec du PBS. Ce marquage permet alors de discriminer les macrophages des autres cellules et de faciliter leur comptage au microscope.

Le nombre de macrophages ayant été attirés par chimiotactisme au fond des puits par les cellules résidentes est mesurée avec l'utilisation du microscope confocal. Au moment de la

reperfusion, la plaque de cellules est placée sous le microscope confocal dans une enceinte soumise à une température de 37°C, contenant 5% de CO₂. Les macrophages recrutés au fond du puits par les cellules résidentes sont identifiés sur la base de l'émission de fluorescence suite à l'excitation au laser diode 642 (**Figure 12**). Trois images sont collectées dans chaque puits toutes les trente minutes sur le plan focal des cellules résidentes. Chaque condition est également réalisée en triplicate.

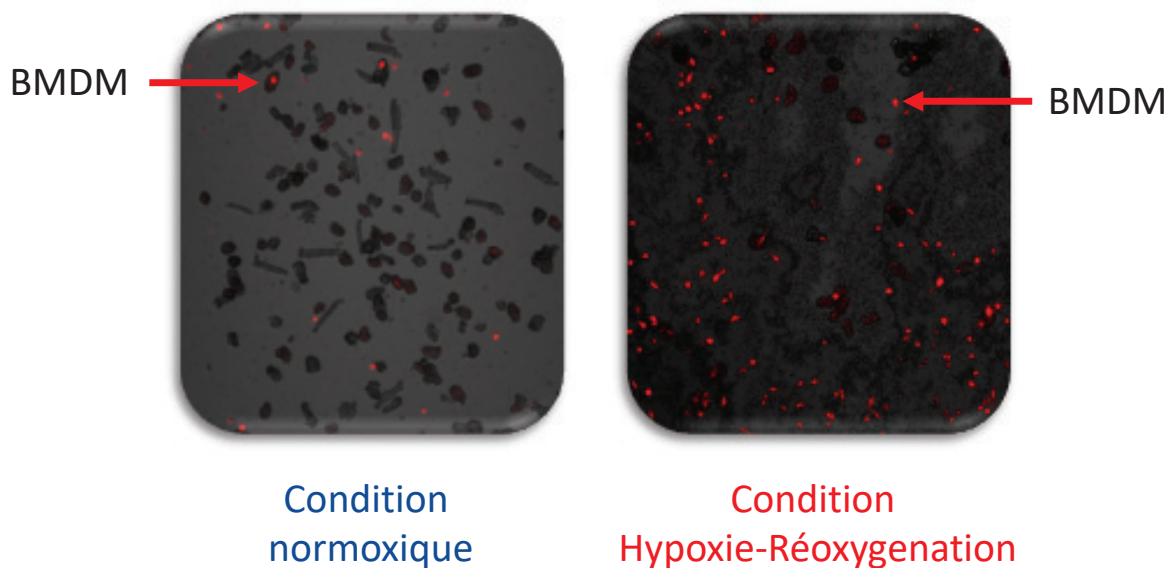


Figure 12 : Quantification des macrophages recrutés par les cardiomyocytes : Image représentative de la quantification par microscopie confocale des macrophages recrutés par les cardiomyocytes en condition normoxique et en condition HR. Le marquage avec le colorant vital PKHred permet de discriminer facilement les macrophages en rouge et facilite donc leur comptage.

2.6. Modèle d'activation des macrophages par le milieu conditionné hypoxie-réoxygénation des cardiomyocytes

Afin d'étudier l'activation des macrophages par les cellules résidentes, nous avons utilisé la technique de milieu conditionné. Les macrophages sont alors stimulés avec le milieu conditionné des CMA soumis à la séquence d'HR. Afin d'apporter suffisamment de nutriments aux macrophages durant cette stimulation, les milieux conditionnés de cellules résidentes sont dilués au demi dans du milieu complet.

Pour déterminer l'activation des macrophages par le milieu conditionné de ces cellules, leurs phénotypes est déterminé par cytométrie en flux et par mesure des sécrétions cytokiniques après 24H de stimulation (**Figure 13**).

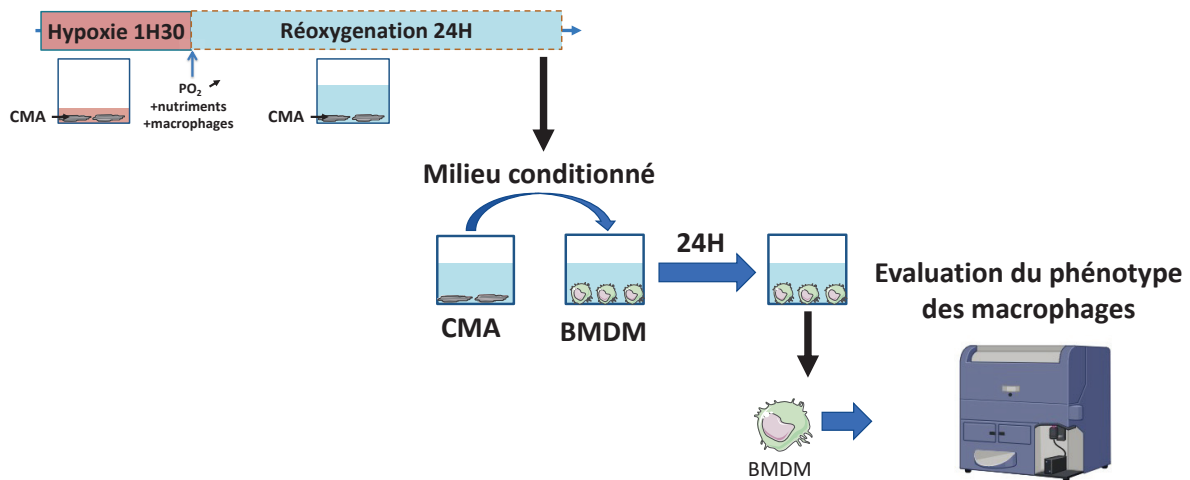


Figure 13 : Activation des macrophages par le milieu conditionné des cardiomyocytes. Les CMA sont soumis à la séquence HR (H1H30 ; R24H). A la fin de cette HR, le milieu ainsi conditionné est prélevé et mis au contact des macrophages en culture.

2.7. Caractérisation phénotypique des macrophages par cytométrie en flux.

Après la stimulation des macrophages par le milieu conditionné des CMA, le phénotype de ceux-ci sont déterminés par cytométrie en flux. A la fin de la stimulation, les macrophages sont décollés en utilisant une solution d'acutase (Gibco™ 13151014) puis transférés dans des tubes de cytométrie. Après une première centrifugation, les cellules sont lavées dans du PBS puis incubées 10 minutes à 4°C avec la solution de blocage des fragments Fc (Miltenyi biotec 130-092-575) diluée au 1/10eme dans du PBS afin d'éviter le marquage non spécifique. Après ces 10 minutes, les cellules sont centrifugées puis incubées 30 minutes à 4°C avec la solution d'anticorps ou la solution contenant les contrôles isotypiques pour chaque marqueur dilués dans une solution de PBS/BSA 0.5% (Bovine Serum Albumin) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Tableau des différents anticorps utilisés pour le phénotypage des macrophages après incubation avec le milieu conditionné des cardiomyocytes.

Anticorps	Contrôle isotypique	Dilution	Cible
Anti-F4/80-PE (Miltenyi biotec)	REA control-PE (Miltenyi biotec)	1/10	Macrophages
Anti-CD-206-AF488 (Biolegend)	Rat IgG2a-AF488 (Biolegend)	1/10	Macrophages anti- inflammatoires
Anti-CD86-APC (Miltenyi biotec)	rat IgG2b-APC (Miltenyi biotec)	1/10	Macrophages pro-inflammatoires

Après cette incubation, 1ml de PBS/BSA 0.5% est ajouté à chaque tube et ceux-ci sont centrifugés, les cellules sont resuspendues dans 500µL de PBS avant l'acquisition au cytomètre. Les analyses de cytométrie sont réalisées avec le logiciel Flowlogic (Miltenyi Biotec).

2.8. Traitement des cellules avec l'inhibiteur pharmacologique de la voie de signalisation STAT3

La protéine STAT3 est une protéine jouant un rôle central dans la cardioprotection via la voie de signalisation JAK/STAT. L'activation de cette voie entraîne la sécrétion de cytokines inflammatoires tels qu'IL-6 et IL-10. Afin d'identifier le rôle de la voie STAT3 dans les sécrétions cytokiniques nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de STAT3, STATTIC (Sigma S7946). La dose optimale de 2.5 µM a été déterminée, par western blot, par l'évaluation du niveau de phosphorylation de STAT3. D'autre part, la toxicité de l'inhibiteur sur les modèles CMA et BMDM a été mesurée par quantification de la mortalité par marquage à l'iodure de propidium. Cette mesure a été réalisée par cytométrie en flux. Le traitement est appliqué aux CMA durant la séquence d'HR (**Figure 14A**), ou aux macrophages en parallèle de leurs activations (**Figure 14B**).

2.9. Traitement des milieux conditionnés avec anticorps neutralisants

Afin de déterminer la contribution des cytokines IL-6 et MCP-1 dans le recrutement et l'activation des macrophages, nous avons utilisé des anticorps neutralisants dirigés contre ces deux cytokines dans les milieux conditionnés des CMA. Ces anticorps ont été utilisés à une concentration de 2,5 µg/ml pour l'anti MCP-1 (R&D Biosystems AF-479-NA) et à une concentration de 0,3 µg/ml pour l'anti IL-6 (R&D Biosystems AF-406-NA), après détermination des doses optimales d'inhibition par tests ELISA pour chacune des cytokines. Le traitement est appliqué aux CMA durant la séquence d'HR (Figure 14A), ou aux macrophages en parallèle de leurs activations (Figure 14 B).

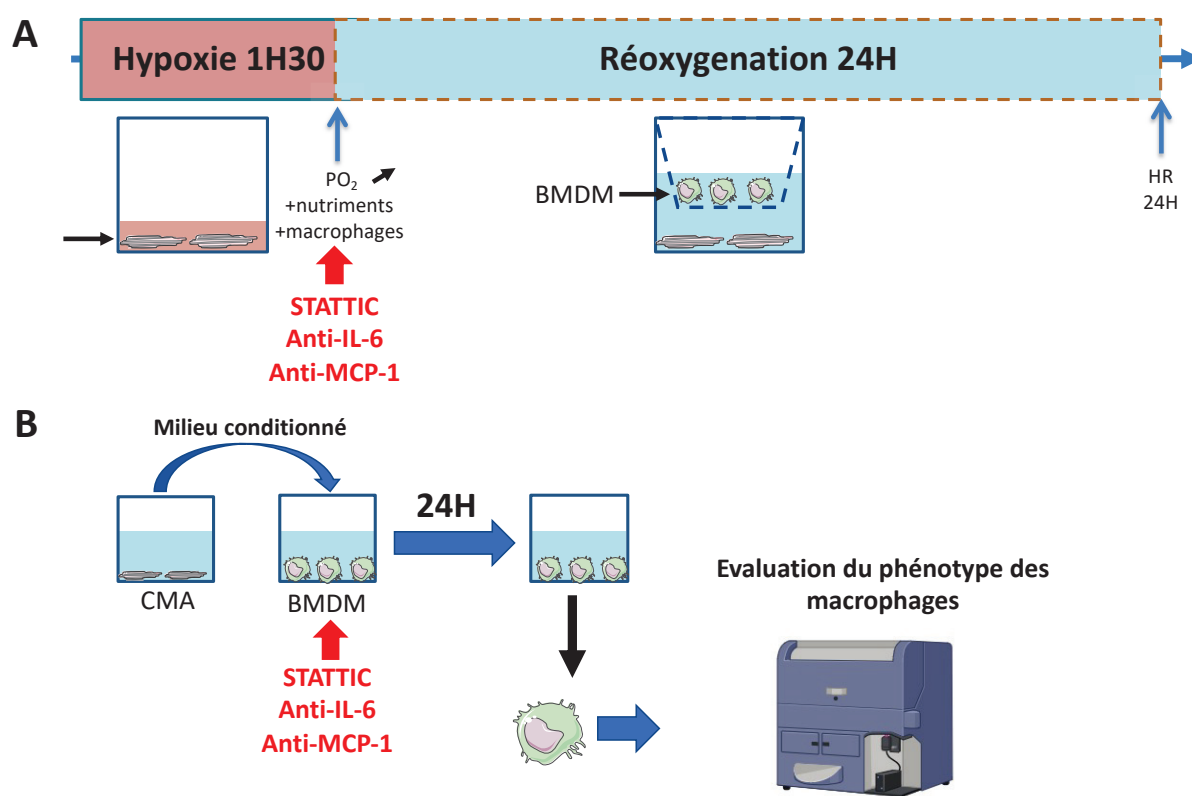


Figure 14 : Protocole de traitement des cellules avec STAT1C et les anticorps neutralisants anti-MCP-1 et anti-IL-6 : Concernant l'effet des traitements sur le recrutement par les CMA (A), les anticorps neutralisants anti-MCP-1 et anti-IL-6 ainsi que l'inhibiteur STAT1C sont ajoutés en post-conditionnement, au moment donc du changement de milieu pour la réoxygénation. Pour les expériences de phénotypage phénotype des macrophages après l'incubation avec le milieu conditionné (B), les anticorps neutralisants et l'inhibiteur STAT1C sont ajoutés au même moment que le milieu conditionné sur les BMDM.

3. Modèle *in vivo* d'infarctus du myocarde

Ce modèle murin d'infarctus du myocarde consiste en une occlusion transitoire de 45 minutes de la principale coronaire irriguant le ventricule gauche cardiaque : l'artère interventriculaire antérieure.

L'animal reçoit une pré-médication par injection de buprénorphine (0,075mg/kg) en sous-cutanée, suivi d'une anesthésie par xylozine (5mg/kg) et kétamine (100mg/kg) en injection intrapéritonéale. Puis une infiltration locale sous-cutanée de lidocaïne (5mg/kg maximum) est réalisée. L'animal est ensuite placé sous respiration artificielle. L'accès au cœur se fait par voie intercostale. Le péricarde est ouvert puis un fil de suture 8/0 est placé autour de l'artère interventriculaire antérieure. L'ischémie est alors réalisée en serrant ce fil de suture. Elle sera maintenue 45 minutes. Après 45 minutes d'ischémie, le fil est desserré pour permettre la reperfusion cardiaque, mais laissé en place, ouvert, sous l'artère. Le plan musculaire est suturé et le vide est fait dans la cage thoracique. La peau de l'animal est ensuite suturée et une fois bien réveillé, l'animal est extubé et placé dans une couveuse chauffée et enrichie en O₂.

Pour le protocole de transparenisation : afin de prélever le cœur avant l'ischémie (0H), après 1 (1H), 3 (3H), 6 (6H), ou 24 heures (24H) de reperfusion, l'animal est de nouveau anesthésié avec le même mélange que celui qui lui a été administré la lors de la première anesthésie. Un prélèvement sanguin est alors réalisé. Une incision antéro-latérale du coup (au niveau de la plaie déjà existante), suivi d'une dilacération des tissus nous permet d'avoir un accès à la carotide droite. La carotide est ensuite canulée, le cathéter étant relié à un pousse seringue contenant du PBS froid. Une surdose anesthésique est alors administrée à l'animal, entraînant la mort cérébrale de celui-ci. Rapidement, une laparotomie est réalisée. Au moment où le PBS est perfusé, la veine cave inférieure est sectionnée. Une perfusion au paraformaldéhyde (PFA) 4% est ensuite réalisée. Le cœur est ensuite prélevé et placé dans le PFA 4% pour au minimum 24 heures (**Figure 15**).

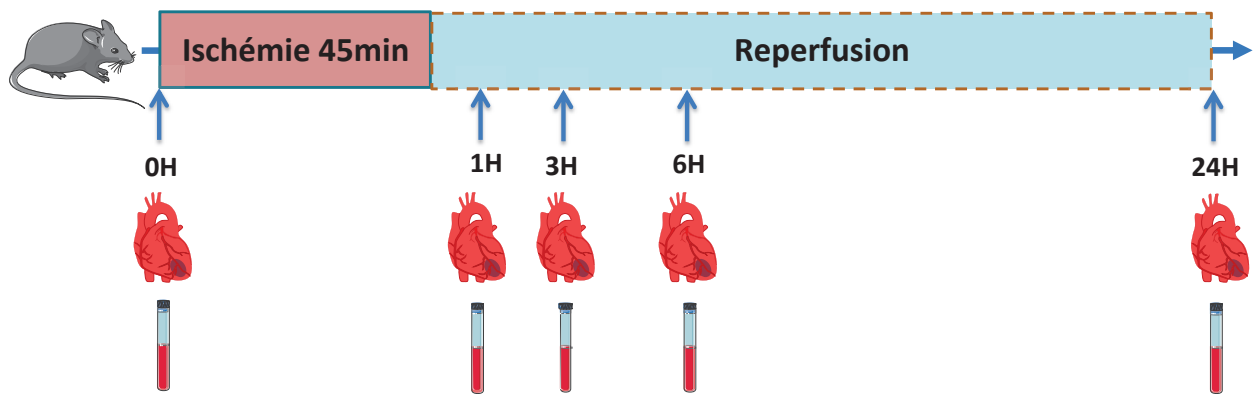


Figure 15 : Protocole d'ischémie-reperfusion in vivo chez la souris. Les prélèvements sanguins ainsi que les prélèvements des cœurs sont effectués aux différents temps de la séquence d'ischémie-reperfusion : 0H, 1H, 3H, 6H, 24H.

Pour le protocole d'évaluation de la taille d'infarctus, le traitement avec l'inhibiteur de la voie de signalisation STAT3 est injecté cinq minutes avant la reperfusion. Après l'ensemble de la procédure chirurgicale, l'animal est de nouveau anesthésié à 24H. L'artère est re-occluse et une solution de colorant bleu Unisperse 1à% (Ciba-Geigy, Hawthorne) est injectée à la dose de 0,5mg/kg par la veine cave inférieure. L'utilisation de ce colorant va permettre de marquer la zone perfusée du cœur. Le cœur est ensuite prélevé et les oreillettes, le ventricule droit et l'aorte sont retirés. Le ventricule gauche est sectionné parallèlement au sillon auriculo ventriculaire en cinq tranches transverses. Toutes les tranches sont pesées et les quatre premières tranches depuis l'apex du cœur sont photographiées afin de permettre la mesure de de l'aire à risque (aire non colorée en bleu). Les tranches sont ensuite incubées durant 20 minutes avec une solution de Chlorure de Triphényltétrazolium 1% (TTC) à 37°C. Le myocarde viable apparaît alors de couleur rouge brique tandis que le myocarde nécrosé apparaît jaune pâle. Les tranches de cœur sont de nouveau photographiées afin de mesurer la zone nécrosée. Les zones à risque et zone nécrosées sont quantifiées par planimétrie à l'aide du logiciel SIGMApro. L'aire à risque et l'aire nécrosée sont rapportées au poids du ventricule gauche. La taille d'infarctus sera exprimée par le rapport de la taille de la zone nécrosée/ zone à risque. Les groupes Sham subissent l'ensemble de la procédure chirurgicale sans ligature de l'artère.

4. Développement de la méthode de transparençation du cœur

Les avancées technologiques au niveau de l'imagerie ont permis d'acquérir des données de plus en plus précises. Cependant, les ondes lumineuses ne peuvent pas se déplacer de manière linéaire, en raison du dioptre créé par les différentes interfaces (eau, tissus, verre) qui se trouvent sur le chemin lumineux. Ces interfaces vont induire un phénomène de réfraction et de diffraction des photons en fonction de leurs indices de réfraction. Ce phénomène, également appelé diffusion dynamique de la lumière, est responsable des limites des techniques d'imagerie actuelle, notamment sur la profondeur d'acquisition. Dans les cellules, deux types de solvants sont observés, l'eau et les lipides des membranes, créant à chaque interface un dioptre conduisant à la diffraction des photons. Cette composition cellulaire limite l'imagerie des tissus dans leurs volumes complets par les techniques d'imagerie classiques²³⁰. Le développement des méthodes de transparençation d'organe, appelées « clearing », ont permis de pallier, en partie, à cette contrainte. Les premiers écrits de transparençation d'organe remontent à 1914²³¹. Mais ce n'est que très récemment que différentes techniques de transparençation sont développées avec un but commun, améliorer la pénétration des photons dans le tissu. Un très grand nombre de protocoles de transparençation d'organes sont développés mais ils peuvent être regroupés dans différentes grandes familles :

La transparençation utilisant des solvants : Cette technique a pour but de déshydrater les tissus dans différents solvants, d'extraire les lipides afin d'homogénéiser les indices de réfraction. Différents protocoles sont décrits tels que les protocoles utilisant différents bains benzyl alcool/ benzyl benzoate (BABB)²³², la technique 3DISCO (3D Imaging of Solvent Cleared Organ)²³³, ou encore la méthode DBE (DiBenzyl Ether)²³⁴. Le principal avantage de cette technique est la rapidité de transparençation. Par ailleurs, bien qu'améliorant fortement la diffusion dynamique de la lumière, ces protocoles entraînent souvent une dégradation des protéines et des acides nucléiques²³⁵. La préservation de la fluorescence des marquages est également limitée dans le temps²³⁶ bien que des adaptations récentes de ces protocoles semblent avoir résolu à ce problème²²⁴. L'inconvénient majeur de cette approche de transparençation est bien entendu l'utilisation de solvants toxiques ou corrosifs, en grande

quantité, et impliquant l'utilisation d'objectifs spécifiques, une manipulation des tissus sous hottes chimiques, et donc une adaptation majeure des systèmes d'imagerie.

Une seconde technique de transparençation est la technique de transparençation en solution aqueuse. L'immersion des tissus dans une solution aqueuse avec un meilleur indice de réfraction permet ici la transparençation. Cependant cette méthode est longue et n'est pas applicable à de gros volume. Elle est donc couramment utilisée pour la transparençation d'organoides ou de culture cellulaire en 3 dimensions²³⁷, ou de tranches d'organes²³⁸.

La méthode CUBIC (Clear, Unobstructed Brain Imaging Cocktails and computational analysis) et ses dérivés forment une troisième famille de transparençation. Cette méthode initialement développée par Suzuki *et al*²³⁹. est basée sur l'élimination des lipides à l'aide de détergents et de solution avec une concentration en urée très élevée dans un premier bain, puis un bain dans une solution très concentrée en urée et en sucrose. L'utilisation de cette méthode est simple, avec une bonne performance de transparençation mais est très chronophage. En fonction de la taille de l'échantillon, les deux bains successifs sont d'une durée d'une à deux semaines minimums. L'application à des échantillons de volumes importants tels que le cœur est peu envisageable²⁴⁰.

La transparençation active combinant l'utilisation d'hydrogel et de détergents est la dernière grande famille de transparençation. Cette méthode fixe les protéines et les acides nucléiques dans leurs conformation grâce au maillage d'un hydrogel, puis les lipides sont éliminés du tissu grâce à l'utilisation de détergents. Cette méthode comprend la méthode CLARITY (Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/in situ-hybridization compatible Tissue hYdrogel) et ses dérivés. Cette méthode possède d'excellente performance de transparençation et est compatible avec les méthodes d'immunohistochimie^{236,241}. Deux approches sont alors possibles après la polymérisation du gel. Soit une transparençation passive du tissu par immersion dans une solution détergente, soit une transparençation active grâce à une solution détergente et un champ électrophorétique. La transparençation active est donc plus rapide mais nécessite un équipement particulier. Nous avons pour cette thèse choisie d'utiliser cette méthode de transparençation. Cette méthode est divisée en plusieurs étapes présentées dans la **Figure 16** et permet de passer d'environ 200µm de profondeur d'acquisition pour le cœur à plus de 2mm.

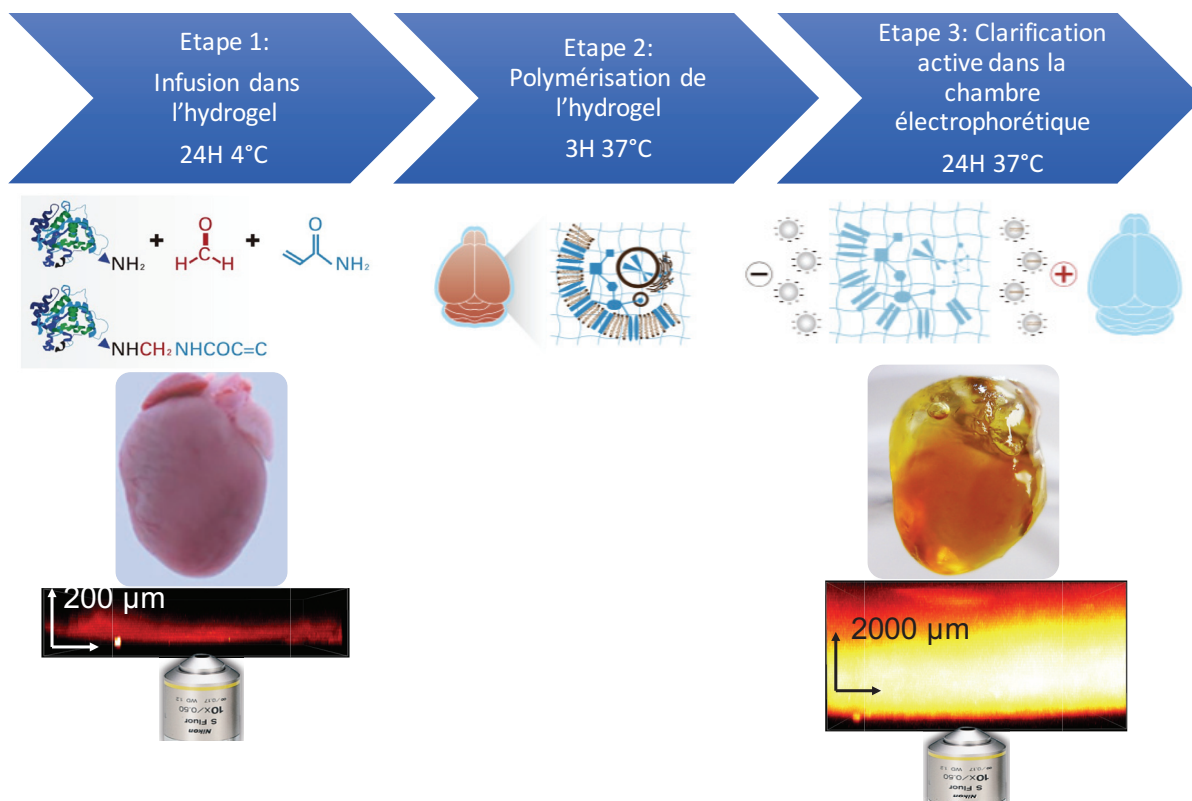


Figure 16 : Protocole de transparation d'organe utilisant la technique de X-Clarity : Le cœur est incubé dans un hydrogel qui pontent les biomolécules après polymérisation 3H à 37°C. Le cœur est ensuite transparisé de façon active grâce à un champ électrophorétique et une solution détergente contenant du SDS. Cette transparation permet d'améliorer la pénétration des photon pour l'imagerie en trois dimensions.

Après 24H dans la PFA, le cœur va suivre le protocole de transparation. Ce protocole initialement développé pour des études sur le cerveau^{242,243} a été adapté au sein du laboratoire pour le cœur. Brièvement, le cœur est incubé 24H dans une solution composée d'acrylamide concentré à 4% et d'agent pontant VA-044 concentré à 0.25%, dilués dans du PBS 1X. Le lendemain, la solution contenant le cœur est placée sous agitation à 37°C dans un bain marie pour 3H, afin de polymériser le gel. Le gel d'acrylamide va alors ponter les protéines et les acides nucléiques dans leurs conformations natives²³⁵. Après cette étape de polymérisation, l'organe est placé durant 24H dans la solution de transparation.

Le système X-Clarity© de la société LOGOS Biosystem est alors utilisé pour « transparisé » l'organe de manière active durant 24H. Le cœur est placé dans une chambre électrophorétique contenant la solution de clearing majoritairement composée de SDS. Le SDS va permettre de micéliser les lipides et le champ électrophorétique va permettre de retirer les

lipides de l'organe. A la fin de la transparisation, le cœur est placé dans la solution de conservation contenant du PBS 0.1% Triton, 0.01% azide de sodium durant un jour.

Afin d'évaluer l'infiltration des macrophages dans l'organe à chaque temps de la séquence, nous avons développés durant cette thèse un protocole d'immunomarquage sur le cœur transparisé présenté dans la **Figure 17**.

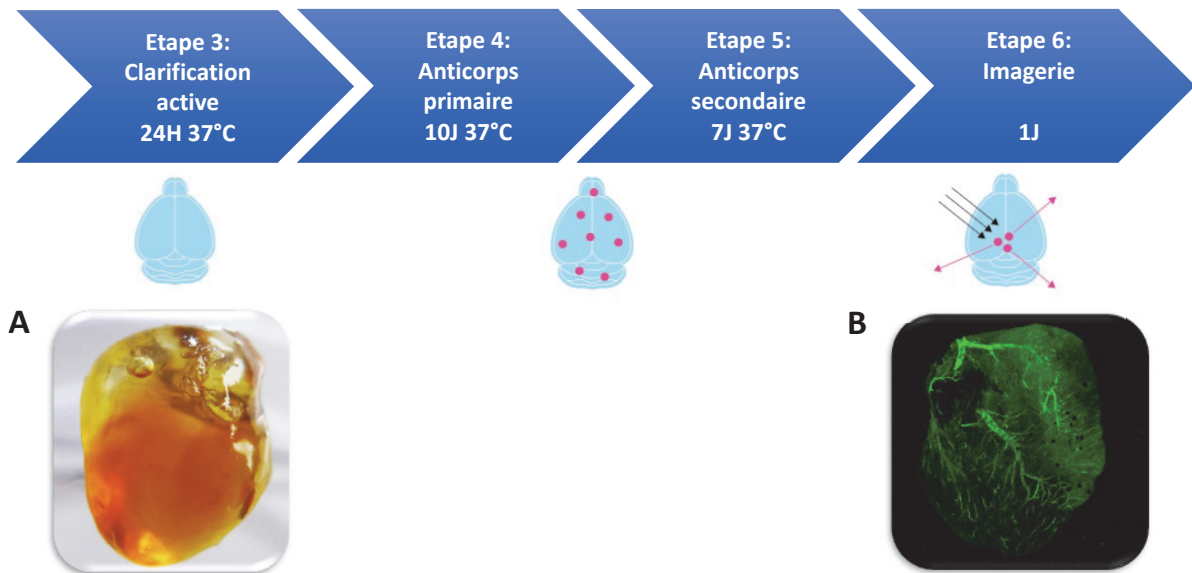


Figure 17 : Protocole d'immunomarquage sur cœur entier après transparisation : Schéma représentatif du protocole d'immunomarquage sur cœur entier après transparisation. Images représentatives de cœur non marqué (A) et de l'imagerie confocale d'un cœur marqué avec le marquage anti- α -smooth muscle actine afin de révéler la vasculature (B).

Ce protocole est divisé en deux étapes, avec une première incubation de 10 jours dans l'anticorps primaire. Les différents anticorps utilisés sont présentés dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Tableau des différents anticorps utilisés lors du protocole d'immuno-marquage sur cœur entier

Anticorps	Dilution	Référence	Cible
Rabbit monoclonal anti F4/80	1/100	Cell signaling 70076T	Macrophages
Rabbit polyclonal anti CD206	1/50	Abcam Ab64693	Macrophages anti-inflammatoires
Mouse monoclonal anti- α SMA	1/100	Abcam Ab7817	Vasculature : α -smooth muscle cell actin

Après ces dix jours d'incubation avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de conservation à 37°C sous agitation, trois lavages sont réalisés par centrifugation douce dans la solution de conservation. L'incubation avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome d'intérêt est ensuite réalisée durant sept jours à 37°C sous agitation. Le cœur est ensuite lavé comme à l'étape précédente et placé dans la solution de conservation jusqu'à la session d'imagerie.

5. Protocole d'imagerie des cœurs entiers en trois dimensions.

Avant toutes sessions d'imagerie, les cœurs sont plongés dans une solution X- Clarity™ Mounting solution (Logos Biosystems) visant à égaliser les indices de réfraction durant au minimum 2 heures. Cette solution à un indice de réfraction de 1.45. Ce procédé réduit la diffusion des photons en homogénéisant l'environnement entre le tissu et la solution, impliquant une augmentation de la transparence du cœur et donc une meilleure profondeur et résolution d'image. Deux sessions d'imagerie seront réalisées sur chacun des cœurs avec une imagerie au microscope confocal (**Figure 18A**) et une imagerie au microscope à feuillet de lumière (**Figure 18B**).

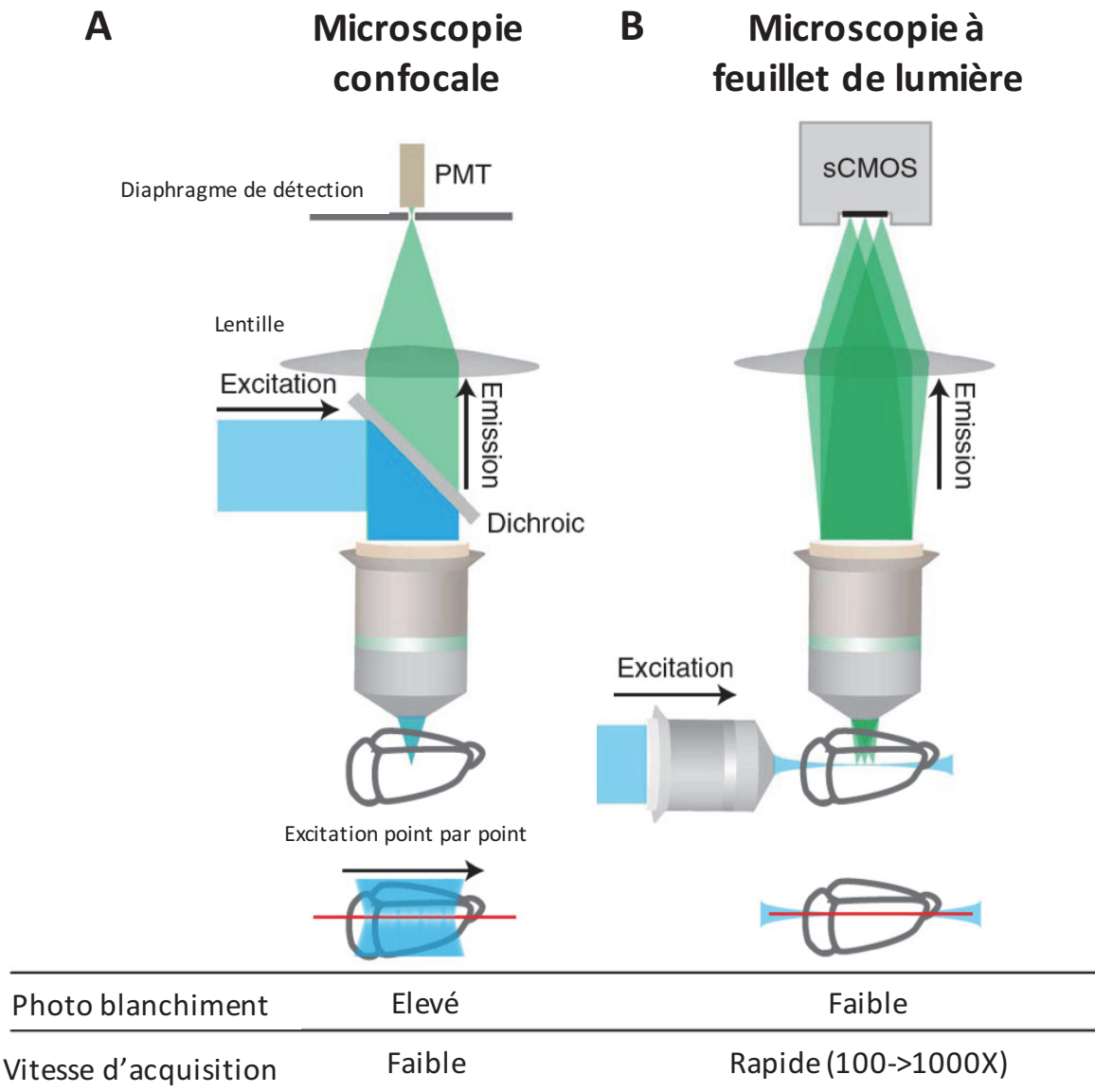


Figure 18 : Microscopie Confocale et à microscopie à feuillet de lumière : Schéma représentant les caractéristiques des techniques de microscopie confocale (A) et de microscopie à feuillet de lumière (B).

Une première imagerie est réalisée au microscope confocal, afin de vérifier la qualité de l'immunomarquage, et de faire une première évaluation du recrutement de macrophages dans la zone à risque en deux dimensions. Le microscope confocal (Nikon A1) est équipé d'une plateforme motorisée permettant une imagerie volumétrique en trois dimensions (x, y et z). Les cœurs transparisés sont placés dans un socle afin de les conserver immergés dans la solution. L'objectif 10X est utilisé et une mosaïque est réalisée avec chaque pas en Z de 10 µm. Quatre lasers d'excitation sont disponibles : diode 405nm (Bleu), argon 488-514nm (Bleu-vert), diode 561nm (Orange-rouge) et diode 642nm (Rouge profond). Cette technique de microscopie implique un balayage point par point du champ pour reconstruire l'image. Ceci

implique deux problèmes, le temps d'acquisition qui est très long et la dégradation rapide des échantillons par photo blanchiment. Par ailleurs, la pénétration en profondeur reste limitée²⁴⁴.

Le cœur entier est donc imagé avec une autre technique d'imagerie, la microscopie à feuillets de lumière. Cette technique permet d'illuminer un plan entier par une feuille de lumière, et la lumière émise est collectée avec un objectif suivant un axe perpendiculaire au plan de cette feuille. Cette technique permet d'accélérer grandement la vitesse d'acquisition, une augmentation de la profondeur d'acquisition, tout en réduisant le photo blanchiment des échantillons²⁴⁵. Le microscope à feuillet de lumière (Zeiss Z1) est équipé avec un objectif optique de détection 5X, et les échantillons sont excités avec un feuillet de 4µm d'épaisseur avec différentes longueurs d'onde (488 et 639nm). Le cœur est imagé selon l'axe transversal.

La reconstruction en trois dimensions des images ainsi que la quantification de l'infiltration des macrophages sont réalisées avec le logiciel AMIRA (Thermofisher).

6. Quantification des sécrétions de cytokines par la technique d'ELISA.

Les sécrétions cytokiniques, aussi bien dans le plasma de souris que dans le milieu conditionné des CMA sont quantifiées par la technique d'ELISA (Enzyme Like ImmunoSorbent Assay) en accord avec les recommandations des fabricants (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Tableau listant les Kit ELISA souris utilisés.

Cible	Référence
MCP-1	R&D biosystems DY479
IL-6	Invitrogen™ 88-7064-88

7. Évaluation des sécrétions cytokiniques dans la cohorte de patients HIBISCUS STEMI.

En parallèle de l'étude pré-clinique, une grande partie du travail de thèse est réalisé sur la mesure des sécrétions cytokiniques dans le sérum de patients de la cohorte HIBISCUS STEMI (CoHorte de patients pour Identifier les marqueurs Biologiques et d'Imagerie des événements Cardiovasculaires chez les patients présentant un infarctus du myocarde avec élévation du segment ST). Les patients inclus dans cette étude prospective interventionnelle sont des patients admis à l'hôpital Louis Pradel des Hospices Civils de Lyon pour tous types de STEMI. Tous les patients ont subi une reperfusion par angioplastie. Les patients sont tous soumis à une imagerie par résonance magnétique (IRM) cardiaque un mois après l'intervention afin de mesurer la taille d'infarctus et la fonction cardiaque. Cinq prélèvements sanguins sont réalisés chez le patient avec un prélèvement à l'admission (H0), après 4H (H4), 24H (H24), 48H (H48) et un mois (M1). Un dosage des différents marqueurs biologiques est également réalisé au centre de biologie de l'hôpital Louis Pradel. Cette bio banque permet le dosage d'un grand nombre d'acteurs de l'inflammation et permet d'établir leurs cinétiques durant le premier mois. La quantification dans le sérum de ces différents acteurs est réalisée par la technique d'ELISA en respectant le protocole fourni par les fabricants. Le recueil des données cliniques est réalisé par le Centre d'Investigation Clinique (CIC) de l'hôpital Louis Pradel. A ce jour, 251 patients avec un suivi complet ont été inclus. L'évaluation des cinétiques de sécrétions a été réalisée pour plusieurs protéines (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Tableau listant les kit ELISA humain utilisés pour évaluer les cinétiques de libération dans la cohorte HIBISCUS.

Cible	Référence
MCP-1	R&D biosystems DY279
IL-6	Invitrogen™ 88-7066-88
VCAM-1	R&D biosystems DY809
C-MeT	R&D biosystems DY358
HSP-70	R&D biosystems DY1663-05
Soluble TNFR1	R&D biosystems DY225
Soluble TNFR2	R&D biosystems DY226

8. Statistiques

L'ensemble des statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 9. Les résultats sont exprimés en valeurs moyenne \pm SEM (écart à la moyenne) ou en valeurs médianes avec écart inter-quartiles (IQR). Les comparaisons entre les groupes ont été réalisées en utilisant un test T Student pour les variables continues et un test de Fisher pour les variables non catégorielles. Les différences entre plusieurs groupes ont été évaluées avec un test non paramétrique de Kruskal-Wallis suivi par un test de Dunn pour les comparaisons multiples ou par un test de Šídák's. Les corrélations ont été réalisées avec le test de Spearman pour les valeurs de distribution non gaussienne et un test de Pearson pour les valeurs de distribution normale. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

Résultats

1. Évaluation de la cinétique des sécrétions d'IL6 et MCP-1 dans le sérum de patients STEMI

Afin d'améliorer la qualité de vie du patient, un suivi plus personnalisé visant à prévenir une mauvaise évolution post-infarctus peut être envisagé. Pouvoir discriminer précocement les patients qui souffriront de complications secondaires des patients présentant une bonne récupération est une piste intéressante.

La taille d'infarctus, mesurée par imagerie à résonance magnétique ou évaluée par la libération des marqueurs de souffrance cardiaque comme la troponine I, est un bon indicateur de la souffrance tissulaire et du pronostic à long terme mais n'est pas suffisant. La variabilité de la mesure de la fraction d'éjection ventriculaire gauche complique son utilisation comme excellent marqueur pronostique. Il réside donc un réel besoin de distinguer les patients présentant un bon pronostic à long terme des patients dit « à risque » afin d'affiner et de personnaliser la prise en charge thérapeutique. Une des stratégies peut-être la recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques.

La nécessité de déterminer les cinétiques de sécrétions dans le sérum de patients des différentes cytokines est donc double :

- trouver de nouveaux biomarqueurs pronostiques
- déterminer avec précision les fenêtres thérapeutiques des cibles déjà étudiées.

C'est avec ces deux objectifs que nous avons dosé les sécrétions cytokiniques dans la cohorte de patients HIBISCUS. Les résultats du dosage de certaines cytokines ont fait l'objet de plusieurs publications²⁴⁶⁻²⁴⁸.

Parmi les différentes cytokines, nous nous sommes focalisés durant cette thèse sur IL-6 et MCP-1. Comme présenté dans l'introduction, MCP-1 et IL-6 sont des cytokines fortement impliquées dans la pathologie de l'infarctus du myocarde. Malgré des résultats pré-cliniques encourageants, les différents échecs des études cliniques soulignent l'importance d'améliorer les connaissances sur le rôle de ces deux cytokines dans l'infarctus du myocarde. Nous avons ainsi évalué dans la cohorte de patient HIBISCUS la cinétique de libération de ces deux cytokines.

Les caractéristiques de la population sont présentées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Caractéristiques générales des patients de la cohorte HIBISCUS STEMI.
Valeurs exprimées en : moyenne±SEM, nombre et (%), médiane et [Interquartile range]

	Patients (n=251)
Age, années	59±12
Sexe masculin, no (%)	199 (79.3)
Indice de masse corporelle (BMI), kg/m ²	26.3 [23.8-29.4]
Hypertension, no (%)	70 (27.9)
Hypercholesterolemie, no (%)	70 (27.9)
Diabète de type 2, no (%)	37 (14.7)
Fumeurs, no (%)	126 (50.2)
Temps d'ischémie, min	200 [145-315]
MI antérieur, no (%)	132 (52.6)
Statut Killip = 1, no (%)	216 (86.1)
Grade TIMI à l'admission = 0-1	167 (66.5)
Grade TIMI après reperfusion >2 (%)	230 (91.6)
FEVG initiale (%)	55.0 [46.0-61.0]
DFG < 60 (%)	13 (5.2)
Pic de Troponin I, ng/L	43904 [15731-114083]
Pic de creatine kinase, mUI/L	1561 [686-3666]
Pic de CRP, mg/L	17.9 [7.2-47.2]
Nombre de leucocytes à l'admission, G/L	11.8 [9.3-14.5]
Traitements en sortie	
Bêtabloquant, no (%)	237 (94.4)
Inhibiteur des RAS , no (%)	238 (94.8)
Antiplaquettaires, no (%)	250 (99.6)
Statines, no (%)	209 (83.3)

Les taux circulants d'IL-6 et de MCP-1 ont été évalués par la méthode d'ELISA (**Figure 19**).

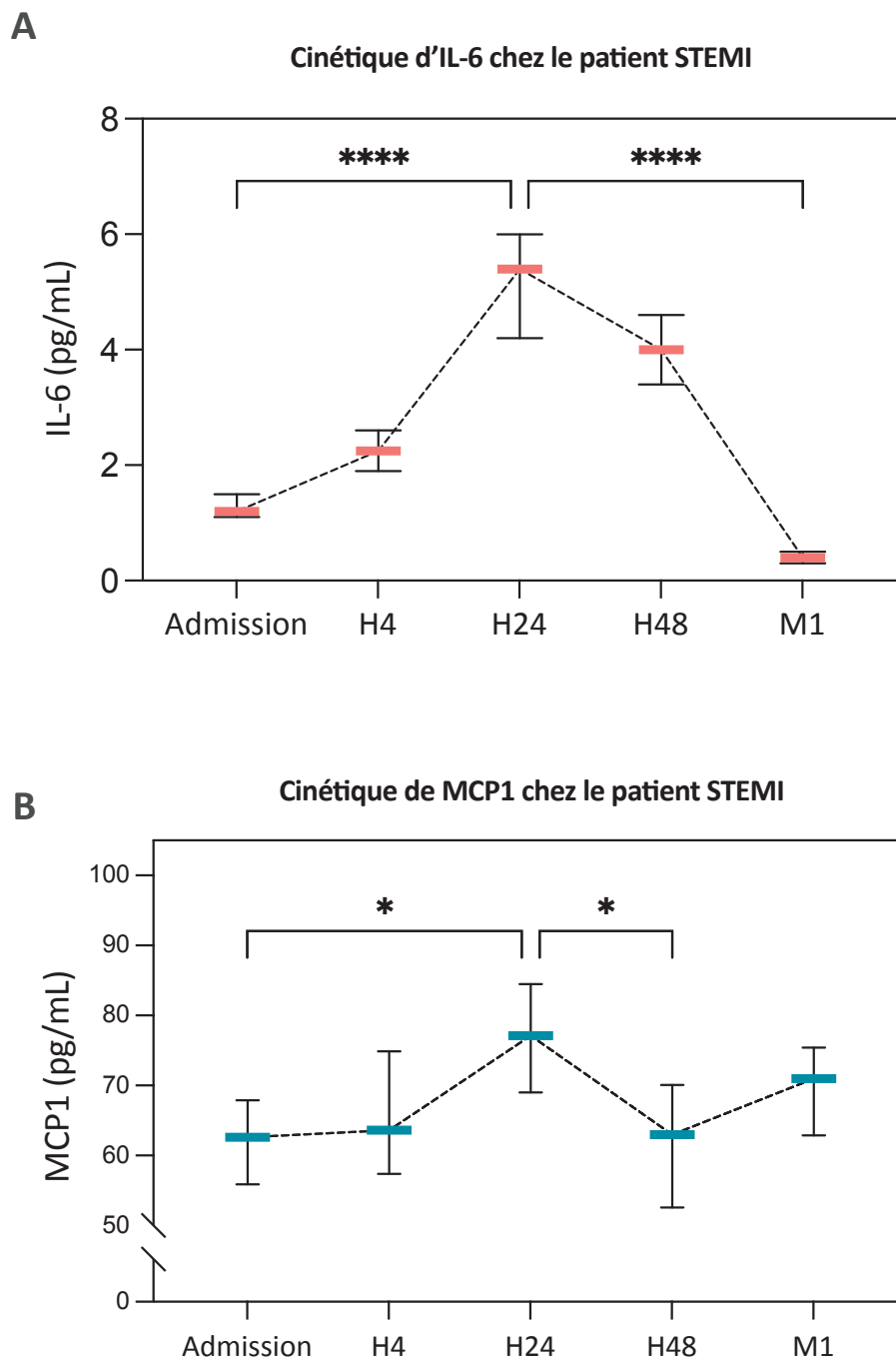


Figure 19 : Cinétique de libération d'IL-6 et de MCP-1 chez les patients STEMI : Quantification par technique ELISA des cytokines IL-6 (A) et MCP-1 (B) dans le sérum des patients de la cohorte HIBISCUS. Données représentées en médiane \pm 95%CI. * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$ Test de Kruskal-Wallis avec test post-hoc de Dunns.

Le taux circulant d'IL-6 atteint son pic de libération à H24 avec une valeur médiane de 5,4 pg/ml (IQR [2,1-11]) (**Figure 19A**). Le taux circulant de MCP-1 post infarctus atteint lui aussi son pic à H24 avec une valeur médiane de 77,1 pg/ml (IQR [48,3-117,9]) (**Figure 19B**). Les

patients ont ensuite été divisés en deux populations en fonction de leurs taux circulants de MCP-1 et d'IL-6 à H24. Individuellement pour chacune des deux cytokines, les patients ont été classés en deux groupes, un groupe avec un taux circulant à H24 supérieur à la valeur médiane de la population et un groupe avec un taux circulant inférieur à la valeur médiane de la population.

Les patients avec un taux circulant d'IL-6 supérieur à la médiane présentent une taille d'infarctus évaluée par IRM à 1 mois significativement plus élevée que les patients avec un taux d'IL-6 inférieur ou égal à la médiane (21,3% de la masse du ventricule gauche IQR [13,3-32,4] vs 9,4 IQR [5,1-17,0], $p < 0,0001$). Les patients avec un taux élevé d'IL-6 présentent également une fraction d'éjection ventriculaire gauche réduite à un mois par rapport au groupe de patients avec un taux circulant à H24 faible (48,0 % IQR [40,0-55,0] vs 56,0 IQR [50,0-60,8], $p < 0,0001$).

Concernant les taux circulants de MCP-1, après avoir dichotomisé les patients par rapport à la valeur médiane de la population à H24, aucune différence significative n'est retrouvée concernant la taille d'infarctus (16,5% IQR [8,7-29,7] vs 12,8 IQR [6,5-22,1]) et la fraction d'éjection ventriculaire gauche (53,5 IQR [45,3-59,0] vs 51,5 % IQR [42,8-58,0]).

Nous avons par la suite établi les corrélations entre les taux circulants de ces deux cytokines et la survenue d'évènements secondaires majeurs, incluant : toutes causes de mortalité, infarctus du myocarde, AVC, et hospitalisation pour insuffisance cardiaque (**Figure 20**). Parmi les 251 patients inclus pour un suivi de 32 mois, 32 patients ont subi un évènement majeur (12,7% de la population) : 5 décès, 7 infarctus du myocarde, 16 hospitalisations pour insuffisance cardiaque et 4 AVC.

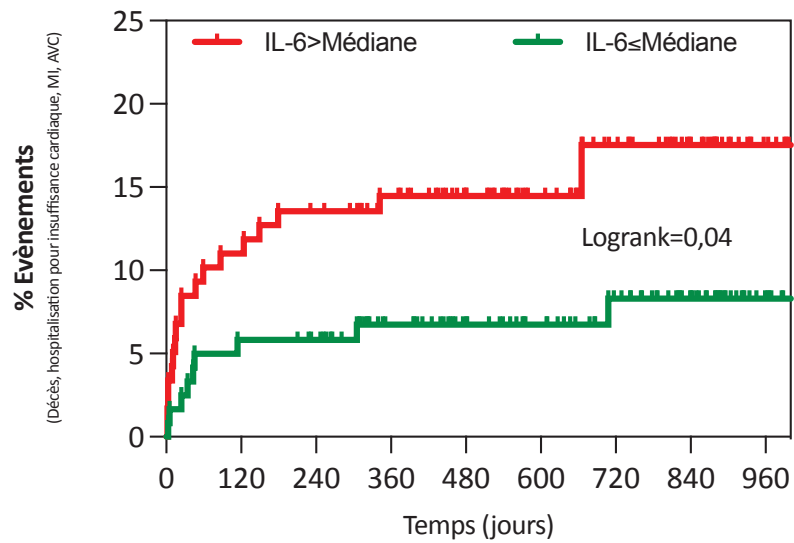
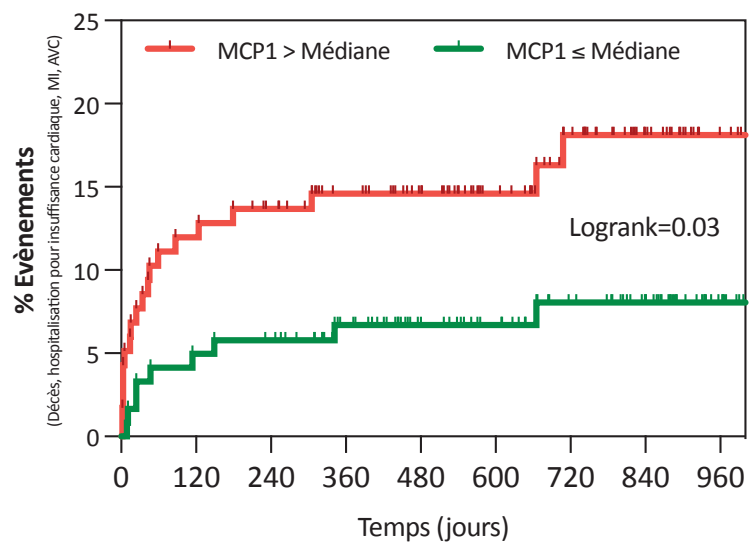
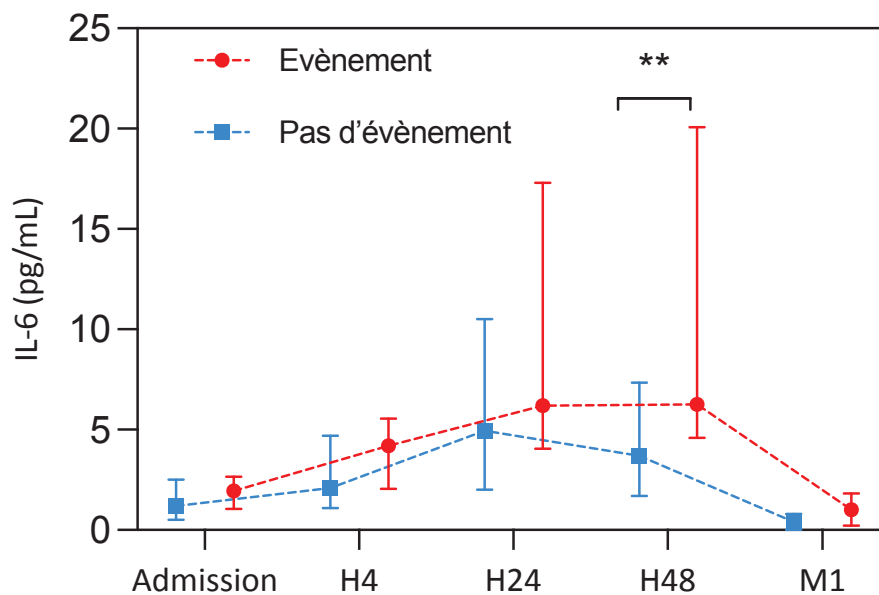
A**Evènements cardiaques majeurs et toutes causes de mortalité en fonction du taux circulant d'IL-6 à H24****B****Evènements cardiaques majeurs et toutes causes de mortalité en fonction du taux circulant de MCP-1 à H24**

Figure 20 : Survenue d'évènements cardiaques majeurs en fonction des taux circulants d'IL-6 et de MCP-1 à H24. Kaplan Meier représentant le pourcentage de la population ayant subi un évènement cardiaque majeur durant les 18 mois de suivi. Les patients ont été dichotomisés en fonction de leur taux circulant d'IL-6 (A) ou de MCP-1 (B) supérieur ou inférieur à la médiane au temps H24.

Les patients avec un taux circulant à H24 d'IL-6 supérieur à la médiane de la population souffrent plus d'événements cardiovasculaires majeurs durant les 32 mois de suivi que les patients avec un taux circulant d'IL-6 inférieur à la médiane (**Figure 20A**) (Hazard Ratio 2,25 95%CI (1,1-4,7)). De même, le pourcentage d'évènements composites est plus élevé dans le groupe de patients présentant un taux circulant de MCP-1 supérieur à la médiane de la population en comparaison avec le pourcentage dans la population de patients présentant un taux circulant de MCP-1 à H24 inférieur à la médiane (Hazard Ratio 2,36 95%CI (1,1-5,0)) (**Figure 20B**).

Si l'on analyse les taux circulants des cytokines en fonction des critères composites cette fois ci, les patients ayant subi un événement cardiaque majeur durant le suivi présentent des taux circulants d'IL-6 et de MCP-1 supérieurs aux patients n'ayant pas subi d'évènements (**Figure 21**).

A **Cinétique d'IL-6 chez le patient STEMI en fonction des événements cardiaques majeurs (Décès, Hospitalisation pour insuffisance cardiaque, MI, AVC)**



B **Cinétique de MCP-1 chez le patient STEMI en fonction des événements cardiaques majeurs (Décès, Hospitalisation pour insuffisance cardiaque, MI, AVC)**

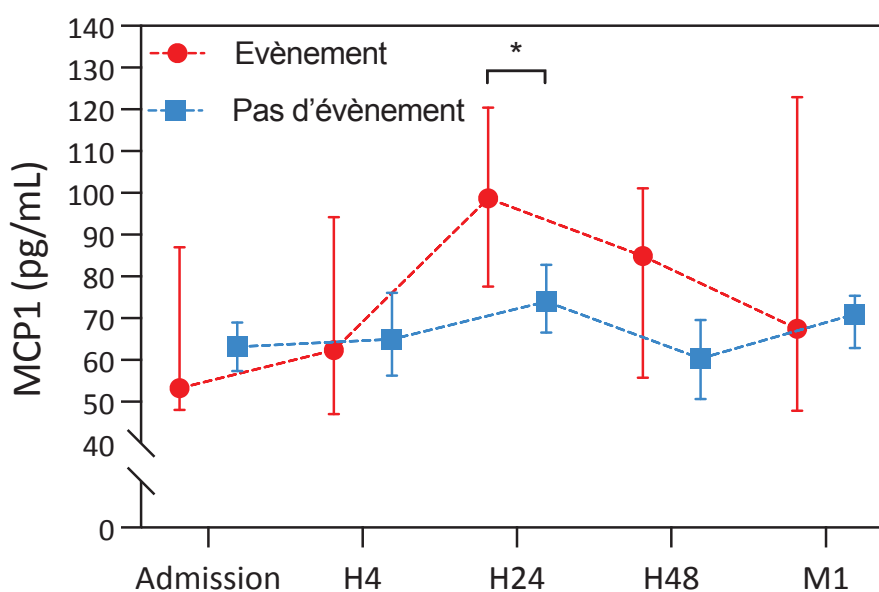


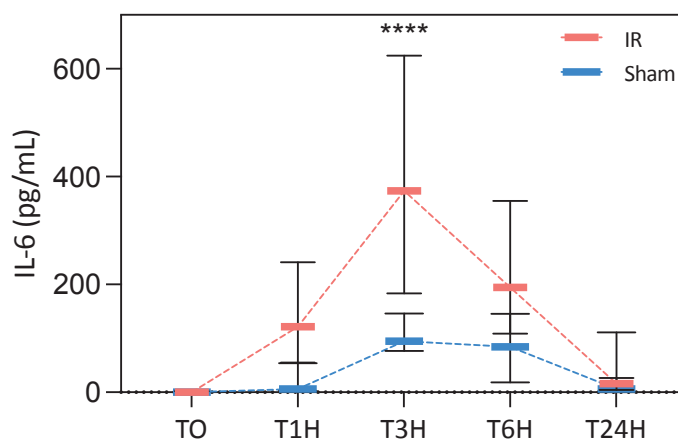
Figure 21 : Cinétique de libération d'IL-6 et de MCP-1 en fonction de la survenue d'événements cardiaques majeurs. Taux de libération d'IL-6 (A) et de MCP-1 (B) en fonction de la survenue d'événements cardiaques majeurs (rouge) ou non (bleu) durant le suivi. Données représentées en médiane \pm 95%CI. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ comparaison entre les groupes évènement vs pas d'évènement avec le test de Šidák's.

De manière intéressante, les deux cinétiques ne sont pas similaires. Les patients ayant subi un événement présentent un maintien du pic d'IL-6 à H48 quand les patients ne souffrant pas d'événements ont une réduction du niveau circulant d'IL-6 entre H24 et H48 (**Figure 21A**). Concernant MCP-1, les patients n'ayant pas souffert d'événements cardiaques majeurs présentent un taux circulant de MCP-1 assez linéaire dans le temps tandis que les patients ayant subi un évènement présentent un pic de MCP-1 à H24 (**Figure 21B**). Les taux circulants de MCP-1 et d'IL-6 ont donc différentes cinétiques en fonction de la survenue ou non d'évènements cardiaques majeurs chez les patients.

2. Évaluation de la cinétique d'IL-6 et MCP-1 dans le sérum de souris après un infarctus du myocarde

Afin d'explorer les mécanismes de libération de MCP-1 et d'IL-6 dans cette pathologie, nous avons utilisé un modèle pré-clinique d'infarctus du myocarde induit par la ligature de l'artère coronaire interventriculaire antérieure et évaluer les cinétiques de libérations de ces cytokines dans le sérum de souris (**Figure 22**).

A Cinétique de libération de IL-6 chez la souris après un IDM



B Cinétique de libération de MCP-1 chez la souris après un IDM

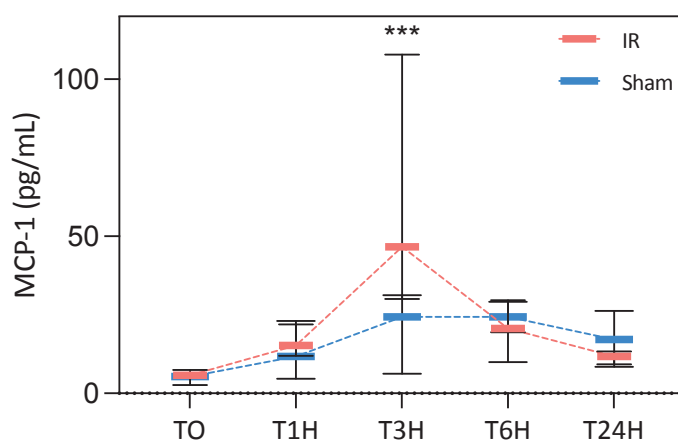


Figure 22 : Cinétique de libération d'IL-6 et de MCP-1 dans un modèle murin d'infarctus du myocarde. Taux d'IL-6 (A) et de MCP-1 (B) après une séquence d'ischémie-reperfusion in vivo en comparaison avec le contrôle de chirurgie Sham, à chacun des temps de prélèvement. Données représentées en médiane \pm 95%CI. **** $p < 0,0001$ *** $p < 0,001$ comparaison entre les groupes IR vs Sham avec le test de Šidák's. $n = 5$ à 7 par temps.

En réponse à un infarctus du myocarde induit, dans le modèle de souris, le taux circulant d'IL-6 atteint son pic dans notre séquence après trois heures de reperfusion avec une valeur médiane de 373,7 pg/ml (IQR [183,3-624,5], $p < 0,001$ en comparant à la valeur mesurée avant l'induction de l'ischémie, $p < 0,01$ par rapport au temps H3 du groupe Sham) (**Figure 22A**). Le taux circulant de MCP-1 atteint également un pic après trois heures de reperfusion avec une valeur médiane de 46,6 pg/ml (IQR [30,1-107,8], $p < 0,0001$ en comparant à la valeur avant l'induction de l'ischémie ; $p < 0,05$ par rapport au temps H3 du groupe Sham) (**Figure 22B**). Les différences de sécrétions observées entre les groupes Sham, ou l'ensemble de la procédure

chirurgicale est réalisée à l'exception de la ligature de l'artère, et les groupes IR suggèrent que le stress cardiaque est bien à l'origine de la libération de ces cytokines.

Afin de confirmer l'origine cardiaque de ce signal, le niveau d'expression de l'ARN messager d'IL-6 et de MCP-1 dans le cœur a été mesuré. Grâce à une analyse transcriptomique réalisée par les Drs Badawi et Bidaux au sein de notre équipe, nous avons pu extraire les données pour les ARN messagers de différentes cytokines, notamment IL-6 et MCP-1. (Figure 23).

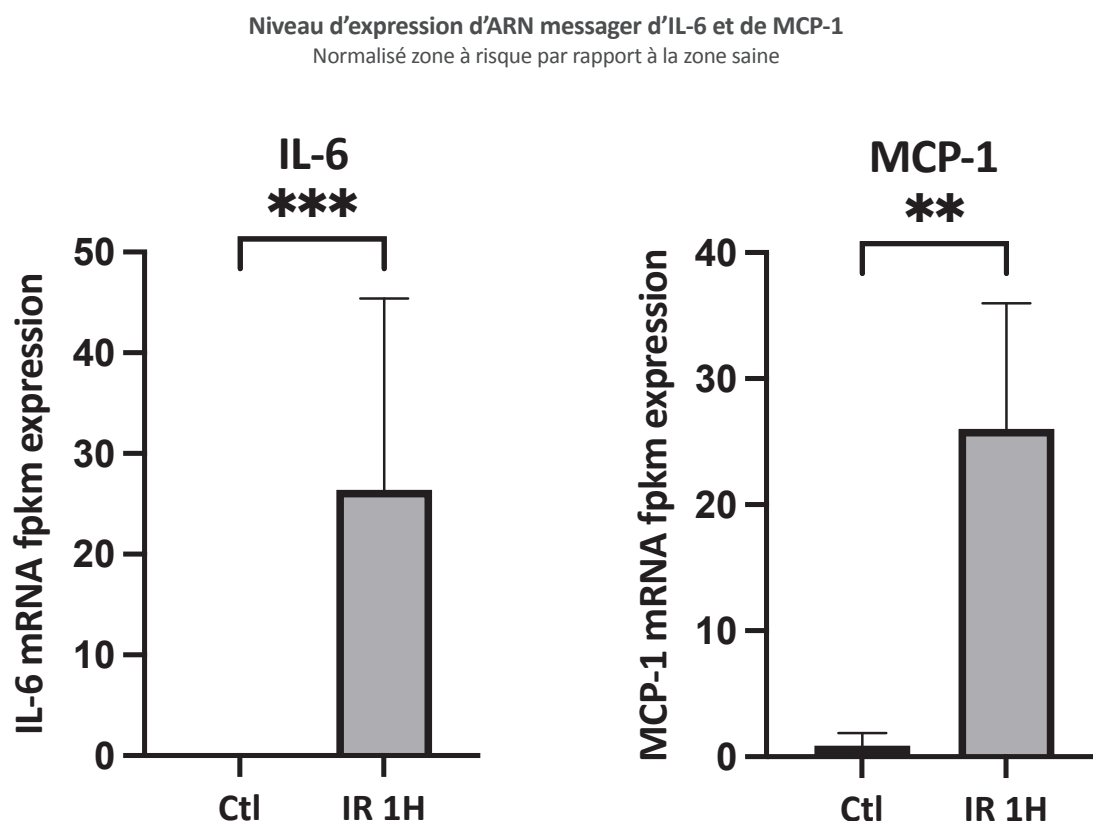


Figure 23 : Niveau d'expression de l'ARN messager d'IL-6 et de MCP-1 dans le cœur infarci. Niveau d'expression de l'ARN messager d'IL-6 (A) et de MCP-1 (B) dans la zone à risque normalisé par leur niveau d'expression dans la zone saine dans un cœur contrôle (avant la chirurgie) (n=5) vs un cœur prélevé après 1H de reperfusion (n=8). Test de Mann & Whitney, ** p<0,01 *** p<0,001.

Dans cette analyse, le niveau d'expression de l'ARN messager d'IL-6 et de MCP-1 est significativement augmenté dans la zone à risque des cœurs infarcis en comparaison des cœurs contrôles à partir d'une heure de reperfusion (valeur médiane 26,4 Fragments Par Kilobase d'exons par million de fragment lu (FPKM) IQR [11,0-45,4] contre 0,04 FPKM IQR

[0,03-0,04] pour IL-6, $p < 0,001$ et 26,0 Fpkm IQR [15,4-36,0] contre 0,9 Fpkm IQR [0,8-1,8] pour MCP-1, $p < 0,01$) (**Figure 23**).

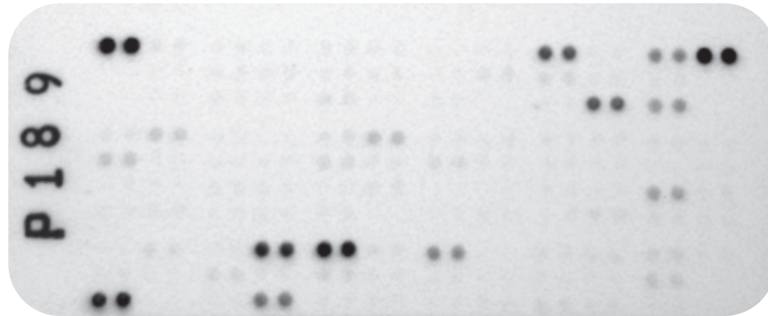
Ces résultats suggèrent que les taux circulants d'IL-6 et de MCP-1 mesurés dans le sérum après l'infarctus sont en partie le résultat d'une sécrétion locale dans la zone à risque du cœur. En revanche, ces analyses ne nous permettent pas de déterminer si ces niveaux d'expression sont augmentés dans les cellules résidentes cardiaques ou s'ils sont augmentés à la suite d'une infiltration cellulaire, notamment de cellules immunitaires.

Nous avons souhaité évaluer si les cellules cardiaques, en particulier les CMA souffrants, pourraient être responsables de la sécrétion d'IL-6 et de MCP-1 observée.

3. Analyses des sécrétions cytokiniques des cardiomyocytes

Dans le but de déterminer si les CMA eux-mêmes sont en mesure de sécréter des cytokines, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de culture primaire de CMA. Après isolation à partir d'un cœur de souris, les CMA sont soumis à une séquence d'hypoxie de 1H30 dans un milieu dépourvu de nutriments afin de mimer le phénomène d'ischémie retrouvé *in vivo*. Après 1H30, un milieu complet est ajouté aux cellules et celles-ci sont replacées dans des conditions de culture normale. Après 24H, le milieu conditionné des cellules est collecté. A l'aide d'une puce à cytokines, le contenu en cytokines de ce milieu conditionné après la séquence d'HR a été identifié (**Figure 24**). L'utilisation d'une puce à cytokines nous permet un premier criblage large (110 cytokines), sans à priori (**Figure 24A**).

A Exemple de puce à cytokines réalisée avec un milieu conditionné de cardiomyocytes soumis à une séquence HR



B Sécrétions cytokiniques par les CMA soumis à une séquence HR

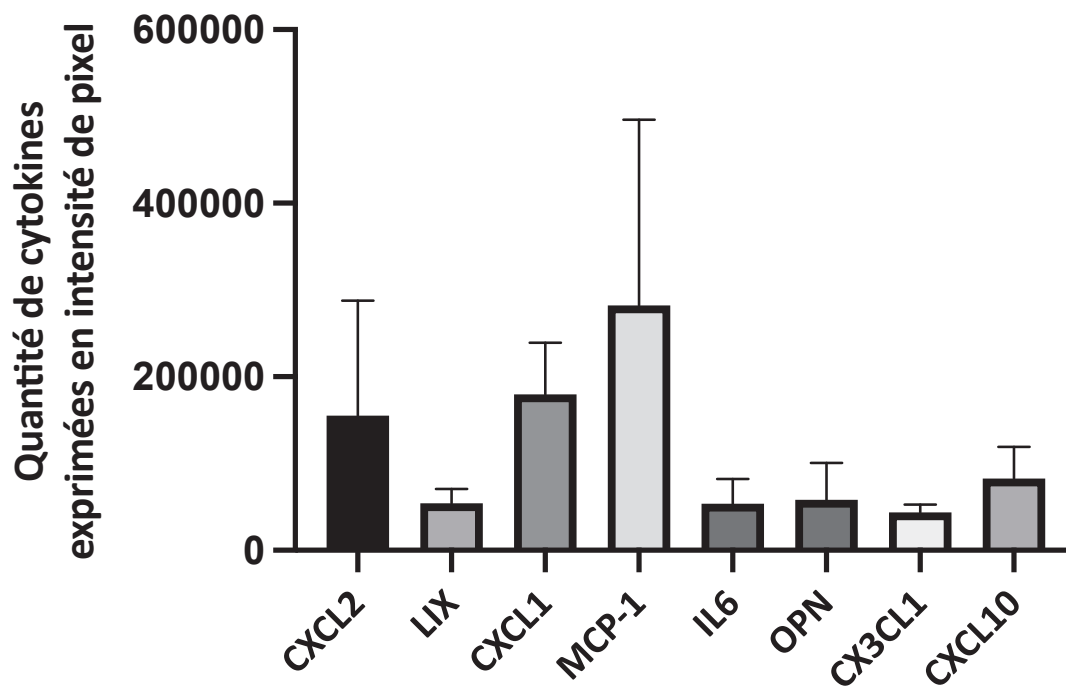


Figure 24 : Sécrétions cytokiniques par les cardiomyocytes après HR. Identification des sécrétions cytokiniques des cardiomyocytes à l'aide d'une puce à cytokines (A) et mesures semi quantitatives par intensité de pixel des différentes cytokines les plus sécrétées avec le logiciel Image Lab (B), n=4.

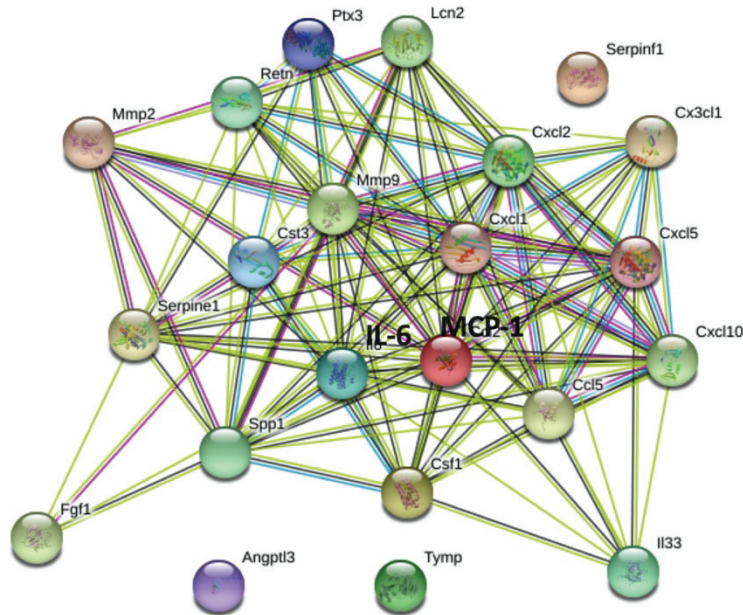
Ainsi, nous avons identifié que les CMA secrètent un grand nombre de cytokines dont les plus exprimées sont présentées sur la figure (Figure 24B) parmi lesquelles MCP-1 et IL-6, MCP-1 étant la cytokine la plus exprimée. D'autres cytokines telles que CXCL2 et CXCL1 sont également sécrétées de façon importante, mais ces chimiokines sont connues pour être

principalement chimio-attractantes pour les polynucléaires neutrophiles. Or nous nous focalisons dans cette étude sur les monocytes/macrophages. Nous nous intéresserons donc à IL-6 et MCP-1 en accord avec les données cliniques obtenues pour ces cytokines.

A l'aide du logiciel STRING, nous avons réalisé une étude des interactions entre toutes les cytokines sécrétées par les CMA (**Figure 25**).

A

Représentation des interactions protéines-protéines des cytokines sécrétées par les CMA après HR



B

Principales voies de signalisations régulées par les protéines sécrétées par les cardiomyocytes soumis à une séquence HR

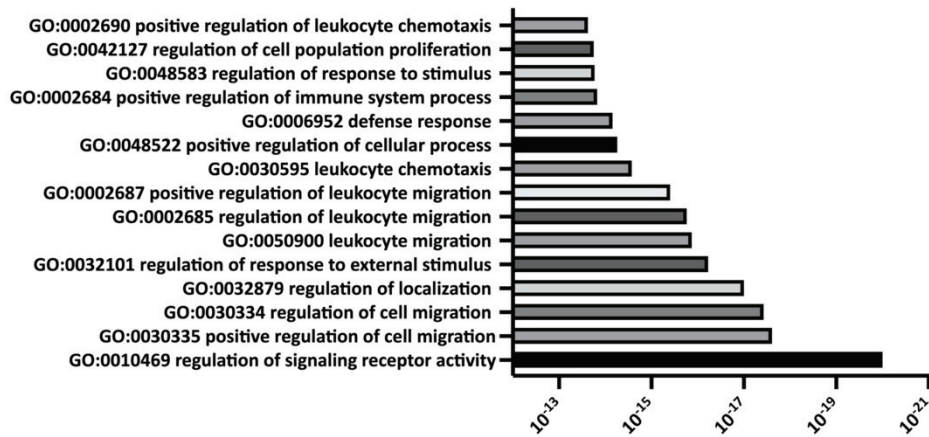


Figure 25 : Représentation des interactions protéines-protéines des cytokines sécrétées par les CMA après HR et principales voies de signalisation régulées par l'ensemble des cytokines sécrétées. Analyse réalisée avec le logiciel STRING sur la moyenne des sécrétions par les CMA (n=4).

Parmi celles-ci, il apparaît que MCP-1 et IL-6 jouent un rôle central dans les interactions (**Figure 25A**). Nous avons également analysé les voies de signalisations dans lesquelles les cytokines sécrétées sont impliquées. Les voies les plus exprimées sont les voies de la migration cellulaire, de la migration des leucocytes et de l'activation de l'inflammation (**Figure 25B**).

Après avoir observé que les CMA seuls étaient en mesure de sécréter des cytokines en réponse à un stress HR, nous avons quantifié la libération des cytokines IL-6 et MCP-1 par les CMA par la méthode d'ELISA (**Figure 26**).

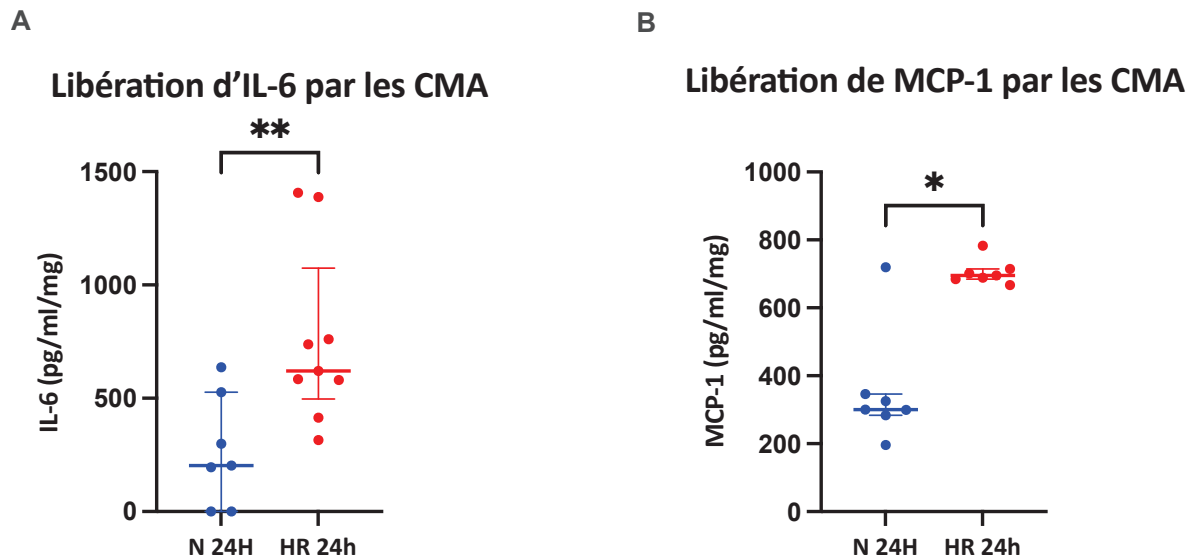


Figure 26 : Dosage d'IL-6 et de MCP-1 dans le milieu conditionné des cardiomyocytes. Quantification par la méthode d'ELISA des sécrétions d'IL-6 (A) et de MCP-1 (B) par les CMA soumis à une séquence HR ou à une séquence de normoxie. Les données sont exprimées en pg/ml/mg. Données représentées en médiane + IQR. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ Test de Wilcoxon. $n = 7-9$.

En condition HR, les CMA libèrent significativement plus d'IL-6 que dans la condition normoxie réalisée sur la même séquence temporelle (médiane : 620,6 pg/ml/mg de CMA IQR [497,5-1074,0] en condition HR contre 202,6 pg/ml/mg de CMA IQR [0,0-526,9], $p < 0,01$) (**Figure 26A**). Les CMA libèrent également plus de MCP-1 (médiane : 695,1 pg/ml/mg de CMA IQR [684,3-714,9] en condition HR contre 300,6 pg/ml/mg de CMA IQR [283,9-346,1] en condition normoxie, $p < 0,05$) (**Figure 26B**). La sécrétion de ces deux cytokines est donc bien en réponse au stress d'hypoxie-reoxygénation.

Comme présenté dans l'introduction, IL-6 et MCP-1 jouent un rôle majeur sur le recrutement et l'activation des cellules du système immunitaire. Nous avons donc évalué l'impact de ces sécrétions sur le recrutement des cellules immunitaires, et principalement les macrophages.

4. Recrutement des macrophages par les cardiomyocytes

Pour évaluer le recrutement des macrophages par les CMA soumis à la séquence HR, nous avons utilisé la technique de co-culture en insert présentée dans la partie matériel et méthodes. Brièvement un insert poreux sur lequel ont été cultivés des macrophages dérivés de la moelle osseuse est ajouté dans le puit de CMA au moment de la réoxygénation. Les macrophages étant marqués au colorant vital PKHred, nous pouvons quantifier au microscope confocal le nombre de macrophages ayant été attirés par chimiotactisme par les CMA au fond du puit.

Quatre conditions ont été testées,

- HR : les inserts sont ajoutés au moment de la réoxygénation en présence du milieu d'hypoxie et du milieu de réoxygénation. Dans cette condition nous conservons donc les sécrétions ayant eu lieu durant l'hypoxie et durant la réoxygénation.

- R : condition réoxygénation, les inserts sont ajoutés au moment de la réoxygénation alors que le milieu d'hypoxie est complètement remplacé par du milieu de réoxygénation, s'affranchissant des sécrétions ayant eu lieu durant l'hypoxie.

- Normoxie : Contrôles avec des cellules cultivées en condition normoxie

- Macrophages seuls : condition où les inserts poreux sont ajoutés dans des puits ne contenant pas de cellules cardiaques afin d'évaluer les macrophages migrant sans chimioattraction (**Figure 27**).

Recrutement de macrophages par les CMA

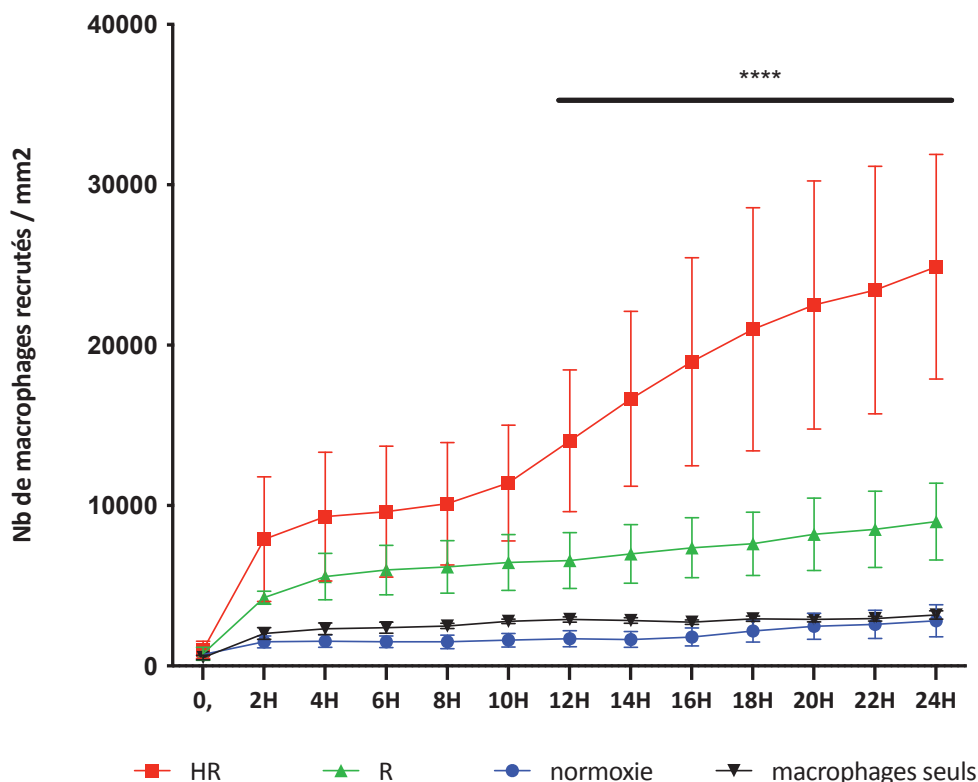


Figure 27 : Recrutement de macrophages par les cardiomyocytes *in vitro*. Nombres de macrophages recrutés par les cardiomyocytes par chimiotactisme en condition HR, R, normoxie et sans cellules au fond des puits. Valeurs exprimées en nombre de macrophages par mm² après moyenne de trois images par puits et trois puits par conditions. Valeurs représentées en moyenne \pm SEM. **** $p < 0,0001$ entre la condition HR et la condition R. Test de Tukey. $n=4$.

Les CMA seuls sont capables de recruter *in vitro* des macrophages, et ce recrutement est significativement plus important dans la condition HR suggérant que des facteurs sécrétés durant l'hypoxie jouent un rôle prépondérant (**Figure 27**). Pour la suite des expériences, nous nous sommes concentrés sur la condition HR.

Dans le but de déterminer si les sécrétions des CMA induisent le recrutement d'un sous type particulier de macrophages, nous avons au préalable différencié les macrophages en macrophages pro-inflammatoires ou en macrophages anti-inflammatoires (**Figure 28**). Aucune différence n'est observée entre le nombre de macrophages pro- et anti-inflammatoires qui traverse les inserts par simple sédimentation (sans cellules au fond du puits).

Recrutement de macrophages pro- vs anti-inflammatoires par les CMA

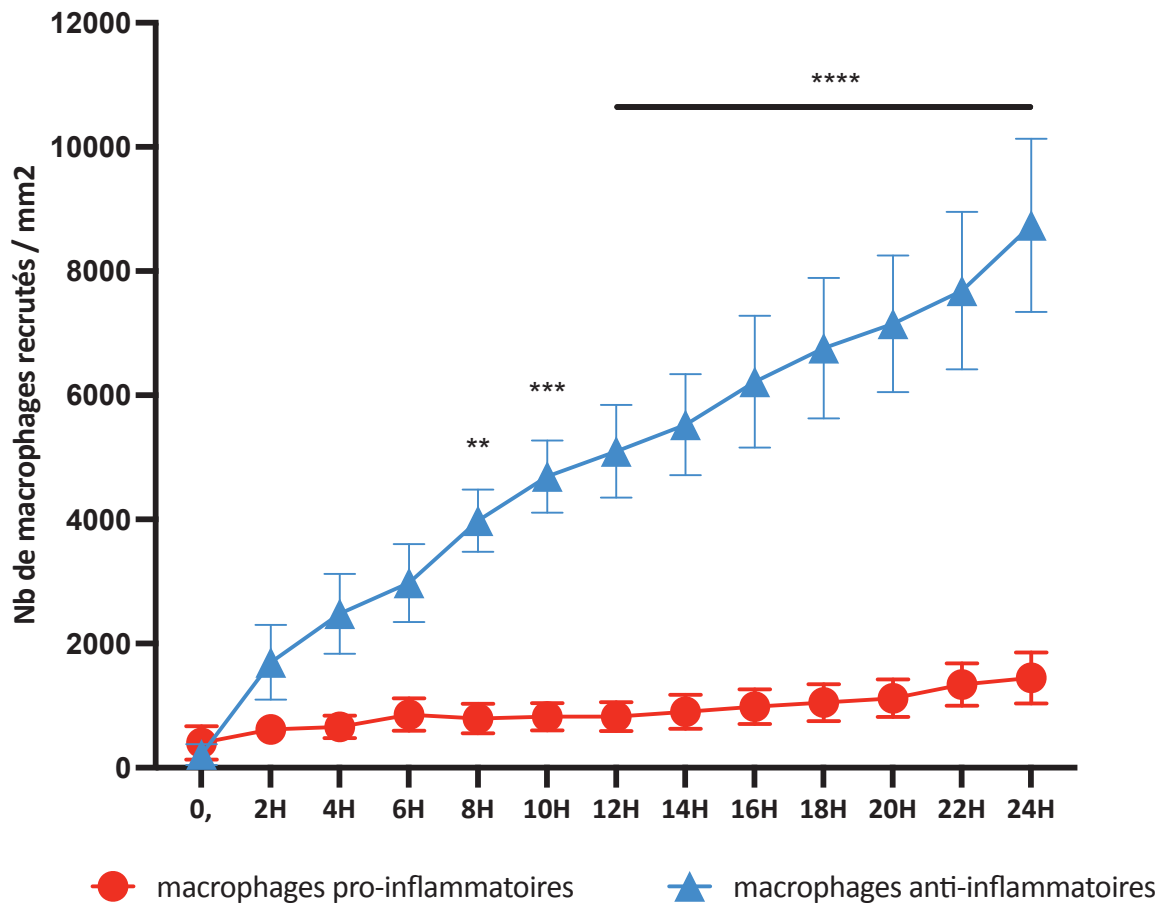


Figure 28 : Recrutement de macrophages pro- vs anti-inflammatoires par les cardiomyocytes *in vitro*. Nombres de macrophages recrutés par les CMA par chimiotactisme en condition HR. Valeurs exprimées en nombre de macrophages par mm² après moyenne de trois images par puits et trois puits par conditions. Valeurs représentées en moyenne \pm SEM. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$ entre la condition macrophages pro-inflammatoires vs macrophages anti-inflammatoires. Test de Tukey. $n=4$.

Les CMA recrutent préférentiellement les macrophages anti-inflammatoires avec une valeur moyenne de recrutement de $8737 \pm 1393,6$ macrophages par mm² contre $1446,8 \pm 409,5$ macrophages par mm² après 24 heures de réoxygénation, $p < 0,0001$.

Après avoir observé un recrutement de macrophages anti-inflammatoires *in vitro*, nous avons souhaité confirmer ce résultat *in vivo*.

5. Évaluation du recrutement de macrophages anti-inflammatoires dans la phase précoce de l'ischémie-reperfusion *in vivo*

Après avoir démontré que les CMA induisent *in vitro* un recrutement préférentiel de macrophages à profil anti-inflammatoire, nous avons vérifié si ce recrutement était retrouvé *in vivo* dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez la souris. Afin d'évaluer le recrutement dans les différentes zones du cœur, zone à risque vs zone saine, nous avons réalisé une technique originale qu'est la méthode de transparisation d'organe.

Brièvement, après la séquence d'ischémie-reperfusion *in vivo*, le cœur est prélevé puis transparisé. Les macrophages sont identifiés par immunomarquage à l'aide d'anticorps spécifiques. L'imagerie par microscopie à feuillets de lumière suivie de la reconstruction 3D permet alors d'évaluer le recrutement des macrophages dans l'organe entier (**Figure 29**).

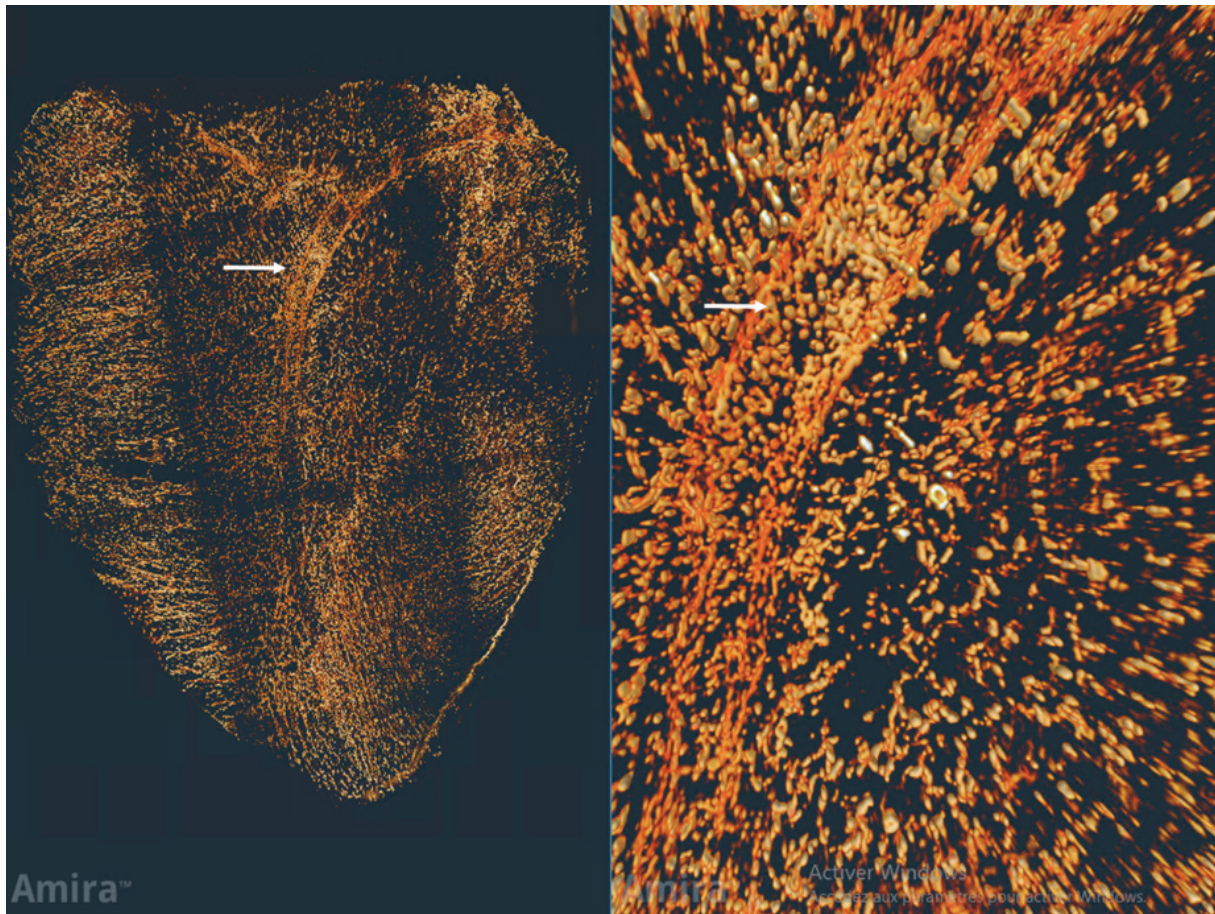


Figure 29 : *Infiltration in vivo de macrophages anti-inflammatoires dans le cœur infarcté évaluée par microscopie à feuillets de lumière.* Représentation de la reconstruction 3D du signal de fluorescence émis par les macrophages immuno-marqués avec l'anticorps anti-CD206 dans le cœur infarcté de souris après 6H de reperfusion. Imagerie réalisée par microscopie à feuillets de lumière, cœur orienté côté zone à risque. Les macrophages adhérents à la paroi épithéliale d'une artère sont identifiés par la flèche blanche.

Nous observons dans la **Figure 29**, deux populations de macrophages dans ce cœur ayant été prélevé après 6H de reperfusion. En effet, nous pouvons distinguer des macrophages infiltrés dans le tissu et des macrophages qui sont adhérents à la paroi des vaisseaux, en cours d'infiltration.

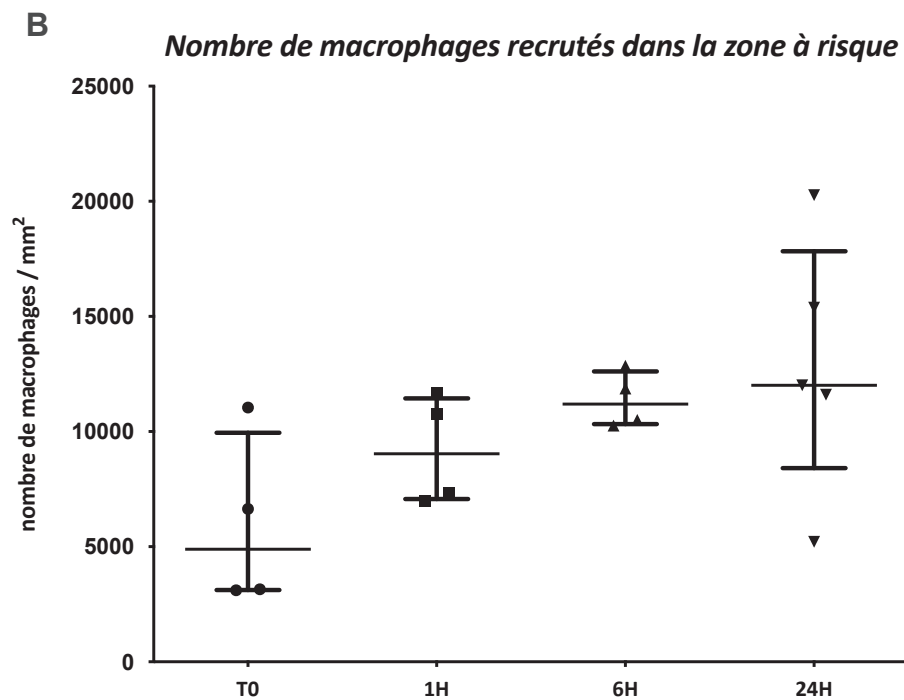
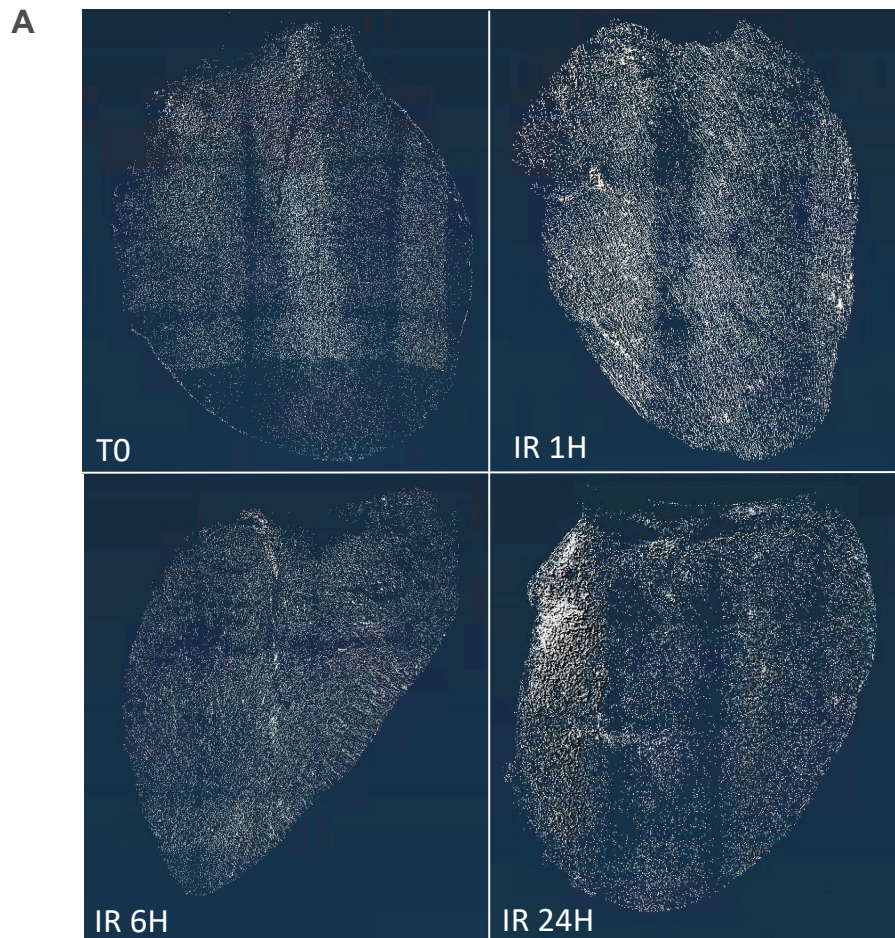


Figure 30 : Quantification in vivo du nombre de macrophages anti-inflammatoires infiltrés. Image de microscopie à feuillet de lumière représentative de l'infiltrat de macrophages positifs au marquage CD206 dans le ventricule gauche (A). Quantification du nombre de macrophages positifs au marquage CD206 dans la zone à risque évaluée par microscopie confocale (B). Valeurs obtenues en moyennant la quantification du nombre de macrophages sur trois champs à trois niveaux de profondeur différents séparés de 40 μ m. Valeurs exprimées en médiane + IQR.

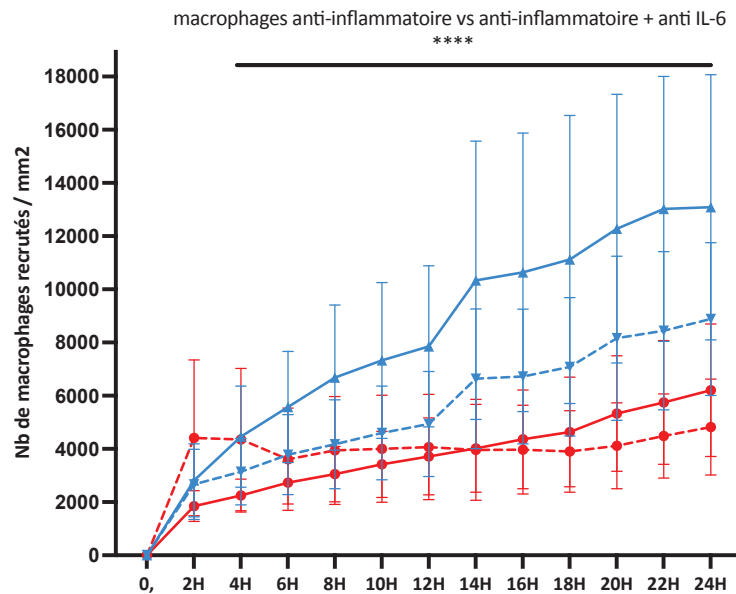
Ces expériences confirment la présence de macrophages anti-inflammatoires dès les premières heures de reperfusion au sein de la zone à risque (**Figure 30A**). La différence de densité de macrophages positifs au marqueur CD206 entre les conditions T0 et les conditions IR montrent bien que ces macrophages sont des macrophages recrutés et non des macrophages résidents. Nous observons un recrutement de macrophages dans les premières heures (**Figure 30B**) avec une augmentation de la densité de macrophages, mesurée par microscopie confocale, passant de 4895 IQR [3120-9948] macrophages/ mm² avant l'ischémie à 12012 IQR [8410-17429] macrophages/ mm² après 24H de reperfusion. Une analyse de la densité de macrophages en trois dimensions, basée sur les images de microscopie à feuillets de lumière est en cours.

Après avoir démontré que les cardiomyocytes seuls étaient capables d'induire un recrutement de macrophages anti-inflammatoires, nous avons voulu déterminer si ce recrutement était sous la dépendance des cytokines IL-6 et MCP-1.

6. Rôle de MCP-1 et d'IL-6 dans le recrutement des macrophages par les cardiomyocytes

L'implication de MCP-1 et d'IL-6 dans le recrutement des macrophages *in vitro* a été étudiée avec la technique de recrutement en insert et l'utilisation d'anticorps neutralisants (**Figure 31**).

A Recrutement de macrophages pro- vs anti-inflammatoires par les CMA +/- ajout d'anti-IL-6



B Recrutement de macrophages pro- vs anti-inflammatoires par les CMA +/- ajout d'anti-MCP-1

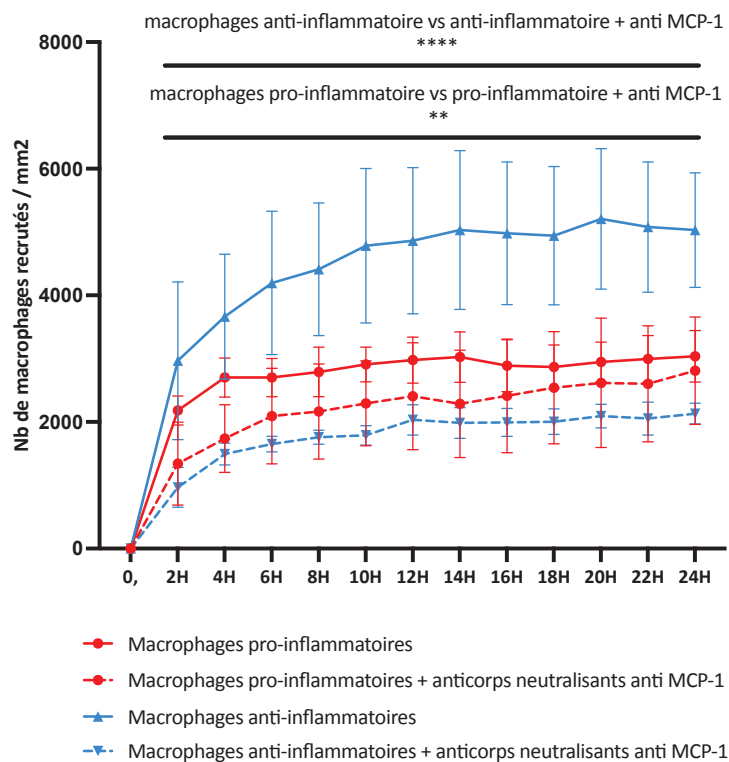


Figure 31 : Recrutement de macrophages pro- vs anti-inflammatoires par les cardiomyocytes in vitro après ajout d'anticorps neutralisants. Nombres de macrophages recrutés par les cardiomyocytes par chimiotactisme en condition HR après ajout ou non d'anticorps neutralisants dirigés contre IL-6 (A) ou MCP-1 (B). Valeurs exprimées en nombre de macrophages par mm² après moyenne de trois images par puits et trois puits par conditions. Valeurs représentées en moyenne \pm SEM. ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$. Test de Tukey. $n = 4$.

Ainsi, l'utilisation d'anticorps neutralisants dirigés contre IL-6 entraîne une diminution significative du recrutement de macrophages anti-inflammatoires par rapport à la condition contrôle (13087,0 \pm 4986,3 macrophages par mm² contre 8881,9 \pm 2872,5 macrophages par mm² après 24 heures de réoxygénation, $p < 0,001$) (**Figure 31A**). Aucun effet n'est observé concernant le recrutement des macrophages pro-inflammatoires. La neutralisation de MCP-1 dans le milieu entraîne également une diminution significative du recrutement de macrophages anti-inflammatoires (5030,5 \pm 903,2 macrophages par mm² contre 2809,9 \pm 847,0 macrophages par mm² après 24 heures de réoxygénation, $p < 0,001$). L'utilisation d'un anticorps neutralisant dirigé contre MCP-1 entraîne également une légère diminution du recrutement de macrophages pro-inflammatoires (3036,0 \pm 406,6 macrophages par mm² dans la condition contrôle contre 2132,0 \pm 164,7 macrophages par mm² après 24H de réoxygénation, $p < 0,01$) (**Figure 31B**).

Le facteur de transcription STAT3 joue un rôle central dans la voie de signalisation de l'IL-6 et la sécrétion de MCP-1²⁴⁹⁻²⁵¹. Afin de mesurer l'implication de cette voie de signalisation dans le recrutement de macrophages, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de STAT3

Recrutement de macrophages pro- vs anti-inflammatoires par les CMA +/- ajout de STATTC

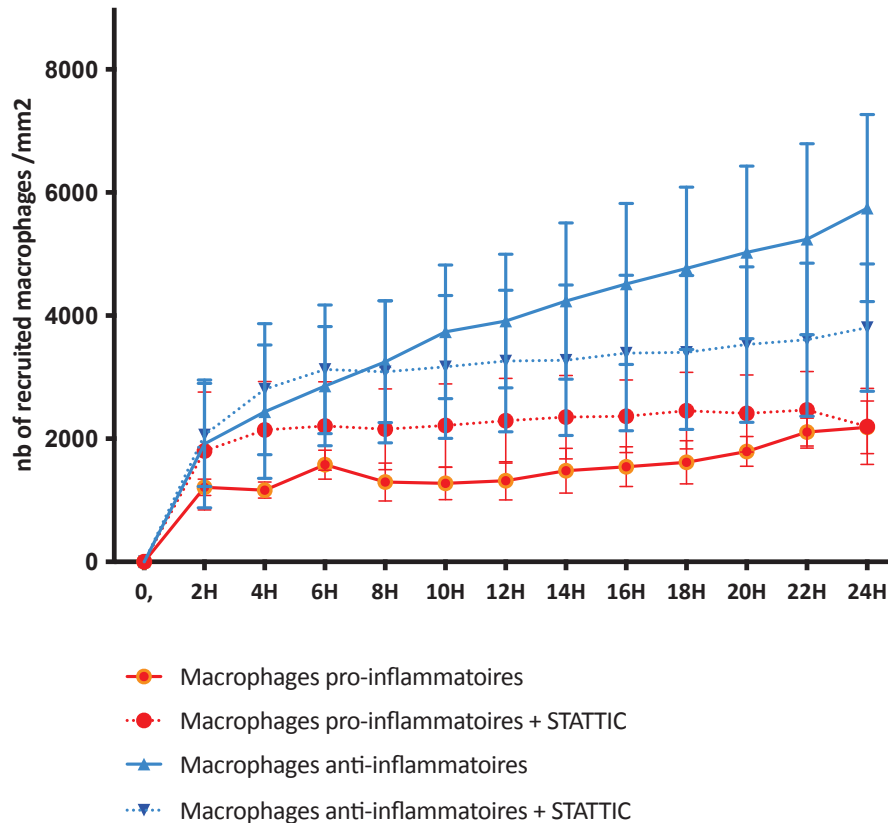


Figure 32 : Recrutement de macrophages pro- vs anti-inflammatoires induit par les cardiomyocytes *in vitro* après ajout de STATTC. Nombres de macrophages recrutés par les cardiomyocytes par chimiotactismes en condition HR après ajout ou non du traitement par STATTC. Valeurs exprimées en nombre de macrophages par mm² après moyenne de trois images par puits et trois puits par conditions. Valeurs représentées en moyenne \pm SEM. Test de Tukey. $n=4$

L'utilisation du traitement STATTC²⁵² entraîne une tendance à la diminution du nombre de macrophages anti-inflammatoires recrutés par les CMA (5747,7 \pm 1520,7 macrophages par mm² dans la condition contrôle contre 3805,6 \pm 1033,5 macrophages par mm² dans la condition traitée après 24 heures de réoxygénation) (**Figure 32**). Aucun effet n'est observé pour les macrophages pro-inflammatoires.

Nous avons démontré le recrutement des macrophages majoritairement anti-inflammatoires par les CMA lors d'une séquence HR et également *in vivo* dans un modèle d'ischémie-reperfusion chez la souris.

Les CMA étant capables de recruter les macrophages plutôt anti-inflammatoires, nous avons également évalué leur capacité, via leurs sécrétions, à modifier le phénotype des macrophages.

7. Différentiation des macrophages par le milieu conditionné des cardiomyocytes

La technique d'activation des macrophages présentée dans la partie matériel et méthodes nous permet d'évaluer l'effet du milieu conditionné des CMA sur la différenciation des macrophages. Brièvement, les macrophages sont stimulés durant 24H avec le milieu conditionné de CMA ayant subi au préalable une séquence HR. Le phénotype des macrophages après cette stimulation est ensuite caractérisé par cytométrie en flux (**Figure 33**).

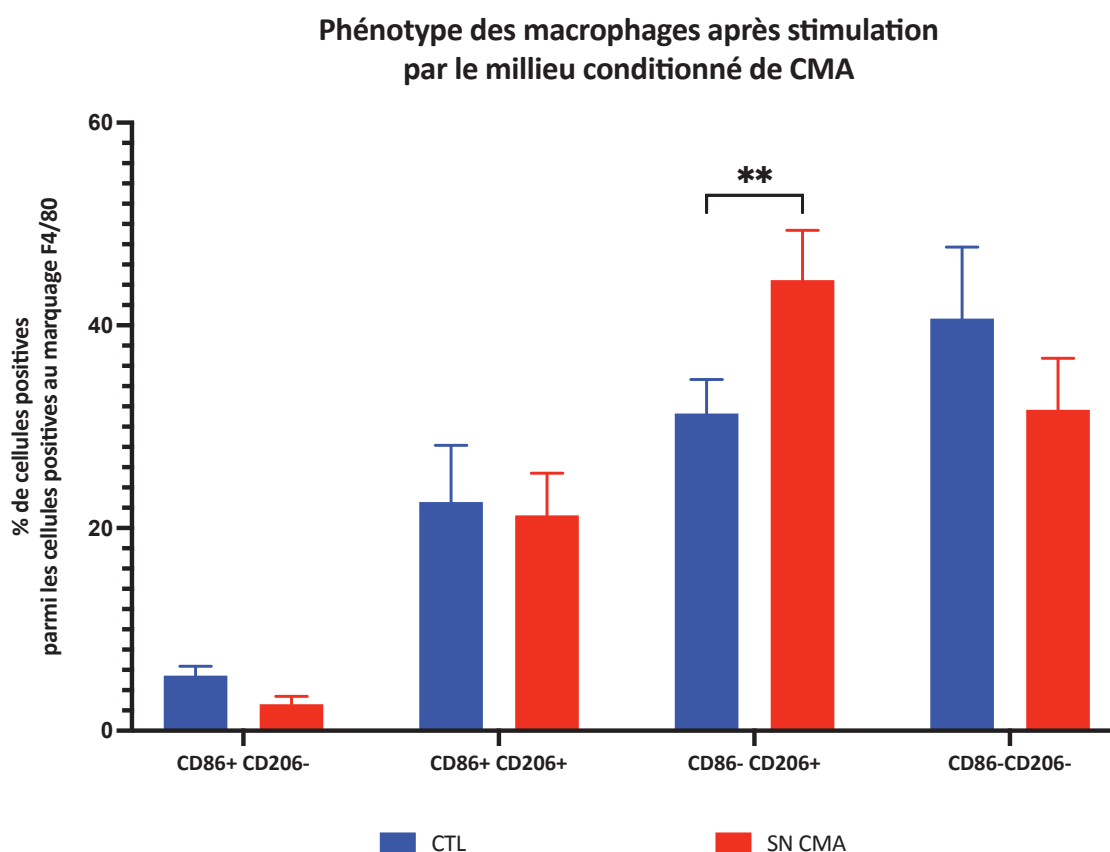


Figure 33 : Phénotypage des macrophages après stimulation avec le milieu conditionné de cardiomyocytes. Les marqueurs CD86 (macrophages pro-inflammatoires) et CD206 (macrophages anti-inflammatoires) sont utilisés pour discriminer les deux populations de macrophages. Le phénotypage est réalisé par cytométrie en flux. Résultats exprimés en % de cellules positives pour CD86 et CD206 parmi la population totale de cellules F4/80 (marqueur générique de macrophages). ** $p < 0,01$, Test de Šidák's. $n=6$.

Le milieu conditionné de CMA ayant subi une séquence HR induit une activation de macrophages non différenciés en macrophages au profil anti-inflammatoire. En effet, la proportion de macrophages CD206+CD86- est augmentée par rapport à la condition contrôle où les macrophages ne sont pas stimulés (44,5 ±4,9 % de la population totale contre 31,3 ±3,4% de la population totale, $p < 0,01$). En parallèle, une tendance à la diminution du pourcentage de macrophages doublement négatifs pour les marqueurs CD206 et CD86 est également observée (**Figure 33**).

Afin de déterminer le rôle des cytokines IL-6 et MCP-1, ainsi que celui de la voie de signalisation STAT3 dans la différenciation des macrophages, la même expérience que précédemment a été réalisée en présence d'anticorps neutralisants pour IL-6 et MCP-1 ou après l'ajout de l'inhibiteur STAT3 dans le milieu conditionné (**Figure 34**).

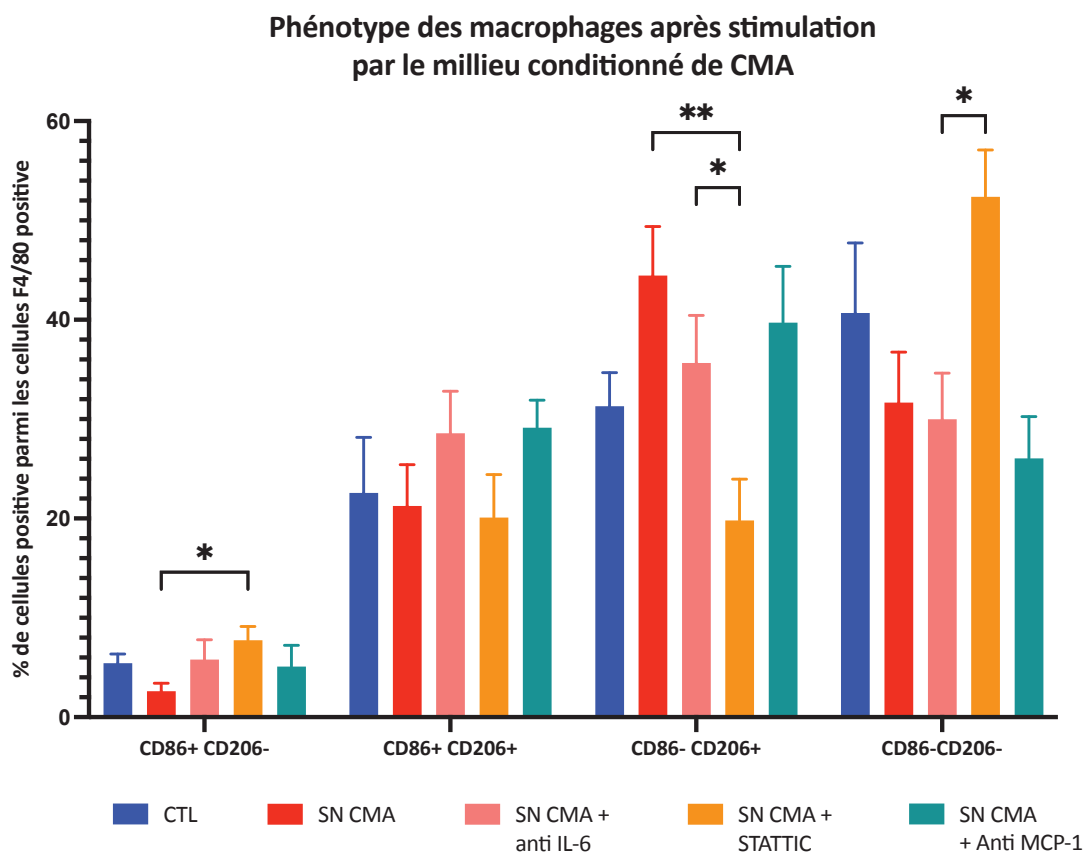


Figure 34 : Détermination du phénotype des macrophages après stimulation par le milieu conditionné de CMA avec ajout d'anticorps neutralisants anti-IL-6 ou anti-MCP-1 ou de l'inhibiteur STAT3. Analyse réalisée par cytométrie en flux. Résultats exprimés en % de cellules positives parmi les cellules positives au marquage F4/80. ** $p < 0,01$, Test de Šidák's. $n = 6$.

L'ajout d'anticorps neutralisants dirigés contre MCP-1 dans le milieu conditionné des CMA n'induit pas de différence sur le phénotype des macrophages. Une tendance à la diminution du pourcentage de macrophages CD206+ CD86- est observée dans la condition où l'anticorps neutralisant IL-6 est ajouté. L'ajout de STATTIC dans le milieu conditionné des CMA diminue le pourcentage de macrophages CD206+CD86- ($44,5 \pm 4,9$ % de la population totale dans le groupe contrôle contre $19,8 \pm 4,2$ % de la population totale, $p < 0,01$). Par ailleurs, une augmentation de la proportion de macrophages doubles négatifs et une augmentation de la proportion de macrophages CD86+CD206- sont observées dans le groupe où le traitement STATTIC est ajouté.

Les CMA sont donc capables, *in vitro*, de recruter des macrophages anti-inflammatoires. Ce recrutement est médié en grande partie par la libération des cytokines IL-6 (réduction de 32,2% du taux de recrutement avec un anticorps neutralisant anti-IL-6) et MCP-1 (réduction de 44,2% du taux de recrutement avec un anticorps anti MCP-1). La voie STAT 3 semble contribuer à ce recrutement (tendance à la baisse d'environ 40% après traitement STATTIC). Les sécrétions cytokiniques présentes dans le milieu conditionné des CMA entraînent l'activation des macrophages non différenciés en macrophages de phénotype anti-inflammatoire, en partie sous la dépendance de la voie STAT3 (réduction de 55,5% de la population CD86-/CD206+).

De façon inattendue, nous avons démontré le recrutement précoce de macrophages anti-inflammatoires dans les premières heures post-infarctus.

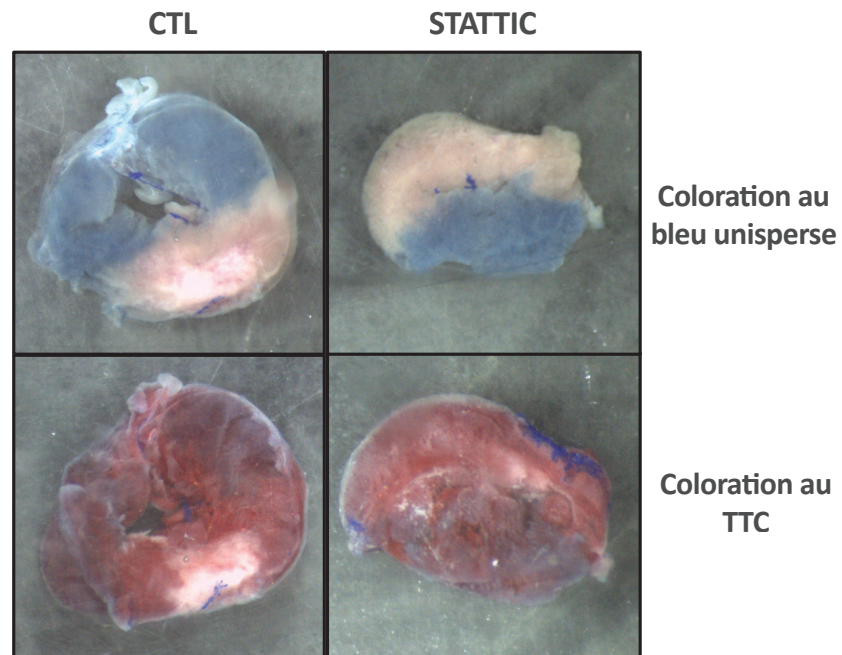
Nous nous sommes alors demandé quel effet aurait la modulation de ce recrutement précoce *in vivo*, en termes de protection contre l'infarctus.

Étant donné que la voie STAT3 participe au recrutement et la différenciation des macrophages anti-inflammatoires, nous avons évalué l'effet de l'inhibiteur STATTIC sur la taille d'infarctus *in vivo* chez la souris.

8. Évaluation de l'effet d'un traitement *in vivo* avec STAT3IC sur la taille d'infarctus

Afin d'évaluer le potentiel cardioprotecteur de la modulation de l'infiltration et de l'activation précoces des macrophages *in vivo*, un traitement avec l'inhibiteur de la voie STAT3, STAT3IC injecté 5 minutes avant la reperfusion a été réalisé dans le modèle d'infarctus du myocarde par ligature de l'artère interventriculaire antérieure. Après 24H de reperfusion, l'artère est de nouveau occluse pour la coloration au bleu unisperse et le cœur est prélevé afin de réaliser les coloration TTC.

A



B

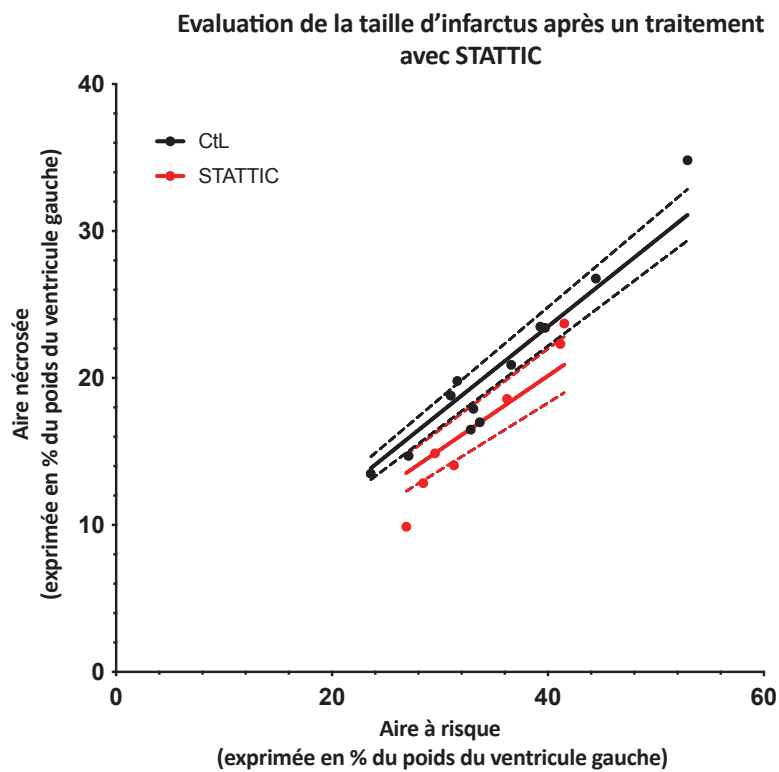


Figure 35 : Mesure de l'effet de l'inhibition pharmacologique de STAT3 sur la taille d'infarctus. Image représentative de la coloration TTC réalisée pour évaluer l'effet d'un traitement STATTIC à la reperfusion sur la taille d'infarctus évaluée à 24H (A). Calcul de la taille d'infarctus représentée par la taille de la zone nécrosée sur la taille de la zone à risque (B). n=7 traitées et n=12 contrôles.

Un traitement avec l'inhibiteur STATTIC appliqué cinq minutes avant la reperfusion entraîne une diminution significative de la taille d'infarctus évaluée par le rapport aire nécrosée divisée par l'aire à risque. En effet la taille d'infarctus mesurée dans le groupe STATTIC présente une valeur médiane de 50,3% du ventricule gauche IQR [44,9-54,3] contre 58,1% IQR [44,9-54,3] pour le groupe contrôle, $p < 0,01$ (**Figure 35**).

Ces résultats montrent donc que l'utilisation d'un inhibiteur de la voie de signalisation STAT3, utilisé au moment de la reperfusion conduit à une diminution de la taille d'infarctus (**Figure 35B**).

L'ensemble des résultats nous ont mené à étudier l'impact de l'utilisation d'un co-traitement anti-IL-6 et anti-MCP1 *in vivo* au moment de la reperfusion. Ces expériences sont en cours de réalisation et une analyse de la potentielle cardioprotection de ce traitement nous permettra de confirmer ou d'infirmer le potentiel thérapeutique de ces cibles dans le traitement de l'infarctus du myocarde en phase aiguë.

9. Bilan des résultats

Nous avons démontré dans ce travail que l'infarctus du myocarde induisait une libération massive de cytokines dans les 24 premières heures post infarctus chez le patient. Parmi ces libérations, les taux circulants d'IL-6 et de MCP-1 sont augmentés avec un pic après 24 heures de reperfusion. Nous avons montré que des taux circulants élevés de ces deux cytokines étaient associés à une augmentation de la survenue d'évènements cardiaques majeurs. L'utilisation d'un modèle murin d'infarctus du myocarde a permis de mettre en avant l'origine cardiaque de ces sécrétions, et nous avons montré que les CMA soumis à une séquence HR sécrétaient ces deux cytokines. Ces sécrétions par les CMA induisent un recrutement massif de macrophages anti-inflammatoires et une différenciation des macrophages naïfs en macrophages anti-inflammatoires. L'inhibition *in vivo* de la voie de signalisation STAT3, impliquée dans la transmission du signal de ces deux cytokines, conduit à une diminution de la taille d'infarctus mesurée à 24 heures. Ces résultats suggèrent qu'un recrutement trop précoce de macrophages anti-inflammatoires dans le cœur peut être délétère. L'ensemble de ces résultats sont résumés dans la **Figure 36**.

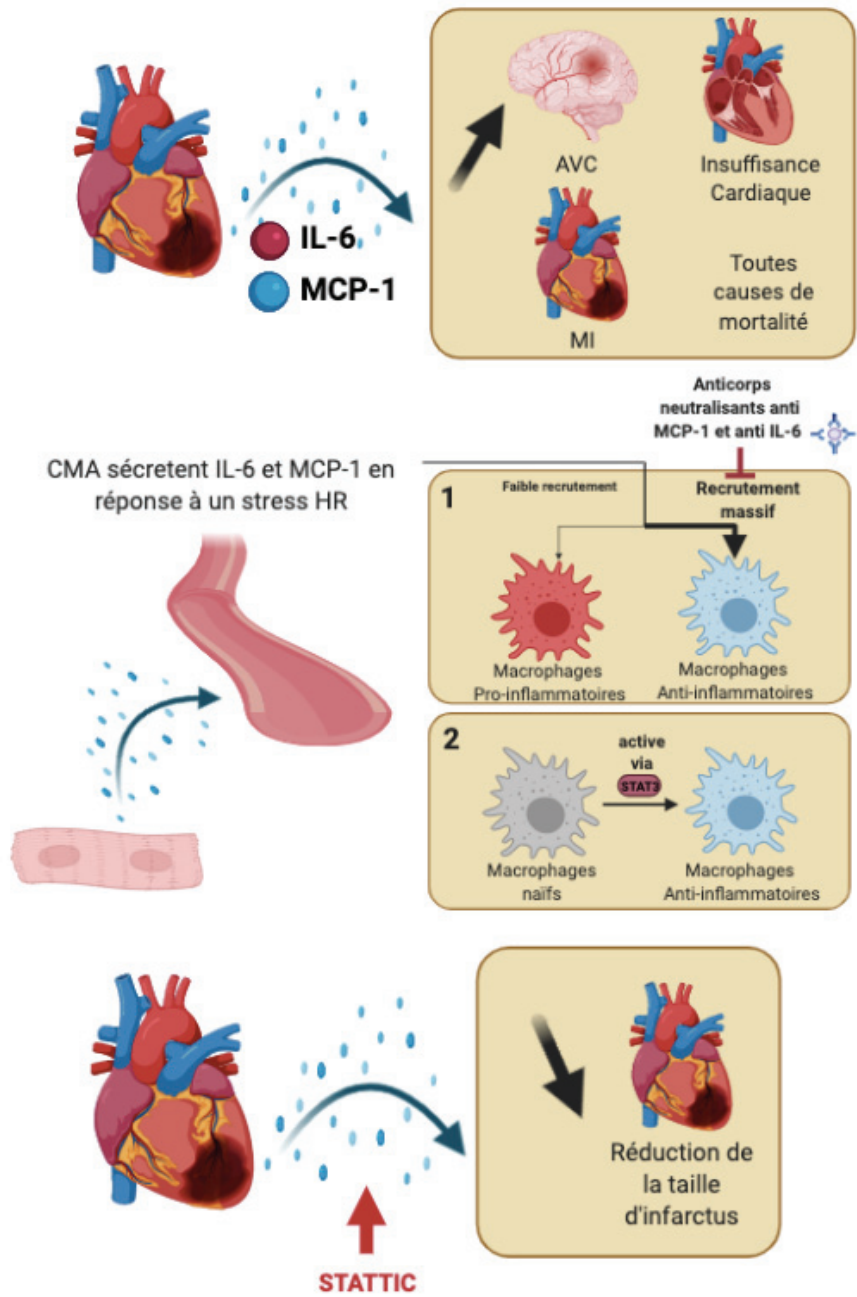


Figure 36 : Schéma bilan des résultats de thèse.

Discussions et perspectives

Un meilleur suivi du patient et un traitement plus personnalisé pourrait permettre de limiter la survenue de complications secondaires de l'infarctus.

La taille d'infarctus, mesurée par imagerie à résonance magnétique ou évaluée par la libération des enzymes cardiaques comme la troponine I, est un bon indicateur de la souffrance tissulaire et du pronostic à long terme mais n'est pas suffisant pour affiner la prise en charge du patient. La variabilité de la mesure de la fraction d'éjection ventriculaire gauche complique son utilisation courante comme excellent marqueur pronostic. Il persiste donc un réel besoin d'identifier de nouveaux marqueurs pour distinguer les patients présentant un bon pronostic à long terme et les patients dit « à risque » afin d'affiner et de personnaliser leur prise en charge thérapeutique. Une des stratégies peut-être la recherche de nouveaux biomarqueurs pronostiques circulants.

Comme évoqué lors de l'introduction, la nécessité de déterminer les cinétiques de sécrétions dans le sérum de patients des différentes cytokines est donc double :

- trouver de nouveaux biomarqueurs de pronostic
- améliorer les fenêtres thérapeutiques des cibles déjà étudiées.

L'un des points forts de notre laboratoire est d'avoir la chance de disposer de techniques et d'expertises nous permettant une approche translationnelle.

C'est avec cette démarche que nous avons dosé dans la cohorte de patient HIBISCUS STEMI un grand nombre de cytokines et marqueurs de l'inflammation tels que C-Met, HSP70, ou encore VCAM dont les résultats ont été publiés et sont présentés dans la section suivante. Cette approche a permis d'affiner la cinétique de sécrétion de certaines cytokines telles qu'IL-6 soit de déterminer pour la première fois la cinétique précoce de ces cytokines telles qu'HSP70. Certaines études ont déjà évalué les libérations de médiateurs de inflammation post infarctus et leurs associations avec les fonctions cardiaques comme pour l'IL-8²⁵³, la CRP²⁵⁴, l'IL-6²⁵⁵, MCP-1²²⁰, les neutrophiles²⁵⁶, ou encore sTNFR²⁵⁷. En revanche, les temps de prélèvements dans ces études étaient soit tardifs, soit en nombre trop faible pour définir des cinétiques précises. Malgré les différents résultats de dosages de marqueurs de l'inflammation, la plupart des stratégies thérapeutiques visant différentes cibles de l'inflammation post infarctus ont échoué à apporter des effets bénéfiques à long terme²⁵⁸. Ces

différents échecs thérapeutiques peuvent être expliqués par une initiation du traitement trop tardive ou au mauvais moment.

C'est avec le but de palier à cette limite que l'étude HIBISCUS STEMI a été mise en place. Dans cette cohorte de patients admis pour STEMI à l'hôpital Louis Pradel, une cinétique de prélèvement précise et précoce a été réalisée. En effet, comme présenté précédemment, cinq prélèvements sanguins ont été collectés durant le premier mois post infarctus permettant une évaluation des cinétiques de libération plus précise.

1. Sécrétion de MCP-1 et d'IL-6 dans les modèles d'infarctus du myocarde

Les cytokines IL-6 et MCP-1 sont des cytokines jouant un rôle central dans la pathologie de l'infarctus du myocarde. Cependant, malgré des résultats encourageants dans les différents modèles pré-cliniques, les études cliniques portant sur l'inhibition de ces deux cytokines n'ont pas apporté les résultats escomptés. Au regard de ces résultats, nous avons souhaité affiner les connaissances sur les cinétiques de libération de ces deux cytokines et leurs rôles sur la modulation de l'inflammation post infarctus dans nos différents modèles.

Nous avons montré, pour la première fois, la cinétique de libération de MCP-1 durant le premier mois post STEMI. Notre étude démontre que le pic de libération est observé à H24, suivi d'une diminution à H48. D'autres études avaient déjà réalisé une cinétique de dosage, mais sur des temps plus longs et moins précis. Ainsi, dans les études de De lemos^{219,220}, le prélèvement dans les 3,5 premiers jours induit une forte variabilité des mesures au regard de la cinétique précoce que nous avons mis en avant. Sachant que le pic de libération se situant à 24H et que nous avons mesuré un retour à des valeurs basses à 48H, un prélèvement durant les 3,5 premiers jours peut montrer des variations entre les patients mais ne correspondrait pas forcément au maximum de sécrétion de cette cytokine. En revanche, ces études ont également montré qu'un taux élevé de MCP-1 était associé à une augmentation de la survenue d'évènements cardiaques majeurs. Nous avons également montré que la cinétique de libération de MCP-1 dans un modèle pré-clinique d'ischémie-reperfusion murin présentait une allure de courbe similaire. A ce jour, une seule étude a réalisé un comparatif direct entre un modèle murin et des valeurs issues de données cliniques. Dans cette étude, le taux

protéique de MCP-1 dans le cœur de souris après une ligature permanente a été évalué et comparé à la libération sanguine de MCP-1 chez 21 patients ayant subi un infarctus²⁵⁹. En revanche, en ne reperfusant pas le tissu, l'utilisation d'un modèle d'occlusion permanente ne reflète pas réellement la pathologie de l'ischémie-reperfusion observée chez l'homme. Par ailleurs, cette étude compare une expression génique cardiaque de MCP-1 chez la souris à une expression protéique circulante chez l'homme.

De manière similaire, nous avons déterminé la cinétique précoce de libération d'IL-6 dans le sérum de patients STEMI et démontré que le pic de libération était observé après 24H. Par ailleurs, les patients présentant un taux circulant d'IL-6 à H24 supérieur à la médiane de la population présentent un risque plus élevé de survenue d'évènements cardiaques majeurs (Hazard ratio 2,225). Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans l'étude SOLID-TIMI 52, incluant 4939 patients ayant subi un infarctus du myocarde STEMI, un infarctus NSTEMI, ou une angine de poitrine dans les trente jours précédant l'inclusion. Dans cette étude, les patients souffrant de la survenue d'évènements secondaires majeurs présentent une valeur médiane d'IL-6 supérieure par rapport aux patients n'ayant pas subi d'évènements. De manière intéressante, dans cette étude le nombre de patients ayant subi un STEMI comme évènement responsable de l'inclusion dans l'étude est plus élevé dans le quartile de patients avec un taux d'IL-6 le plus élevé²⁶⁰. Nos résultats montrent une libération très rapide d'IL-6, or les différentes stratégies thérapeutiques entreprises notamment avec un traitement au Tocilizumab ont porté sur un traitement dans les 24 premières heures au plus tôt mais non dans les premières heures post-infarctus. En effet, si dans notre cohorte le pic de sécrétion est mesuré à 24H, nous avons une augmentation progressive du taux circulant d'IL-6 qui est plus précoce. L'initiation du traitement est peut-être trop tardive par rapport à la cinétique de sécrétion et réaliser le traitement dès la reperfusion pourrait s'avérer plus bénéfique en limitant l'augmentation du taux circulant d'IL-6 dès les premières heures. En ce sens, les résultats de l'étude ASSAIL-MI²⁶¹ présentés récemment en congrès sont encourageants. Dans cette étude visant à étudier l'effet d'une injection de Tocilizumab avant la reperfusion dans une cohorte de patients STEMI, un traitement au Tocilizumab a conduit à une augmentation du « myocardial salvage index », estimant la récupération, évalué à sept jours par rapport au traitement placebo (69% vs. 64% p=0.042). Ces résultats, s'ils sont confirmés par une publication, montrent que l'utilisation du traitement Tocilizumab au bon moment peut

présenter des effets bénéfiques. Une étude à plus grande échelle avec un suivi des patients à long terme permettrait de préciser cet effet.

Les résultats de notre étude sont donc très instructifs, cependant une analyse sur une cohorte plus large et multicentrique peut être envisagée afin d'apporter de la puissance à ces résultats. D'un point de vue translationnel, l'utilisation d'un modèle chirurgical d'infarctus du myocarde induit un biais que l'on doit prendre en considération. En effet, dans une étude collaborative nous avons montré que la procédure chirurgicale seule induit une réponse inflammatoire dans le cœur et une activation génique importante, avec IL-6 comme acteur central²⁹. L'effet de la procédure chirurgicale, qui n'est pas réalisée chez le patient est donc à prendre en considération dans nos conclusions. C'est la raison pour laquelle, dans nos expériences, les résultats sont comparés à un groupe SHAM à chacun des temps de prélèvement afin de s'assurer que les sécrétions observées soient bien la conséquence d'un stress d'ischémie-reperfusion.

Nous avons démontré dans cette étude, avec l'analyse des niveaux d'expression d'ARN messager de MCP-1 et IL-6 dans la zone à risque normalisés par la zone saine, que ces niveaux d'expression étaient augmentés après une séquence d'ischémie-reperfusion. Avec la mesure de sécrétion de ces deux protéines par les CMA soumis à un stress d'hypoxie-réoxygénation, nous avons montré que, à *minima*, une partie des protéines IL-6 et MCP-1 retrouvées dans la circulation sanguine résultent d'une sécrétion locale par les CMA. Si la sécrétion d'IL-6 par les CMA avait déjà été démontrée dans d'autres modèles d'hypoxie-réoxygénation^{262,263}, aucune publication à notre connaissance n'a fait part de la sécrétion de MCP-1 par les CMA adultes primaires. Les CMA sont plutôt décrits comme cellules contractiles mourant lors de l'infarctus et activant les cellules sécrétrices environnantes. Ce résultat très intéressant nous a donc poussé à évaluer la capacité des CMA à recruter des macrophages.

2. Recrutement de macrophages anti-inflammatoires

Nos résultats ont démontré que les CMA seuls, *in vitro*, sont capables en réponse à un stress d'hypoxie-réoxygénation d'induire un recrutement de macrophages. Ces CMA recrutent préférentiellement des macrophages de phénotype anti-inflammatoire. Jusqu'ici, la cinétique

de recrutement de cellules immunitaires était plutôt décrite comme suit : les CMA souffrant libèrent des DAMPs, activant les macrophages, les cellules immunitaires résidentes et les autres cellules résidentes telles que les fibroblastes, qui eux transmettent le signal de recrutement des monocytes circulants. Nous avons montré ici que les CMA seuls sont en mesure de recruter des macrophages dans les premières heures post-ischémie. Ces résultats, certes *in vitro* mais obtenus à partir d'un modèle de CMA primaires adultes soumis à une séquence d'hypoxie-réoxygénation ouvre une nouvelle cible cellulaire pour la régulation de l'infiltration de cellules immunitaires. Nous pourrions alors imaginer à très long terme une stratégie visant à limiter uniquement les sécrétions des CMA. Ce type de stratégie a déjà été envisagée avec pour cible les cellules hématopoïétiques avec une injection de nanoparticules en polymère lipidique encapsulant des petits ARN interférants²⁶⁴.

L'utilisation du modèle *in vitro* de recrutement peut permettre un criblage rapide et large de différentes molécules visant à réguler le recrutement et l'infiltration des macrophages. Nous avons fait le choix de se concentrer dans cette étude uniquement sur les CMA mais, toutes les techniques développées et toutes les stratégies envisagées dans ce travail sont transposables à d'autres sous types cellulaires cardiaques tels que les cardiofibroblastes ou les cellules endothéliales. Ce modèle méthodologique pourra donc être utilisé en routine au laboratoire pour réaliser différents tests pharmacologiques.

Le recrutement précoce de macrophages anti-inflammatoires observé *in vitro* est retrouvé *in vivo* avec un recrutement massif de macrophages positifs au marquage CD206. L'utilisation de la récente méthode de transparence d'organes permet d'imager et de quantifier l'infiltration des macrophages en trois dimensions dans l'organe entier. Cependant, la difficulté majeure de cette technique réside dans le fait de trouver des anticorps primaires adaptés pour l'immunohistochimie en trois dimensions. Malheureusement, malgré les tests réalisés avec une quinzaine d'anticorps différents, aucun marquage spécifique de macrophages pro-inflammatoires n'a fonctionné. Ainsi, ces résultats nous permettent uniquement de démontrer qu'une infiltration massive de macrophages anti-inflammatoires est présente mais ne peut être comparée à la proportion de macrophages pro-inflammatoires. Afin de contourner cette limitation, une stratégie de double marquage a été envisagée avec un marquage avec l'anticorps F4/80 permettant de révéler l'ensemble des macrophages et un marquage avec l'anticorps CD206 ciblant les macrophages à profil anti-inflammatoire. Une

analyse des populations doublement marquées comparée aux populations simplement marquées permettra d'évaluer les proportions de macrophages anti-inflammatoires parmi l'ensemble de la population de macrophages.

Très peu d'études ont réalisé un marquage trois dimensions d'une infiltration immunitaire cardiaque après un stress d'ischémie-reperfusion. Merz *et al* ont montré un recrutement des neutrophiles immunomarqués avec le marqueur LY6G. Dans cette étude, la quantification de l'infiltrat par la technique d'imagerie ne présente pas de différence significative avec la quantification réalisée par cytométrie en flux après digestion du cœur. En revanche, dans cette étude, une imagerie des macrophages avec le marqueur commun F4/80 a été réalisée mais la quantification est réalisée uniquement par cytométrie en flux²⁶⁵. L'avantage majeur de la technique que nous avons développée au laboratoire est qu'elle permet une quantification différentielle dans les différentes zones du cœur, que ce soit zone à risque, ou encore le ventricule sain. Cette technique nous permet également de différencier les macrophages infiltrés dans le tissu de ceux présents dans les vaisseaux sanguins. Cette différenciation n'est pas réalisable par la technique de cytométrie en flux.

Nos résultats *in vitro* et *in vivo* suggèrent qu'une première réponse anti-inflammatoire, très rapide est induite au moins en partie par les sécrétions des CMA. Cette réponse anti-inflammatoire précoce dans les 24 premières heures peut devenir une cible thérapeutique intéressante pour la modulation des événements à plus long terme.

3. Rôle cardioprotecteur de l'inhibition de la voie de signalisation STAT3

Nos résultats *in vitro* montrent que l'utilisation de STATTIC, inhibiteur de la voie de signalisation STAT3, réduit significativement le pourcentage de macrophages naïfs induit en macrophages anti-inflammatoires par le milieu conditionné de CMA. Par ailleurs, l'utilisation de STATTIC conduit à une tendance à la diminution du recrutement *in vitro* de macrophages anti-inflammatoires. La voie de signalisation STAT3 est impliquée dans la modulation de l'inflammation, jouant un rôle à la fois dans le recrutement des cellules immunitaires et dans la différenciation des macrophages. En effet, le recrutement des neutrophiles est modulé par

la voie IL-6-STAT3 et une sur-activation continue du récepteur de l'IL-6, le récepteur GP130 conduit à une réduction de production de CXCL1, conduisant à une accélération de l'élimination des neutrophiles²⁶⁶. La voie de signalisation STAT3 est également impliquée dans le recrutement des macrophages. Ce recrutement au niveau cardiaque requiert la sécrétion de Reg3 β qui est sous la dépendance du facteur de transcription STAT3²⁶⁷. Nous avons également confirmé dans nos conditions que la voie de signalisation STAT3 était impliquée dans la polarisation des macrophages en profil anti-inflammatoire tel que démontré précédemment après infarctus²⁶⁸ ou dans des mécanismes de preconditionnement^{269,270}. Ces résultats *in vitro* nous ont poussé à évaluer l'effet *in vivo* d'un traitement par STATTIC cinq minutes avant la reperfusion afin de déterminer l'effet de la modulation de la population de macrophages plutôt anti-inflammatoire sur la taille d'infarctus. A ce jour, les études évaluant l'effet du traitement par STATTIC ont porté uniquement sur des modèles de conditionnement ischémique *ex vivo*²⁷¹ ou *in vivo*²⁷². Dans ces études, l'utilisation de STATTIC réduit l'effet protecteur du conditionnement. En revanche, dans l'étude de Das et al., les résultats suggèrent également que l'inhibition de la voie de signalisation STAT3 conduit à une légère diminution de la taille d'infarctus dans la condition ischémie-reperfusion. Plusieurs études ont également porté sur des modèles de délétion génétique de STAT3. Ainsi, une délétion génétique de STAT3 conduit à une augmentation de la taille d'infarctus dans différents modèles animaux²⁷³ et une détérioration des fonctions cardiaques post infarctus²⁷⁴. Comme présenté dans l'introduction, la voie de signalisation STAT3 est impliquée dans les mécanismes de protection par le conditionnement. Un modèle de délétion cardiaque de STAT3 inhibe l'effet protecteur du preconditionnement²⁷⁵ et augmente la fibrose post infarctus²⁷⁶. En revanche, des résultats montrent que différents protocoles de post conditionnement n'ont pas le même effet, une séquence de post conditionnement ischémique de 3*10 minutes n'entraîne pas de diminution de taille d'infarctus dans un modèle de souris avec une délétion de STAT3 dans les CMA mais une séquence de 5*5 minutes elle réduit la taille d'infarctus²⁷⁷. Ces résultats soulignent une fois de plus l'importance de comprendre les cinétiques d'évènements mis en jeu post infarctus. Il est également nécessaire de garder à l'esprit que STAT3 présente un état basal d'activation dans des conditions cellulaires normales. Ainsi, avec l'utilisation de modèles de délétion génétique, il est impossible d'attribuer l'effet observé à l'activité basale de STAT3 ou à son activité dans les conditions d'ischémie-reperfusion.

Pour notre étude, nous avons choisi un temps de traitement au moment de la reperfusion pour plusieurs raisons. Nos résultats *in vivo* montrent que les taux circulants d'IL-6 et de MCP-1 augmentent dès la reperfusion et atteignent leur pic à trois heures. Ainsi nous avons voulu initier le traitement avant ce pic. Par ailleurs notre choix du post conditionnement s'est porté par rapport à son atout translationnel, puisque dans le cadre du STEMI, le seul traitement applicable est le post conditionnement. Les résultats de cette étude ont démontré que l'utilisation de STATTIC au moment de la reperfusion conduisait à une diminution significative de la taille d'infarctus évaluée à 24H par la méthode de TTC. Ces résultats suggèrent donc qu'un recrutement majeur de macrophages anti-inflammatoires dans le cœur infarcté durant la phase très précoce pourrait être délétère. Ces résultats devront être confirmés par le phénotypage par cytométrie en flux des macrophages infiltrés dans le cœur afin de s'assurer que le traitement STATTIC *in vivo* a bien eu pour effet de diminuer l'infiltration et/ou la différenciation des macrophages anti-inflammatoires *in vivo*.

Les résultats de notre étude montrent, de manière contre intuitive, qu'une activation trop précoce des mécanismes anti-inflammatoires pourrait être plus délétère que bénéfique. La régulation de l'infiltration de macrophages anti-inflammatoires dans le cœur post infarctus a déjà été étudiée avec des résultats parfois contradictoires. Ainsi, une injection d'IL-4, cytokine anti-inflammatoire induisant la différenciation des macrophages en macrophages anti-inflammatoires favorisant la résolution de l'inflammation, 24H après l'infarctus du myocarde dans un modèle murin n'a pas montré d'effet bénéfique²⁷⁸. Une déplétion des macrophages anti-inflammatoires, avant l'infarctus du myocarde a été montrée comme délétère²⁷⁹. En revanche, dans cette étude, la déplétion est réalisée avant l'infarctus et induit une déplétion des macrophages exprimant CD206, marqueur également exprimé par les macrophages résidents²⁰⁰. Ainsi cette étude montrerait surtout que la déplétion des macrophages résidents est délétère. Les résultats d'une délétion génétique de la protéine Yes associated protein (YAP) et du co-activateur de transcription PDZ binding (TAZ) montre une diminution de la réponse pro-inflammatoire et une augmentation de la réponse anti-inflammatoire à l'infarctus, avec une augmentation du nombre de macrophages anti-inflammatoires après six jours post infarctus. Ces délétions entraînent une réduction de la fibrose et une amélioration des fonctions cardiaques²⁸⁰, mais l'augmentation du nombre de macrophages anti-inflammatoires est plus tardive.

Nos résultats, ainsi que les différents résultats de la littérature soulignent bien l'importance du choix du temps d'application du traitement et de l'équilibre inflammatoire post infarctus. Les deux profils, pro-inflammatoire et anti-inflammatoire sont nécessaires, mais leur fine régulation peut permettre une amélioration des fonctions cardiaques à long terme et donc une amélioration de la survie des patients.

L'avantage principal de nos travaux réside dans l'aspect translationnel de notre étude qui nous a permis d'utiliser le traitement au bon moment afin d'optimiser son efficacité. En revanche, pour des raisons techniques, nous avons utilisé la méthode classique de mesure de taille d'infarctus afin d'évaluer la potentielle cardioprotection. Il aurait été intéressant de mesurer les fonctions cardiaques et la survie à long terme de nos animaux. En effet, la taille d'infarctus n'est pas le seul facteur influençant sur la survenue des évènements secondaires majeurs. Une sous analyse de l'étude CIRCUS à montrer que le composite de plusieurs variables (impliquant le genre, la présence d'hypertension, la dysfonction rénale, le statut de reperfusion et les traitements post PCI avec bêtabloquant ou inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) a un poids plus important dans la survenue d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque ou dans la mortalité par rapport à la taille d'infarctus seule, 82% contre 18% respectivement²⁸¹. Par ailleurs, au niveau clinique, la survie après un premier infarctus est assez bonne mais la mortalité associée demeure élevée par les complications secondaires telles que le développement d'insuffisance cardiaque, ou une récurrence d'infarctus. Dans le développement de ces complications secondaires, l'inflammation joue un rôle central. En effet l'infarctus du myocarde lui-même accélère le développement d'athérosclérose²⁸², et l'inflammation joue un rôle majeur dans le développement d'insuffisance cardiaque²⁸³ et de complication²⁸⁴. Par ailleurs, la survenue d'infarctus active les macrophages résidents des autres organes tels que le cerveau ou les poumons, induisant un changement du profil transcriptomique de ces macrophages²⁸⁵. Il existe donc un effet à distance de l'activation des macrophages par un stress d'ischémie-reperfusion qui peut s'avérer important dans la mise en place des complications secondaires distantes tels que la survenue d'AVC. L'ensemble de ces éléments démontrent qu'une meilleure compréhension de l'inflammation post infarctus est encore nécessaire pour améliorer la qualité de vie des patients post infarctus.

4. Perspectives générales

Ce projet de thèse a initié un axe de recherche au sein du laboratoire centré sur l'inflammation post infarctus. Pour les prochaines études, il apparaît nécessaire de se rapprocher de la diversité clinique. Ainsi, il serait intéressant d'intégrer dans les cohortes animales plusieurs facteurs confondants tels que l'utilisation des deux sexes, d'animaux de différents âges, de modèles d'animaux insuffisants cardiaques...²⁸⁶ Nous avons engagé cette perspective de travail dans une étude portant sur le statut diabétique et son effet sur la taille d'infarctus²⁸⁷. Dans cette étude, nous avons montré que les patients diabétiques traités ne présentent pas de différences de taille d'infarctus par rapport aux patients non diabétiques. En revanche, la taille d'infarctus est augmentée après un infarctus chez des souris souffrant d'un diabète de type 2 non traité en comparaison à des souris contrôles. L'utilisation d'un traitement antidiabétique avec la metformine conduit à une diminution de la surmortalité des CMA observée *in vitro* dans les CMA issus de souris diabétiques par rapport aux souris contrôles. Ainsi le diabète induit une augmentation des lésions d'ischémie-reperfusion mais son traitement réduit cette augmentation. Ces résultats suggèrent donc que les différentes médications des patients, en plus des facteurs de comorbidité doivent être pris en considération dans nos modèles animaux afin de se rapprocher au plus près de la réalité clinique. Cette intégration des traitements, apportés aux patients, dans notre modèle pré-clinique peut être initiée avec l'inclusion des traitements administrés de manière permanente au patient au moment de la reperfusion tels que les antiagrégants plaquettaires.

En conclusion, l'inflammation dans les maladies cardiovasculaires est un domaine vaste qui présente une multitude de cibles thérapeutiques intéressantes pour le futur. Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu est encore nécessaire pour envisager une stratégie thérapeutique efficace.

Publications

1. Publications en lien avec le projet de thèse

1.1. *A Dynamic Transcriptional Analysis Reveals IL-6 Axis as a Prominent Mediator of Surgical Acute Response in Non-ischemic Mouse Heart*

a) *Introduction*

Le but de cette étude collaborative était de déterminer les gènes impactés par la procédure chirurgicale utilisée pour le modèle pré-clinique d'infarctus du myocarde. Cette étude transcriptomique dynamique (trois temps de prélèvement) qui faisait l'objet du sujet de thèse du Dr Badawi a révélé la cytokine IL-6 comme médiateur majeur des effets de la procédure chirurgicale sur les modulations transcriptionnelles observées dans le cœur. En effet, la procédure chirurgicale induit un changement du niveau d'expression de 1209 transcrits. Une analyse dynamique de ces transcrits a montré que les transcrits co-régulés positivement au temps 45 minutes sont principalement impliqués dans l'activation de voies de signalisation et ceux co-régulés positivement à 24H sont impliqués dans les voies de recrutement des neutrophiles et dans la différenciation des macrophages. Une analyse de la prédiction des facteurs de transcription régulés par les transcrits exprimés différenciellement et des interactions protéine-protéine ont révélé IL-6 comme acteur central. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* par l'évaluation du niveau circulant d'IL-6 et l'analyse du phénotype des macrophages cardiaques à 0H post chirurgie et 24H post chirurgie.

J'ai réalisé dans cette étude les mesures de taux circulant d'IL-6 *in vivo* ainsi que l'isolation des cellules immunitaires cardiaques et l'évaluation de leurs phénotypes par cytométrie en flux.



A Dynamic Transcriptional Analysis Reveals IL-6 Axis as a Prominent Mediator of Surgical Acute Response in Non-ischemic Mouse Heart

Sally Badawi^{1,2,3}, Alexandre Paccalet¹, Zeina Harhous^{1,2,3}, Bruno Pillot^{1,2}, Lionel Augeul^{1,2}, Fabien Van Coppenolle^{1,2}, Joel Lachuer^{4,5}, Mazen Kurdi³, Claire Crola Da Silva^{1,2}, Michel Ovize^{1,2} and Gabriel Bidaux^{1,2*}

¹ INSERM 1060, INRA 1397, INSA Lyon, CarMeN Laboratory, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, Lyon, France, ² IHU OPeRa, Groupement Hospitalier EST, Bron, France, ³ Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Department of Chemistry and Biochemistry, Doctoral School of Sciences and Technology, Faculty of Sciences, Lebanese University, Beirut, Lebanon, ⁴ ProfileXpert, SFR-Est, CNRS UMR-S3453, INSERM US7, University of Lyon, Lyon, France, ⁵ Inserm U1052, CNRS UMR 5286, Cancer Research Center of Lyon, Lyon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Maximino Aldana,
National Autonomous University
of Mexico, Mexico

Reviewed by:

Alessandro Giuliani,
National Institute of Health (ISS), Italy
Debashis Sahoo,
University of California, San Diego,
United States

*Correspondence:

Gabriel Bidaux
gabriel.bidaux@univ-lyon1.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Systems Biology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 11 April 2019

Accepted: 15 October 2019

Published: 31 October 2019

Citation:

Badawi S, Paccalet A, Harhous Z,
Pillot B, Augeul L, Van Coppenolle F,
Lachuer J, Kurdi M, Crola Da Silva C,
Ovize M and Bidaux G (2019) A
Dynamic Transcriptional Analysis
Reveals IL-6 Axis as a Prominent
Mediator of Surgical Acute Response
in Non-ischemic Mouse Heart.
Front. Physiol. 10:1370.
doi: 10.3389/fphys.2019.01370

Background: Ischemic heart diseases are a major cause of death worldwide. Different animal models, including cardiac surgery, have been developed over time. Unfortunately, the surgery models have been reported to trigger an important inflammatory response that might be an effect modifier, where involved molecular processes have not been fully elucidated yet.

Objective: We sought to perform a thorough characterization of the sham effect in the myocardium and identify the interfering inflammatory reaction in order to avoid misinterpretation of the data via systems biology approaches.

Methods and Results: We combined a comprehensive analytical pipeline of mRNAseq dataset and systems biology analysis to characterize the acute phase response of mouse myocardium at 0 min, 45 min, and 24 h after surgery to better characterize the molecular processes inadvertently induced in sham animals. Our analysis showed that the surgical intervention induced 1209 differentially expressed transcripts (DETs). The clustering of positively co-regulated transcript modules at 45 min fingerprinted the activation of signalization pathways, while positively co-regulated genes at 24 h identified the recruitment of neutrophils and the differentiation of macrophages. In addition, we combined the prediction of transcription factors (TF) regulating DETs with protein-protein interaction networks built from these TFs to predict the molecular network which have induced the DETs. By mean of this retro-analysis of processes upstream gene transcription, we revealed a major role of the IL-6 pathway and further confirmed a significant increase in circulating IL-6 at 45 min after surgery.

Conclusion: This study suggests that a strong induction of the IL-6 axis occurs in sham animals over the first 24 h and leads to the induction of inflammation and tissues' homeostasis processes.

Keywords: heart damage, inflammation, transcriptomics, kinetical analysis, interleukin 6

INTRODUCTION

In the widely used mouse or rat *in vivo* models of acute myocardial infarction, access to the heart requires chest opening usually following either sternotomy or rib breaking. These surgery interventions, as well as the time delay up to the end of the experiment, trigger local and systemic reaction that might act as a confounding factor when exploring the pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. Michael et al. (1985) reported that surgical trauma induces the release of glycogen phosphorylase and creatine kinase enzymes in the lymph of dogs subjected to open-chest surgery. Nossuli et al. (2000) showed that surgical procedure induces significant variations in the expression profiles of inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α , in mouse heart. Genomic profiling of the mouse blood cells at 6 h post-surgery displayed a noteworthy change in the gene expression profiles (Coon et al., 2010). More recently, a study by Hoffmann et al. (2014) showed that sham-operated and MI animals display a similar monocyte and granulocyte circulation pattern over time, resulting in a background inflammatory response which prohibited the assessment of the MI-induced inflammatory response.

Unfortunately, myocardial transcriptomic studies seldom analyzed the gene modifications induced by the surgery procedure itself (Harpster et al., 2006; Roy et al., 2006) and to the best of our knowledge the influence of the “cytokine storm” on the modification of genes expression in cardiac cells has not been deciphered.

Therefore, we combined freely available R packages and databases in order to analyze a kinetic dataset of sham animals in order (1) to identify immune cells recruitment and differentiation in the acute phase (within first 24 h after surgery), and, (2) to identify the main cytokine/signalization pathways/transcription factors controlling the modifications in DETs. Our pipeline includes sorting out differential expressed transcripts, gene ontology analysis, time-dependent clustering of co-regulated transcripts, cross-identification of transcription factors (TFs) involved in the expression of transcript clusters and finally prediction of TFs-based protein-protein interaction (PPI) networks.

In one hand, we took advantage of the gene clustering achieved by weighted gene co-expression network analysis WGCNA (Langfelder and Horvath, 2008) to isolate the different temporal groups of transcripts prior to analyzing their GO terms and comparing them to the ones predicted from the whole list of DETs. We identified inflammation and immune responses as major biological processes that involved neutrophil, monocyte and macrophage cell markers. In the other hand, we figured out the history of DETs by retrieving the TFs most likely involved in DETs regulation prior to predicting the most probable PPI networks that could rule the activity of the highly enriched TFs. As a result, we identified a group of highly similar networks whose main characteristic was to predict a master role of interleukine-6 (IL-6) as a regulator of the selected TFs and DETs. We validated these numerical predictions by measuring IL-6 in the plasma of mice subjected to the transcriptomic analysis where a strong induction 45 min post-surgery was

detected. Throughout our transcriptomic analysis and functional validation, we confirmed that surgery *per se* induces a strong inflammatory response. It also induces the recruitment of neutrophils to the myocardium and macrophages' phenotypic changes at 24 h through the IL-6 signalization pathway.

MATERIALS AND METHODS

Mouse Surgery Model

Male C57BL/6J mice, aged 8–12 weeks and weighing 20–30 g were obtained from Charles River Laboratories (Larbesle, France). Mice were housed in the animal facility of the laboratory in a controlled environment with standard cycle of 12 h light/12 h dark and had free access to water and standard diet. Animals were anesthetized with pentobarbital (73 mg/kg) intraperitoneally accompanied with (0.075 mg/kg) of buprenorphine as an analgesic. Mice were intubated orally and ventilated via a rodent ventilator. Rectal thermometer was used to monitor body temperature that was maintained within normal range by means of a heating pad. Left thoracotomy was performed and a small curved needle with an 8-0 polypropylene suture was passed, under a Euromex microscope, around the left anterior descending coronary artery. The suture was not tied and was removed after 0 or 45 min. A third group of mice underwent chest closure after 45 min and were kept alive for 24 h post-surgery.

This study was approved by the Ethics Committee of the Université Claude Bernard Lyon 1 (Approval number DR2017-48) in compliance with NIH Guide on the Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

Tissue Collection and RNA Extraction

Animals ($n = 8$ per time point) were randomly assigned to each group. At $t = 0$, 45 min, and 24 h post-surgery, mice were anesthetized and euthanized, hearts were harvested and the left ventricle was dissected to maximally provide the myocardium known to be at risk in ischemic hearts. Myocardium samples were placed in RNAlater stabilizing solution (Ambion, Thermo Fisher Scientific) and stored at -80°C until use.

RNA was extracted by Tripure reagent solution (Roche), treated with Proteinase K (Qiagen) and purified by RNeasy Mini kit (Qiagen) where DNase I (Qiagen) is treated on column. RNA purity, quantity and integrity were assessed both by spectrophotometry (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies) and nanoelectrophoresis (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies). RNA purity: $A_{260}/_{280} \sim 1.8$ and $A_{260}/_{230} \sim 2$ and RNA integrity number: 8–10.

RNA Sequencing

Purified RNA samples were provided to ProfileXpert, Inc., for library construction and sequencing. Quality and quantity checks were performed by means of Fragment Analyzer (Agilent) and QuantiFluor RNA dye (Promega). Library construction was carried out using NextFlex Rapid Directional mRNA-Seq (BioScientific, PerkinElmer Company) following the manufacturer protocol. Libraries were applied to an Illumina flow cell High and run on the Illumina Nextseq 500 as a single end read for 76 pb.

On average, 12 samples were loaded to each flow cell. Image analysis and base calling was carried out using the NCS 2.0.2 and RTA 2.4.11 Illumina software suite implemented on the Illumina sequencing machine. Final file formatting, demultiplexing, and fastq generation were carried out using Bcl2fastq v2.17.1.14.

Bioinformatic Analysis

Trimming of reads was performed using cutadapt v1.9.1 software (Martin, 2011). Then the reads were mapped to the mm10 genome using TopHat v2.1.0 (Kim et al., 2013) software with default parameters (bowtie 2.2.9; Langmead and Salzberg, 2012). Reads were counted using htseq-count v0.6.0 software to generate raw counts.

Several pipelines and software packages have been developed to aid in the management and analysis of the high throughput data. These packages differ considerably in their analytical pipeline, statistical model (Robinson and Smyth, 2007; Tarazona et al., 2015) and normalization tool (Bullard et al., 2010; Robinson et al., 2010; Trapnell et al., 2012; Rapaport et al., 2013; Love et al., 2014; Evans et al., 2017). The choice between the normalization methods strongly influences the differential expression analysis (Burden et al., 2014), where EdgeR and DESeq2 are the most frequently used ones (Lamarre et al., 2018). In our study, differentially expressed transcripts (DET) were computed with DESeq2 (Love et al., 2014) package version 1.20.0 supplied by R software (version 3.4.4) (R Core Team, 2019) via a likelihood ratio test implemented in *DESeq* function. For all the analysis, we kept transcripts with FDR less than 0.05 corrected via the Benjamini–Hochberg method (Benjamini and Hochberg, 1995).

Transformed counts by DESeq2 were visualized with a principal component analysis (PCA) [*prcomp()*] in R. PCA is a dimensionality reduction method that maximizes the variability explained by the newly formed dimensions. 1–3 dimensions known by principal components (PC) can be chosen to represent the data, where each PC is orthogonal to the other (Abdi and Williams, 2010; Lever et al., 2017).

To construct transcript co-expression network, we ran the *cutreeDynamic* function of the (WGCNA) R package (version 1.63) (Langfelder and Horvath, 2008) on the matrix of normalized counts for the DETs identified with DESeq2.

The matrix of normalized counts was computed with the *varianceStabilizingTransformation* function of the DESeq2 package. WGCNA applies PCA where the first PCs of each formed module are called eigengenes. Soft threshold (beta) that represents the exponential parameter for power law distribution was chosen based on a scale free topology criterion. Adjacency matrix was constructed and then transformed into a topological overlap matrix. Transcripts were hierarchically clustered using the *flashClust* function and clusters of transcripts having similar profiles, referred to as modules, were formed.

Gene Ontology Analysis

Differentially expressed transcripts were subjected to functional enrichment analysis by STRING software version 10.5¹ (Franceschini et al., 2013). Hypergeometric tests are used

¹<https://string-db.org/>

to identify enriched terms that are sorted by their FDR. GO terms with $FDR < 10^{-4}$ were kept for further analysis. We have proposed a score, named *z*-score (*z*), to measure the enrichment of the GO terms in modules as follows:

$$z = \frac{(x - 0.5 - \frac{B \times n}{N})}{\sqrt{n \times \frac{B}{N} \times (1 - (\frac{B}{N}))}} \quad (1)$$

x: count of observed transcripts in each GO term of module.

B: count of observed transcripts in each GO term of DETs.

n: total count of observed transcripts in module.

N: count of DETs.

Our *z*-score estimates whether a given GO term is enriched in a gene module compared to all DETs and is thus assessing whether a module is clustering genes involved in a common biological process. We assumed that a GO term is enriched in a certain module if *z*-score > 2.

Transcription Factor Enrichment Analysis

oPOSSUM 3.0 (Kwon et al., 2012), a freely available web accessible software was used to identify enriched transcription factors binding sites (TFBSs) in the 5000 bp upstream and downstream sequence of the DETs. Default search parameters of the single site analysis were kept as they are originally set in the software. oPOSSUM performs an exact Fisher test which measures the probability of a non-random association between the co-expressed gene/transcript set and the TFBS of interest and calculate a *F*-score as equal to $-\ln(p\text{-value})$. *F*-score is thus assessing the probability that at least one TFBS would be significantly associated with the observed transcript list. Besides, a *z*-score is calculated using the normal approximation to the binomial distribution to compare the rate of occurrence of a TFBS in the target set of genes/transcripts to the expected rate estimated from the pre-computed background set. Thus, the *z*-score is estimating the specific enrichment of given TFBS in the gene/transcript set compared to background gene set. TFs were ranked by *F*-score and *z*-score, respectively and were clustered into five groups.

Functional Network Inference

Protein-protein interaction (PPI) networks were generated using the freely available STRING database version 10.5 (Franceschini et al., 2013). Clustered TFs were inputted separately in STRING to generate background networks based on the predicted associations between these TFs (curated or experimentally determined interactions). Resulting TF-PPI networks were expanded into several layers (shells) via sequentially adding predicted associated proteins (nodes) until networks of five layers were generated as explained in **Supplementary Figure S6**. During each step, GO terms with $FDR < 10^{-4}$ were assigned to major biological processes. The major biological processes were then normalized to the total number of identified GO terms in each network. To find out how similar is the processes' prediction to that of DETs, shared biological processes between TF-PPI network and DET were sorted out and then were normalized by the total number of shared GO terms. TF-PPI networks

that recapitulated the greatest number of biological processes obtained from the DETs were selected as being the best putative TFs-regulated networks.

Isolation of Cardiac Resident Cells

Zero minutes and 24 h post-surgery, mice (4 per time point) were injected intra-peritoneally with 50 UI/kg heparin sodium for 10 min. Mice were euthanized and heart was harvested and cannulated through the aorta. Afterward, a small clip was attached to the aorta's end and a thread beneath it was tied to prevent the heart from falling (O'Connell et al., 2007). The heart was firstly perfused for 3 min with the perfusion buffer [NaCl 120.4 mM, KCl 14.7 mM, KH₂PO₄ 0.6 mM, Na₂HPO₄ 0.6 mM, MgSO₄·7H₂O 1.5 mM, Na-HEPES 10 mM, NaHCO₃ 4.6 mM, Taurine 30 mM, 2,3-butanedione monoxime (BDM) 10 mM, and Glucose 5.5 mM, pH 7.0]. The latter was replaced by digestion buffer (50 mL of perfusion buffer and Collagenase II 2.4 mg/mL) for 2 min 30 s. 100 mM CaCl₂ (final concentration 40 μM) were then added. Perfusion was continued for 6 min and 30 s. During the entire procedure, the heart was perfused at 4 mL/min rate and the solutions were maintained at 37°C to mimic physiological conditions. After 12 min, the heart was removed and placed in a 100-mm dish. It was then cut into small pieces that were placed in a tube containing myocyte digestion buffer. Small pieces were gently pipetted several times to ensure the complete myocardium digestion. Digestion stop buffer [45 mL of perfusion buffer, 5 mL of fetal bovine serum (10%), and 6.25 μM of 100 mM CaCl₂ (12.5 μM)] was then added up to a final volume of 10 mL. The tube was then centrifuged for 3 min at 20 g at room temperature (Eppendorf 5810R). Supernatant was collected and centrifuged for 5 min at 500 g. Cells pellet was used for labeling protocol.

Flow Cytometry Analysis

Labeling Protocol

Cell pellets were re-suspended in phosphate buffer saline (PBS) and divided in two tubes: Labeling and isotopic control. PBS was added in each tube and tubes were centrifuged 5 min at 500 g and the supernatant was discarded. FCR blocking solution (diluted FCR: 1:10 in PBS; 100 μL/tube of dilute FCR solution; FCR blocking mouse reagent, Miltenyi biotec, 130-092-575) was then added for 10 min at 4°C. Following incubation, PBS 0.5% BSA (Bovine Serum Albumin) was added and tubes were centrifuged 5 min at 500 g. The two tubes were incubated for 30 min at 4°C in dark with the isotopic or the labeling solution. Incubation was stopped with the addition of PBS 5% BSA followed by a 5 min centrifugation at 500 g. Supernatants were discarded and pellets re suspended in PBS before flow cytometry analysis.

Samples' Processing and Data Analysis

Flow cytometry experiments were conducted using Fortessa X-20 equipped with four lasers and 16 fluorescent detectors. Markers of macrophages (CD11B, F4/80, CD206, and CD86) and neutrophils (Ly6g) were analyzed after immunostaining (antibodies are listed in **Supplementary Table S1**) in order to estimate the proportion of each population. 100,000 of total events were acquired for each condition. Data were analyzed by DIVA Software (BD Biosciences). The percentage

of each cell subtype was calculated after the multiple gating of the different fluorescent markers. The sorting of macrophage subtypes was performed as followed: CD11b+ and/or F4/80+ positive cells were gated and represented the total macrophage population. Within this cell population, the percentages of type 1 macrophages (M1) (CD206-/CD86+), type 2 macrophages (M2) (CD206+/CD86-), M1 + M2 (CD206+/CD86+) and negative M1 + M2 (CD206-/CD86-) macrophages population were figured out. Percentage of M1, M2, and double M1 + M2 phenotypes were normalized by the sum of these three population to assess the shift in differentiation.

Plasma Preparation and IL-6 Assay by ELISA

After anesthesia and prior to euthanasia, blood samples were collected from the inferior vena cava. Blood was centrifuged at 500 g for 5 min at room temperature to isolate plasma. The latter samples were stored at -80°C for later use. Interleukin 6 (IL-6) concentrations were measured in plasma samples by the enzyme like immunofluorescent assay (ELISA) using the Mice IL-6 ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, United States) based on the manufacturer instructions. The sensitivity test was 1.8 pg/mL.

Statistics

In order to determine the number of mice per group, a power analysis was performed with G*Power (version 3.1.9.2) (Faul et al., 2007) with the following conditions: One-way ANOVA parameters with alpha = 0.05, beta = 0.2, and effect size = 0.7 with three groups (0 min, 45 min, 24 h).

Statistical analysis were performed with One-way Anova (Tukey's multicomparison test and Kruskal-Wallis non-parametric test), student *t*-test, two-way anova tests and spearman correlation analysis were performed with Graphpad Prism (version 7.0a) (GraphPad Software, La Jolla, CA, United States)².

Data Availability

All sequencing datasets used in this study are submitted in international public repository, Gene Expression Omnibus, under accession identification as GSE127244.

RESULTS AND DISCUSSION

Experimental Design

A methodical issue to assess the sham effect relies on the complexity of the analysis of OMICs dataset. These latter are very sensitive to the statistical power of the study, the experimental design and the accuracy of the analytical pipeline of OMIC studies. The experimental design of dynamic transcriptomic studies is largely affected by factors as the precision of measures, ethical rules, expenses' constraints and statistical power. The precision of measures is, however, highly dependent on the biological variability of the studied system and the experimental

²www.graphpad.com

error introduced by the surgery effect or the RNA-seq protocol (Conesa et al., 2016). Another type of errors originates from static comparisons between “pretreatment” and “post-treatment” samples which can neither correctly recapitulate the dynamic of a pathology nor enable the characterization of the molecular cascade ruling the modification of gene/transcripts expression (Kim et al., 2012; Chang et al., 2015). Unlike static analysis, kinetical analysis permits the identification and clustering of gene/transcripts based on their expression profile. This list of DETs must be thought as temporal signature which can be used to predict the future evolution of the cellular systems or to infer the molecular mechanisms which controlled and induced these modifications in DETs expression level.

We profiled the associated effects of anesthesia, thoracotomy, removal of the epicardium and suture passed under the left anterior descending artery on the change of gene expression profiles in mouse myocardium. Dynamics of transcripts expression were quantified by mRNA sequencing at three different time points post-surgery (0 min, 45 min, and 24 h). This procedure is similar to the “Sham” procedure used in mouse model of myocardial infarction explained by Hariseseh et al. (2017). Unlike blood, temporal analysis in organs requires sacrificing different animals to cover all time points. Consequently, the variance of gene/transcripts expression over time is mixed with the inter-individual variance. Therefore, the sensitivity of the analytical pipeline to detect DETs is highly affected by the statistical power of the study. The experimental design considered a total of 24 animals (eight mice per time point) to meet the statistical parameters which are presented in the section “Materials and Methods.” Surprisingly, in several recent dynamic transcriptomic studies that are involved in ischemia reperfusion (Roy et al., 2006; Kim et al., 2012, 2018; Prat-Vidal et al., 2013; Andreeva et al., 2014; Khan et al., 2017), no power test was carried out to optimize the number of samples, which may have led to the underestimation of the number of DETs. Analytical comparison studies have estimated that a minimum of five and six replicates per condition is required to obtain stable significant results in microarray and RNA sequencing experiments, respectively (Pavlidis et al., 2003; Schurch et al., 2016; Lamarre et al., 2018).

Considering the studies which compared analytic tools for transcriptomic (Rapaport et al., 2013; Sonesson and Delorenzi, 2013; Burden et al., 2014; Seyednasrollah et al., 2015) and seeking a method with the highest sensitivity for controlling the false discovery rate (FDR) (Love et al., 2014) and compatible for the analysis of kinetics, we have decided to work with DESeq2 analysis method. The analytical pipeline followed in this study is presented in **Supplementary Figure S1**.

RNA-Seq Data Processing and Analysis

DESeq2 uses a generalized linear model (GLM) with a Negative Binomial distribution to model the counts associated with a given gene. Compared to the classical Poisson count distribution the Negative Binomial distribution can account for over dispersion in the data (variance higher than the mean). To be able to estimate both parameters of the distribution for each gene, the variance distribution is computed from a mean variance function fitted

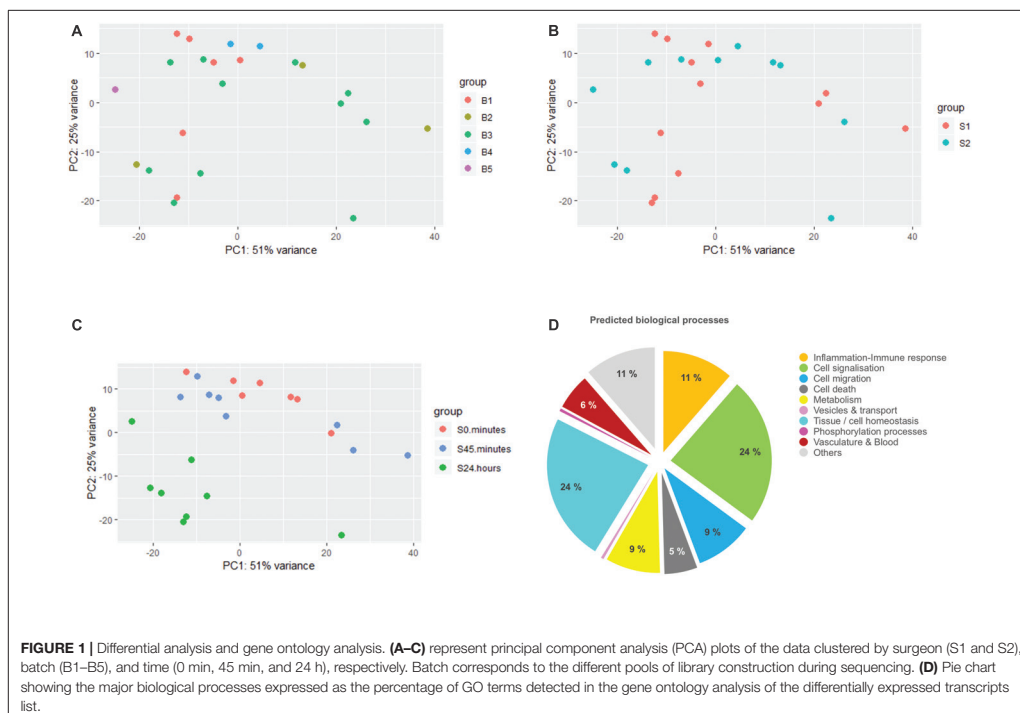
across all genes. DESeq2 takes raw reads as input but uses a sequencing depth offset parameter (Love et al., 2014). Firstly, we assessed the different possible sources of experimental error: different surgeons and different cDNA libraries in the mRNA seq process (defined as “Batch effect”). Data visualization by PCA in **Figures 1A–C** clearly shows that our samples were clustered neither by the surgeons nor by the batch. Samples were actually clustered by their variation over time, where “24 h post-surgery” condition was responsible for the highest variation in the data. 0 and 45 min samples were grouped together indicating no major effect of the surgery after 45 min in comparison to 24 h. Noteworthy, the three groups were scattered along PC1 and PC2, what suggested at least two different sources of variance. In addition, PCA plot did not show any outlier samples that might affect the analysis, noting that samples are spread out along PC1 and display a large within-group variability that might be of biological and technical origin we cannot control. Among the 27,661 non-zero transcripts, DESeq2 yielded 1209 DETs over time with FDR <0.05 (List of transcripts is available in **Supplementary Table S2**).

To identify the major biological processes affected in response to surgical intervention, functional enrichment analysis was performed using STRING software. We first proceeded with the GO analysis of the complete DET list that had generated a list of more than 700 significantly enriched GO terms. To reduce their dimensionality, we arbitrarily selected a cut-off for the FDR of GO terms below 10^{-4} and then kept 228 GO terms for the rest of the analysis. We next classified them into bigger biological processes in order to understand what were the consequences of the surgery. As summarized in **Figure 1D**, we identified the major biological processes as: cell signalization (24% of GO terms), tissue regeneration (including mechanisms of cell homeostasis, tissue organization, embryogenesis-related processes, wound healing and representing 24% of GO terms), inflammatory and immune response (11% of GO terms), cell migration (9% of GO terms), metabolism (9% of GO terms), cell death (5% of GO terms) and processes involved in vasculature remodeling (6% of GO terms).

In summary, the 1209 identified DETs were associated with biological processes among which some were expected like inflammation and immune response. Although, this coarse-grained strategy is broadly used to investigate gene network response to stimuli, it is highly dependent on the quality of GO annotation, the rationality of GO selection and clearly lacks understanding of both the cell network (including gene and protein) organization and its modification over time. We therefore aimed to temporally and phenotypically organize the DETs in order to isolate different regulation waves of gene network.

Weighted Gene Co-expression Network Analysis

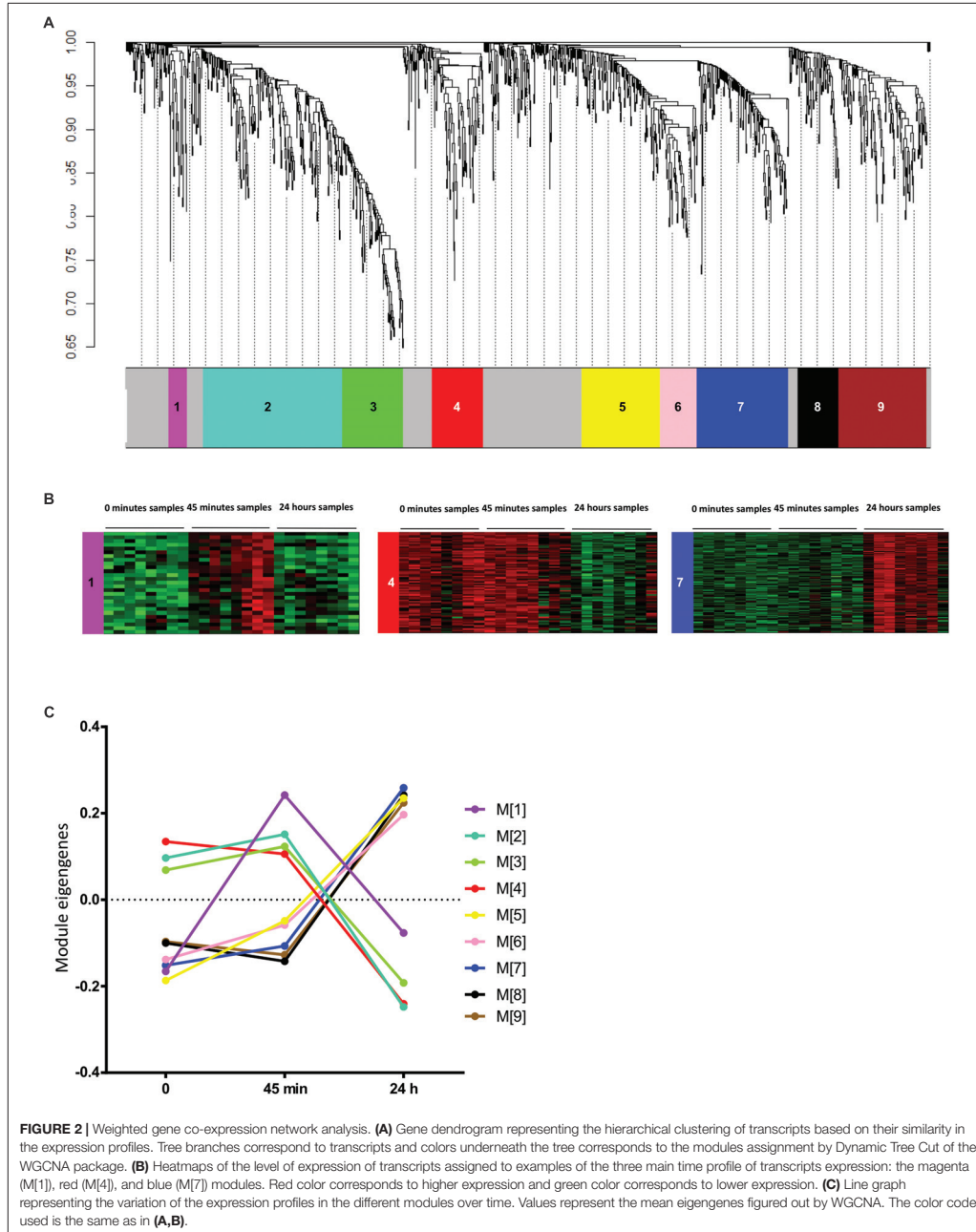
First, we looked for co-varying transcript signatures and aimed to predict their associated biological processes. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) is an unsupervised analysis that aims to construct modules (clusters) of highly



correlated transcripts according to the similarity in their expression profiles (Langfelder and Horvath, 2008). WGCNA was performed on the 1209 DETs. Prior to analysis, we checked for outliers' samples to exclude, but none was detected as displayed in **Supplementary Figure S2A**. The soft threshold was set to 30 based on the scale free topology criterion (**Supplementary Figures S2B,C**). Transcripts were hierarchically clustered (**Figure 2A**) and nine clusters of transcripts with similar profiles were formed. List of transcripts assigned to each module is available in **Supplementary Table S3**. For a better understanding, a color code was assigned for each module of transcripts. The size of these modules ranged from 27 to 210 transcripts and 300 (24.8% of DETs) were not assigned to any module, colored in gray. As examples of the different profiles obtained in these modules, heatmaps representing the expression profiles of the transcripts assigned to the magenta (M[1]), red (M[4]) and blue (M[7]) modules were displayed in **Figure 2B**, where remaining modules' expression profiles are displayed in **Supplementary Figure S2D**. WGCNA summarizes the distribution of transcripts expression via PCA and the first PC is called "eigengene." Eigengene values of transcripts modules were calculated for each sample and eigengene means were plotted for each module over time in order to summarize the average variation in transcript expression (**Figure 2C**). Interestingly, we identified three major

time profiles: the magenta module (M[1]) was clustering transcripts transiently induced at 45 min, modules 2–4 clustering transcripts with a decrease at 24 h and modules 5–9 with an increase at 24 h. We hypothesized that, since modules have been clustered with positively co-varying transcripts, they could unlikely predict non-linear biological processes spanning a broader range of time. We thus tested whether the different combinations of the three modules with the greater number of GO terms: [M1], [M6], and [M7] could enhance the predictions.

In order to predict the biological processes related to these modules and assess the strength of this prediction, we first studied the distribution of transcript counts as a function of GO term counts for all groups of transcripts modules and for all DETs as well (**Supplementary Figure S3**). Expectedly, the high transcripts counts in the DETs were correlated with the greatest number of GO terms. However, a strong discrepancy was observed for the groups of modules. For instance, M[2] including 210 transcripts (**Supplementary Figure S3**) had no significant predicted GO terms whereas group M[1;6] including 83 transcripts had 240 predicted GO terms and group. This firstly suggested that a greater number of transcripts did not mandatorily mean a great count of GO terms and thus no size artifact occurred in the comparison between modules and combinations of modules. We next quantified to which extent



modules or combinations of modules may be strong predictors of the DETs-based GO terms. This feature, defined as GO term enrichment (see the section "Materials and Methods"), reflects the fact that modules might sort out transcripts related to similar biological processes. All GO terms of all modules or combination of modules were first filtered with $FDR < 10^{-4}$ and then selected if their enrichment factor was >2 (Figure 3A). List of enriched GO terms and their FDR for the different modules and combinations are available in Supplementary Table S4. The count of the selected GO terms for each module or combination of modules is presented in Figure 3B. Next, we sorted out the groups of modules having the highest enrichment factor for each and every GO term (Figure 3C) in order to estimate which module or combination of modules achieved the strongest predictions of GO terms. Six groups of modules were sorted out and were considered as the best predictors based on their shared GO terms with the DET-derived ones, where among them group M[1;6;7] had the highest count of the highest-enriched GO terms.

Filtered GO terms were classified into bigger biological processes (Figure 3D). M[1], which was transiently induced at 45 min (Figure 2C), was mainly involved in cell signalization process what we interpreted as a transcriptional response following the surgery to maintain cells' homeostasis via the shift in the state of different signalization pathways. Combinations of modules M[1;6], and M[6;7] looked similar and predicted the induction of signalization pathways, cell migration and inflammatory/immune response, while combinations M[1;7], and M[1;6;7] predicted the induction of signalization pathways, cell migration, tissue regeneration and inflammatory/immune response (Figure 3D). As anticipated from the calculation of the highest-enriched GO terms, the combination of modules M[1;6;7] was the one recapitulating the highest predictions from the DETs: signalization pathways (46 vs. 54 GO terms, respectively), cell migration (17 vs. 21 GO terms, respectively), cell death (5 vs. 12 GO terms, respectively) and inflammatory/immune response (24 vs. 26 GO terms, respectively). However, tissue regeneration was poorly recapitulated (11 vs. 54 GO terms, respectively) while neither metabolism nor vasculature were detected. This suggested that this method was efficient for classified and enriched transcripts associated with some of the DETs features but not all.

Eventually, looking at the transcripts of M[1;6;7], we found many inflammatory markers including chemokines (CCL6, CCL9, CCL12, CXCL1, CXCL3), chemokine receptors (CXCR2 and CCR2), adhesion markers of endothelial cells (ICAM-1 and Sele) in addition to markers of neutrophils and macrophages (LCN2 and ARG-1, respectively) (Frangogiannis, 2002; Sadik et al., 2011; De Filippo et al., 2013; Arango Duque and Descoteaux, 2014). We then checked the occurrence of each of these transcripts in the GO terms associated with inflammation/immune response, cell signalization and cell migration biological processes of M[1;6;7], we found that most of them were actively involved in these three main processes (Figure 3E). In this regard, we hypothesized that transcripts related to inflammatory/immune response, cell migration and transcripts involved in cell signalization could have fingerprinted

the recruitment and/or the differentiation of immune cells within the myocardium.

We assessed the quantification of macrophages and neutrophils in mouse heart subjected to surgery by FACS analysis. A significant 9.3-fold increase of the percentage of high LY6g-positive cells was found in non-myocytes cell extract from the myocardium 24 h post-surgery, this suggested an increase in the population of neutrophils (Figure 3F and Supplementary Figure S4A). We observed a shift in the phenotypes of F4/80⁺ and CD11b⁺ macrophages 24 h post-surgery. First, an increase in CD206⁻/CD86⁻ cells was observed (from 41.2 ± 2.9 to $59.3 \pm 6.3\%$ of F4/80⁺/CD11b⁺ macrophages; adjusted p -value < 0.0001) as reported in Figure 3F. This suggested the recruitment of monocytes to the myocardium. Second, excluding the double negative population of macrophages (CD206⁻/CD86⁻), a transition of double CD206⁺/CD86⁺ (from 70.6 ± 4.0 to $48.8 \pm 9.5\%$; adjusted p -value: 0.0013) to either type M1 (from 10.0 ± 1.8 to $17.4 \pm 3.6\%$; adjusted p -value: 0.2778) or type M2 (from 19.4 ± 2.9 to $33.9 \pm 7.0\%$; adjusted p -value: 0.0181) was detected (Figure 3F and Supplementary Figure S4B). This double CD206⁺/CD86⁺ phenotype was previously reported in the heart (Walter et al., 2018); however, it was not shown whether these cells could evolve to single CD206⁺ or CD86⁺ phenotype over time.

Altogether, our results confirmed the recruitment of neutrophils and F4/80⁺/CD11b⁺/CD206⁻/CD86⁻ macrophages/monocytes and showed a possible differentiation of CD206⁺/CD86⁺ macrophages into type2 macrophages (M2) to the mouse heart within the first 24 h post-surgery. Tissue regeneration, metabolism, phosphorylation processes which were major components of the DETs-based GO terms were only found, and at low percentage, in the groups M[6;7] and M[1;6;7] (Figure 3D). We thus looked for a complementary strategy in order to predict the biological pathways involved in the regulation of these biological processes.

Transcription Factor Enrichment Analysis and Gene Network Inference

Transcriptomic signature could be considered as the outcome of a response to a stimulus carried by molecular pathways. Retro-analysis could thus be used to delve into the molecular history of the biological system. We started assessing which transcription factors could have likely regulated DETs and transcripts' modules. Over-represented transcription factor binding site (TFBS) in the promoter sets of the DETs using oPUSSUM software was calculated by the mean of z -scores and fisher exact test scores. Z -score measures the change in the TF motifs of the target set compared to the background set, whereas the fisher score assesses whether the genes associated with the TF is greater than what would be expected by chance (Kwon et al., 2012). We first found that transcripts modules were mainly able to predict the TF outliers predicted from all DETs like Klf4, SP1, STAT3, and NFKB1 (Supplementary Figure S5). Noteworthy, Klf4 and SP1 are two transcription factors which have been reported to play an inflammatory role, more specifically a role in macrophage activation and polarization (Feinberg et al., 2005;

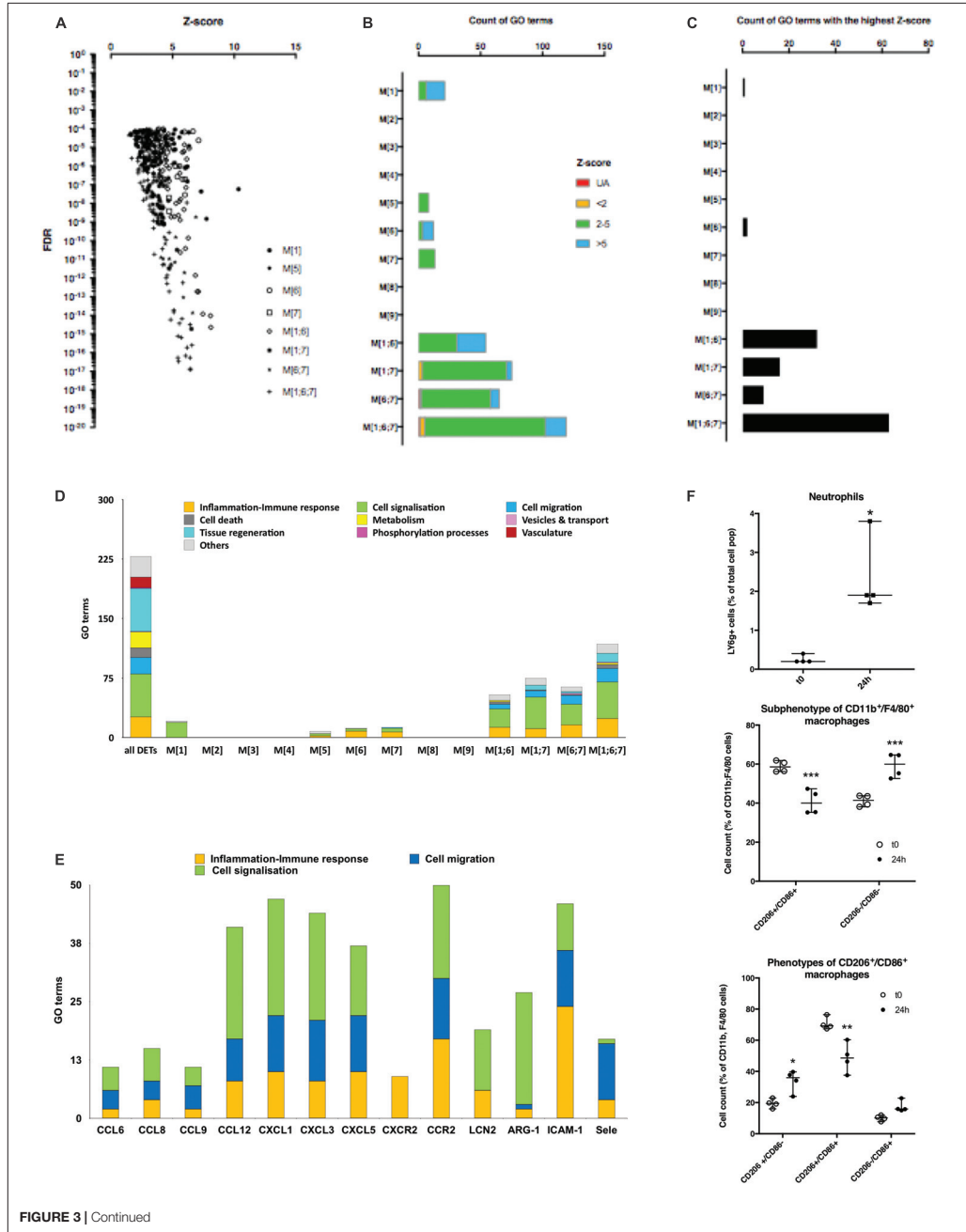


FIGURE 3 | Continued

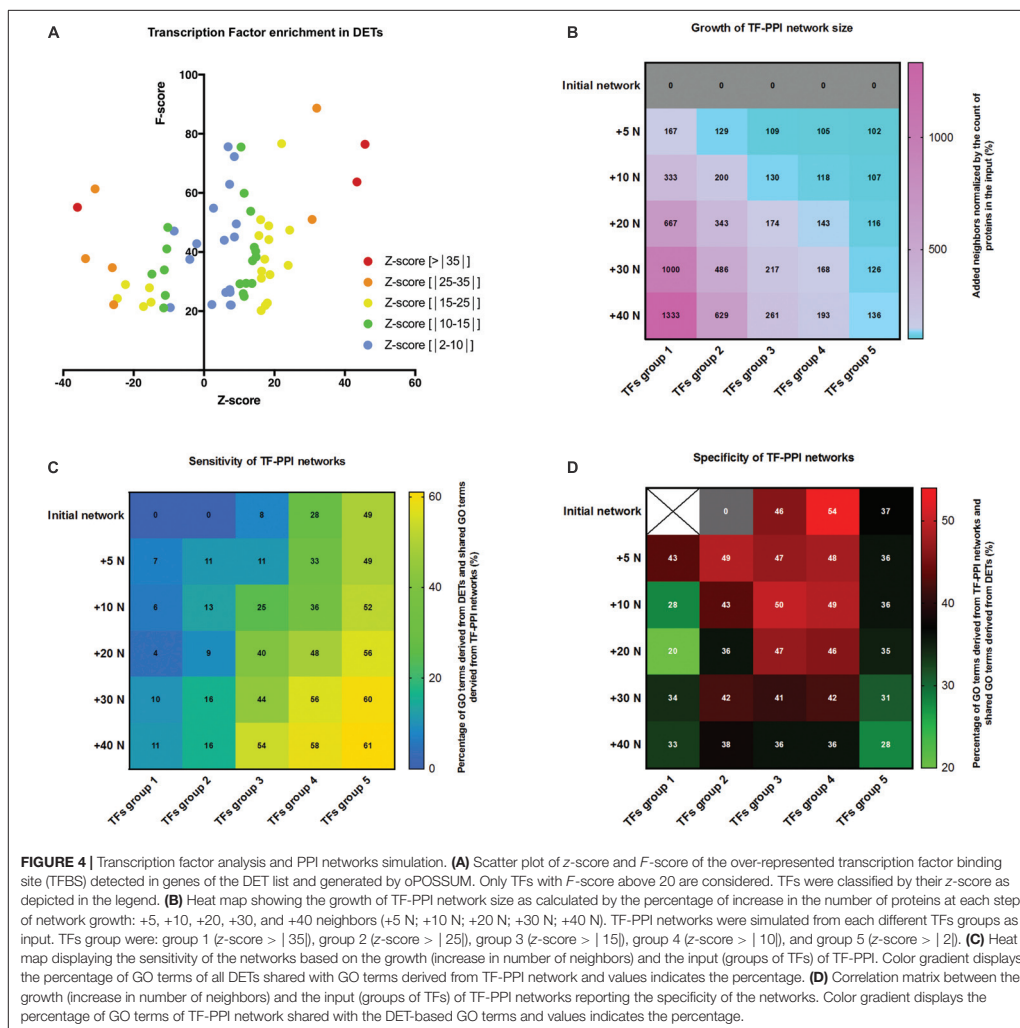
FIGURE 3 | Analysis of GO terms enrichment and characterization of immune cells. **(A)** Scatter plot of *z*-score and FDR of GO terms predicted from different transcripts modules (reported as [module number]) and combination of modules (reported as [module number; module number]). Values were filtered for FDR < 10⁻⁴ and enrichment factor (*z*-score) > 2. **(B)** Bar graphs displaying the count of the filtered GO terms for different groups of transcripts modules and which are shared in the list of GO terms from DETs. Blue and green colors represent the enrichment score of the terms present in the DET's GO terms list and the red color represents the unassigned terms (UA). **(C)** Bar graph showing which transcripts' modules recapitulate the best GO terms observed in DETs. Each GO terms accounting in **(B)** were counted only once in the module showing the highest *z*-score value for this GO term. **(D)** Histogram plot representing the count of GO terms classified into bigger processes displayed by colors for all DETs and the different groups of modules. **(E)** Histogram plot representing the count of inflammation/immune response, cell signalization, and cell migration processes' GO terms constituting some inflammatory transcripts of M[1;6;7] group of modules displayed by colors. **(F)** Dot plots showing the percentage of different cell populations: LY6g + neutrophils (top panel), CD206-/CD86-macrophages (middle panel) and M1, M2, and M1 + M2 macrophages (lower panel) at 0 min and 24 h post-surgery (**P* ≤ 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001).

Lee et al., 2005; Liao et al., 2011; Karpurapu et al., 2014). This could mean that these two transcription factors reported mainly modifications in cell subtype rather than changes in the genotype of resident cells. Besides, we noticed that both *F*-score and *z*-score values of TF enrichment dropped to low values for transcripts' modules as compared to those predicted from all DETs (Supplementary Figure S5). In order to keep the strongest TFs prediction possible, we thus chose to work only with TF enrichment from all DETs. Since no objective threshold can be applied to *z*-score and *F*-score, transcription factors were filtered for *F*-score below 20 (*p*-value = 2.06 × 10⁻⁹) and thus sorted out by *z*-score in five groups cumulating more and more TFs with lower *z*-score values (Figure 4A). The next step of our re-analysis considered that TFs activity was driven by a response to stimuli via signalization pathways. We thus took advantage of the protein-protein interaction (PPI) networks simulated with STRING which used the different TFs groups as inputs. The first TF-PPI network was defined as the initial network and it only relied on the interplay between the TFs.

In the second step, STRING added a first layer of either 5 (+5N) or 10 (+10N) neighboring proteins being the most likely interactors of the TFs and thus it built the first layer PPI network (+5N), named first layer of growth. This operation was repeated consecutively five times. An example of the initial, first layer and second layer PPI networks performed for TFs group 3 are displayed in Supplementary Figures S6A–C. TF-PPI networks were built on an increasing number of proteins from the initial layer to the fifth layer (+40N) (Supplementary Figure S7) which, however, depending on the count of initial proteins represented different growth of the network (Figure 4B). We considered that a useful network added enough information (neighbors) to predict the mechanism upstream TFs (receptor, signalization pathways). In the third step, GO terms predicted for each TF-PPI network (simulated GO) were retrieved, filtered (FDR < 10⁻⁴) and compared with GO terms of DETs (experimentally derived GO) to determine the shared GO terms between simulated data and experimental data. First, we figured out the sensitivity of the TF-PPI network built by measuring the proportion of all DETs-predicted GO terms shared in the different TF-PPI networks. The correlation matrix reported that TF-PPI network set with a too great input (TFs group 5) saturated between 49 and 61% of all DETs-predicted GO terms regardless of the addition of neighbor proteins (Figure 4C). This made this kind of TF-PPI network unable to predict mechanisms upstream of TFs activation. Conversely, TF-PPI networks set with a too low input (TFs group 1 and 2) only found 16% all DETs-predicted

GO terms and were thus unable to simulate a network that could be thought to predict the mechanisms leading to DETs. However, TFs groups 3 and 4 were able to retrieve between 8 and 58% of all DETs-predicted GO terms. This highlighted that a correct balance between input and growth of TF-PPI network was required to gradually find simulated GO terms in DETs-derived ones. We next figured out the specificity of TF-PPI-networks by calculating the proportion of GO terms predicted in the TF-PPI network which were shared with all DETs-predicted GO terms. The correlation matrix shown in Figure 4D demonstrated that the growth of TF-PPI networks decreased their specificity. An optimal specificity was reached at the first growth for TFs group 1 and 2, was almost stable from initial network to the third growth of the networks for TFs group 3 and 4 and was low for any growth of the TFs group 5. Altogether, these results demonstrated that the highest specific TF-PPI networks were TFs group 3 and 4 with growth from the initial to the third layer (Figure 4D). The most dynamic sensitive networks having percentage of shared GO terms above 40% were found for TFs group 3 and 4 with growth from the third to the fifth layer (Figure 4C) and that the network growth was above 150% for conditions below a diagonal starting from first layer of growth TFs group first to fourth layer of growth TFs group 4 (Figure 4B). From these parameters, we found that third layer of growth TFs group 3 shown the balance between specificity, sensitivity and network growth and was selected for the further analysis.

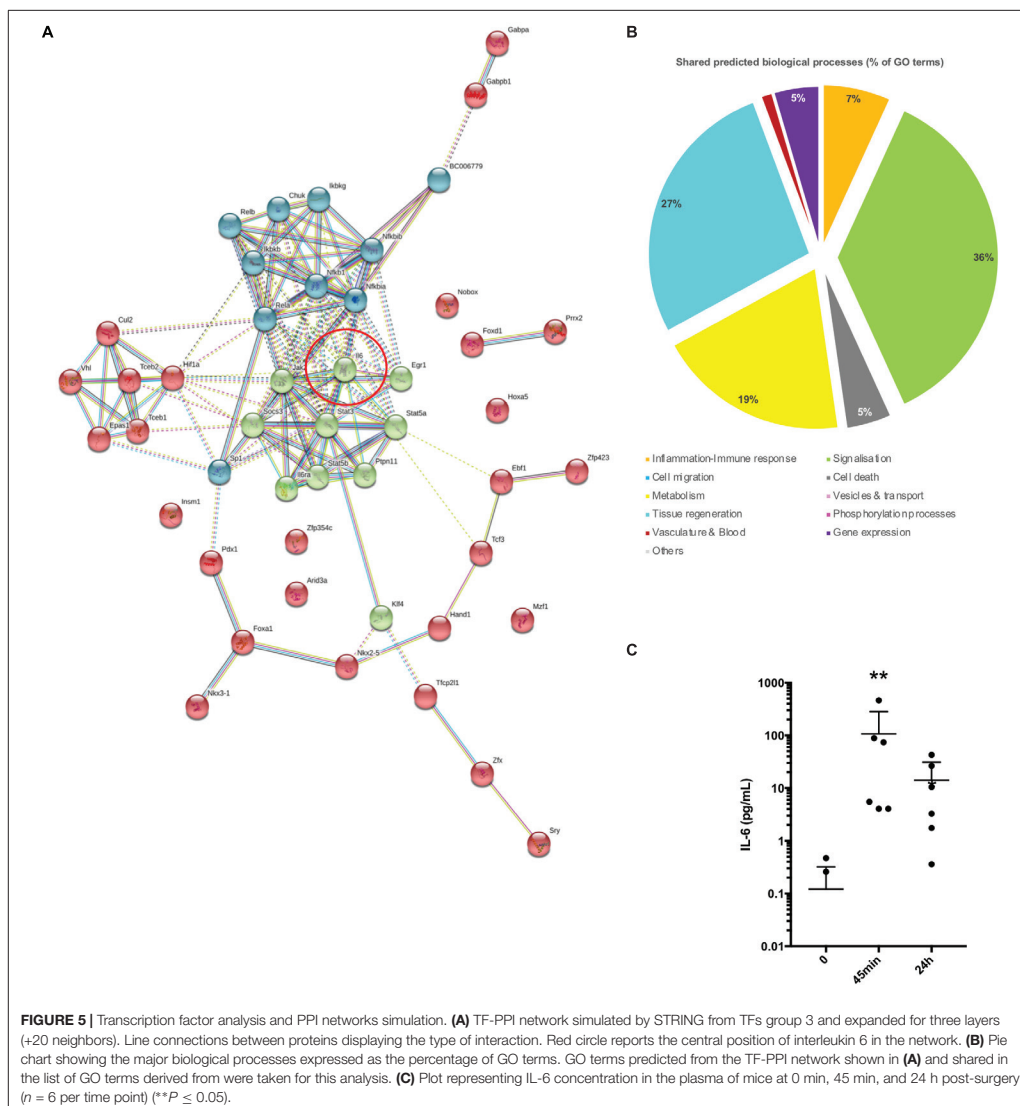
A branched network representation of third layer of growth TFs group 3 PPI network is displayed in Figure 5A. K-means clustering was used to highlight three different portions in this network (Figure 5A): core network in green which shares maximum connections with the other part of the network, secondary network in blue and peripheral network in red. GO terms associated to this network were filtered (FDR < 10⁻⁴) and then clustered in biological process expressed as percentage of the total of GO terms (Figure 5B). Cell signalization (36%), tissue regeneration (27%), metabolism (19%), inflammatory/immune response (7%), and cell death (5%), and vasculature (2%) were the main processes supported by the shared GO terms. Interestingly, these functions could support wound healing and tissue homeostasis in response to stress and thus could involve the cardiac resident cells. This first revealed that both metabolism and tissue regeneration were highly represented, conversely to what was found with the co-variance analysis, and that the overall pattern was similar to the pattern obtain from all DETs (Figure 1D). Comparisons with less sensitive networks, first layer of growth TFs group 2 PPI network and initial network



of TFs group 4, are depicted in **Supplementary Figure S8**. The prediction of biological processes regulated by these networks failed to recapitulate the ones derived from DETs. This showed that a careful selection and control of the predicted networks should be performed.

We concluded that this third layer of growth TFs group 3 PPI network could be a good model of changes induced in cell networks after surgery and which led to the shift in expression of DETs. A deeper analysis of this network showed that the composition of the core network relied on STATs signaling pathways and was suggested to be highly dependent on Il-6

stimulation. Indeed, the induction of several major TFs regulating DETs such as STAT3, NFKB1, KLF4, SP1, SOCS3, STAT5a, STAT5b, REL, REL were linked to the Il-6 axis. In addition, Il-6 is known to stimulate immune cells recruitment to the injured tissue via the activation of signaling pathways like the PI3K and JAK/STAT pathways (Hartman et al., 2016; Tang et al., 2018). We thus assessed whether and when Il-6 was induced in the plasma of the same mice on which transcriptomic analysis was performed. As shown in **Figure 5C**, a significant and transient increase in blood Il-6 was detected 45 min post-surgery. These results suggest that Il-6 is very likely a major and early stimulus



induced by the surgery stress at 45 min and which activates signaling pathways leading to the gene responses.

In conclusion, we propose an analytical pipeline for dynamic transcriptomic dataset which can be divided into two parts. First is the use of co-variance analysis of transcript expression leading to transcript clustering, combination of best transcripts modules prior to performing GO predictions. This method was efficient

in discriminating modification of cell subtypes in the tissue like the one caused by immune cell infiltration or differentiation. Second, we used a retro-analysis strategy which starts with the prediction of the most potent TFs response elements from the all DETs and is followed by the simulation of TFs-based PPI network to predict the major biological processes upstream the TFs induction. We explained a way to test and select the most specific

and sensitive predicted networks by comparing the GO terms predicted from simulated data (TFs) with the experimentally derived GO terms (from DETs).

By means of FACS analysis and ELISA assay measuring the level of circulating cytokines, we validated the main hypothesis raised from the predictions done from the transcriptomic dataset. Altogether, our results suggest that (i) Il-6 was induced by the surgery stress and likely initiated the tissue/cell responses and (ii) the surgery stress induced the recruitment of neutrophils and monocytes and the differentiation of hybrid M1/M2 macrophages as well. Since it was shown that Il-6 plays a major role in the neutrophils' trafficking to the inflammation site (Kaplanski, 2003; Fielding et al., 2008), it is likely that Il-6 is activating the immune response in the sham hearts. Finally, this study demonstrates that the so-called "Sham" condition must be performed with a similar timing than the experimental conditions in order to be able to assess the surgery-based effects and discriminate it from the specific experimental effect. Indeed, both Il-6 involvement and inflammatory cells (neutrophils, monocytes/macrophages) recruitment have been reported in myocardial infarction, making the sham controls crucial to be performed for each and every time point. Once not considered, this could have led to an over-estimation of the effect of ischemia-reperfusion.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study can be found in Gene Expression Omnibus, GSE127244.

ETHICS STATEMENT

This study was approved by the Ethics Committee of the Université Claude Bernard Lyon 1 (Approval Number DR2017-48) in compliance with NIH Guide on the Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85-23, revised 1996).

REFERENCES

- Abdi, H., and Williams, L. J. (2010). Principal component analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* 2, 433–459. doi: 10.1002/wics.101
- Andreeva, K., Zhang, M., Fan, W., Li, X., Chen, Y., Rebolledo-Mendez, J. D., et al. (2014). Time-dependent gene profiling indicates the presence of different phases for ischemia/reperfusion injury in retina. *Ophthalmol. Eye Dis.* 6, 43–54. doi: 10.4137/OED.S17671
- Arango Duque, G., and Descoteaux, A. (2014). Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 5:491. doi: 10.3389/fimmu.2014.00491
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300. doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Bullard, J. H., Purdom, E., Hansen, K. D., and Dudoit, S. (2010). Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 11:94. doi: 10.1186/1471-2105-11-94
- Burden, C. J., Qureshi, S. E., and Wilson, S. R. (2014). Error estimates for the analysis of differential expression from RNA-seq count data. *PeerJ* 2:e576. doi: 10.7717/peerj.576

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SB, BP, JL, CC, and GB conceived the experiments. SB, AP, ZH, BP, LA, JL, CC, and GB performed the experiments. SB and GB wrote the manuscript. FV, MO, and GB supervised the study. JL, FV, MK, and MO reviewed the manuscript.

FUNDING

SB's Ph.D. was funded by the National Council for Scientific Research and Lebanese University fellowship (CNRS-L) program, the Eiffel Scholarship Program of Excellence of Campus France and the Fondation Leducq (Mitocardia network: grant number 16CVD04 to MO). ZH was funded by the Association de Spécialisation et d'orientation Scientifique. This work was supported by the IHU OpéRa (ANR-10-IBHU-004) within the program "Investissements d'Avenir" operated by the French National Research Agency (ANR), by INSERM through the "young researcher funding" granted to GB, and by the Cedar program of Campus France (2017–2018).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Laurent Modolo for his valuable advices in the statistical analysis used in the manuscript, Mrs. Catherine Rey, Severine Croze, and Mr. Abdel Goumaidi of the ProfileXpert/Virosan3D genomic platform for mRNA sequencing. We also thank BioSyL Federation and Ecofact LabEx (ANR-11-LABX-0048) for inspiring scientific events.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2019.01370/full#supplementary-material>

- Chang, N.-J., Weng, W.-H., Chang, K.-H., Liu, E. K.-W., Chuang, C.-K., Luo, C.-C., et al. (2015). Genome-wide gene expression profiling of ischemia-reperfusion injury in rat kidney, intestine and skeletal muscle implicate a common involvement of MAPK signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* 11, 3786–3793. doi: 10.3892/mmr.2015.3235
- Conesa, A., Madrigal, P., Tarazona, S., Gomez-Cabrero, D., Cervera, A., McPherson, A., et al. (2016). A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 17:13. doi: 10.1186/s13059-016-0881-8
- Coon, K. D., Inge, L. J., Swetel, K., Felton, V., Stafford, P., and Bremner, R. M. (2010). Genomic characterization of the inflammatory response initiated by surgical intervention and the effect of perioperative cyclooxygenase 2 blockade. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 139, 1253.e2–1260.e2. doi: 10.1016/j.jtcvs.2010.01.022
- R Core Team (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Available at: <https://www.gbif.org/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing> (Accessed February 13, 2019)
- De Filippo, K., Dudeck, A., Hasenberg, M., Nye, E., van Rooijen, N., Hartmann, K., et al. (2013). Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood* 121, 4930–4937. doi: 10.1182/blood-2013-02-486217

- Evans, C., Hardin, J., and Stoebel, D. M. (2017). Selecting between-sample RNA-Seq normalization methods from the perspective of their assumptions. *Brief. Bioinform.* 19, 776–792. doi: 10.1093/bib/bbx008
- Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., and Buchner, A. (2007). G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav. Res. Methods* 39, 175–191. doi: 10.3758/BF03193146
- Feinberg, M. W., Cao, Z., Wara, A. K., Lebedeva, M. A., SenBanerjee, S., and Jain, M. K. (2005). Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages. *J. Biol. Chem.* 280, 38247–38258. doi: 10.1074/jbc.M509378200
- Fielding, C. A., McLoughlin, R. M., McLeod, L., Colmont, C. S., Najdovska, M., Grahl, D., et al. (2008). IL-6 Regulates Neutrophil Trafficking during Acute Inflammation via STAT3. *J. Immunol.* 181, 2189–2195. doi: 10.4049/jimmunol.181.3.2189
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., et al. (2013). STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Res.* 41, D808–D815. doi: 10.1093/nar/gks1094
- Frangogiannis, N. (2002). The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 53, 31–47. doi: 10.1016/S0008-6363(01)00434-5
- Harisseh, R., Pillot, B., Gharib, A., Augeul, L., Gallo-Bona, N., Ferrera, R., et al. (2017). Unacylated ghrelin analog prevents myocardial reperfusion injury independently of permeability transition pore. *Basic Res. Cardiol.* 112.4. doi: 10.1007/s00395-016-0595-9
- Harpster, M. H., Bandyopadhyay, S., Thomas, D. P., Ivanov, P. S., Keele, J. A., Pinguina, N., et al. (2006). Earliest changes in the left ventricular transcriptome post-myocardial infarction. *Mamm. Genome* 17, 701–715. doi: 10.1007/s00335-005-0120-1
- Hartman, M. H. T., Vreeswijk-Baudoin, I., Groot, H. E., van de Kolk, K. W. A., de Boer, R. A., Mateo Leach, I., et al. (2016). Inhibition of Interleukin-6 receptor in a murine model of myocardial ischemia-reperfusion. *PLoS One* 11:e0167195. doi: 10.1371/journal.pone.0167195
- Hoffmann, J., Ospelt, M., Troidl, C., Voss, S., Liebetrau, C., Kim, W.-K., et al. (2014). Sham Surgery and inter-individual heterogeneity are major determinants of monocyte subset kinetics in a mouse model of myocardial infarction. *PLoS One* 9:e98456. doi: 10.1371/journal.pone.0098456
- Kaplan, G. (2003). IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 24, 25–29. doi: 10.1016/S1471-4906(02)00013-3
- Karpurapu, M., Ranjan, R., Deng, J., Chung, S., Lee, Y. G., Xiao, L., et al. (2014). Krüppel like factor 4 promoter undergoes active demethylation during monocyte/macrophage differentiation. *PLoS One* 9:e93362. doi: 10.1371/journal.pone.0093362
- Khan, A., Ju, F., Xie, W., Tariq Hafeez, M., Cheng, X., Yang, Z., et al. (2017). Transcriptomic analysis reveals differential activation of microglial genes after ischemic stroke in mice. *Neuroscience* 348, 212–227. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.02.019
- Kim, D., Perte, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., and Salzberg, S. L. (2013). TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 14:R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36
- Kim, H. K., Kang, S. W., Jeong, S. H., Kim, N., Ko, J. H., Bang, H., et al. (2012). Identification of potential target genes of cardioprotection against ischemia-reperfusion injury by express sequence tags analysis in rat hearts. *J. Cardiol.* 60, 98–110. doi: 10.1016/j.jcc.2012.02.004
- Kim, J., Kang, S.-W., Mallikankaram, K., Baik, S.-H., Lim, J. C., Balaganapathy, P., et al. (2018). Transcriptome analysis reveals intermittent fasting-induced genetic changes in ischemic stroke. *Hum. Mol. Genet.* 27, 1497–1513. doi: 10.1093/hmg/ddy057
- Kwon, A. T., Arenillas, D. J., Hunt, R. W., and Wasserman, W. W. (2012). oPOSSUM-3: advanced analysis of regulatory motif over-representation across genes or chip-seq datasets. *G3* 2, 987–1002. doi: 10.1534/g3.112.003202
- Lamarre, S., Frasse, P., Zouine, M., Labourdette, D., Sainderichin, E., Hu, G., et al. (2018). Optimization of an RNA-Seq Differential Gene Expression Analysis Depending on Biological Replicate Number and Library Size. *Front. Plant Sci.* 9:108. doi: 10.3389/fpls.2018.00108
- Langfelder, P., and Horvath, S. (2008). WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* 9:559. doi: 10.1186/1471-2105-9-559
- Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
- Lee, K.-W., Lee, Y., Kwon, H.-J., and Kim, D.-S. (2005). Sp1-associated activation of macrophage inflammatory protein-2 promoter by CpG-oligodeoxynucleotide and lipopolysaccharide. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 188–198. doi: 10.1007/s00018-004-4399-y
- Lever, J., Krzywinski, M., and Altman, N. (2017). Points of significance: principal component analysis. *Nat. Methods* 14, 641–642. doi: 10.1038/nmeth.4346
- Liao, X., Sharma, N., Kapadia, F., Zhou, G., Lu, Y., Hong, H., et al. (2011). Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J. Clin. Invest.* 121, 2736–2749. doi: 10.1172/JCI45444
- Love, M. I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* 17, 10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200
- Michael, L. H., Hunt, J. R., Weilbaecher, D., Perryman, M. B., Roberts, R., Lewis, R. M., et al. (1985). Creatine kinase and phosphorylase in cardiac lymph: coronary occlusion and reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 248, H350–H359. doi: 10.1152/ajpheart.1985.248.3.H350
- Nossuli, T. O., Lakshminarayanan, V., Baumgarten, G., Taffet, G. E., Ballantyne, C. M., Michael, L. H., et al. (2000). A chronic mouse model of myocardial ischemia-reperfusion: essential in cytokine studies. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278, H1049–H1055. doi: 10.1152/ajpheart.2000.278.4.H1049
- O'Connell, T. D., Rodrigo, M. C., and Simpson, P. C. (2007). Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol. Biol.* 357, 271–296. doi: 10.1385/1-59745-214-9:271
- Pavlidis, P., Li, Q., and Noble, W. S. (2003). The effect of replication on gene expression microarray experiments. *Bioinformatics* 19, 1620–1627. doi: 10.1093/bioinformatics/btg227
- Prat-Vidal, C., Ga, C., Sole, F., and Bayes-Genis, A. (2013). Identification of Temporal and Region-Specific Myocardial Gene Expression Patterns in Response to Infarction in Swine. *PLoS One* 8:13. doi: 10.1371/journal.pone.0054785
- Rapaport, F., Khanin, R., Liang, Y., Pirun, M., Krek, A., Zumbo, P., et al. (2013). Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. *Genome Biol.* 14, R95. doi: 10.1186/gb-2013-14-9-r95
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010). edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616
- Robinson, M. D., and Smyth, G. K. (2007). Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. *Bioinformatics* 23, 2881–2887. doi: 10.1093/bioinformatics/btm453
- Roy, S., Khanna, S., Kuhn, D. E., Rink, C., Williams, W. T., Zweier, J. L., et al. (2006). Transcriptome analysis of the ischemia-reperfused remodeling myocardium: temporal changes in inflammation and extracellular matrix. *Physiol. Genomics* 25, 364–374. doi: 10.1152/physiolgenomics.00013.2006
- Sadik, C. D., Kim, N. D., and Luster, A. D. (2011). Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 32, 452–460. doi: 10.1016/j.it.2011.06.008
- Schurch, N. J., Schofield, P., Gierliński, M., Cole, C., Sherstnev, A., Singh, V., et al. (2016). How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *RNA* 22, 839–851. doi: 10.1261/rna.053959.115
- Seyednasrollah, F., Laiho, A., and Elo, L. L. (2015). Comparison of software packages for detecting differential expression in RNA-seq studies. *Brief. Bioinform.* 16, 59–70. doi: 10.1093/bib/bbt086
- Soneson, C., and Delorenzi, M. (2013). A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 14:91. doi: 10.1186/1471-2105-14-91
- Tang, P., Ma, S., Dong, M., Wang, J., Chai, S., Liu, T., et al. (2018). Effect of interleukin-6 on myocardial regeneration in mice after cardiac injury. *Biomed. Pharmacother.* 106, 303–308. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.090

- Tarazona, S., Furió-Tari, P., Turrà, D., Pietro, A. D., Nueda, M. J., Ferrer, A., et al. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res.* 43, e140. doi: 10.1093/nar/gkv711
- Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D. R., et al. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat. Protoc.* 7, 562–578. doi: 10.1038/nprot.2012.016
- Walter, W., Alonso-Herranz, L., Trappetti, V., Crespo, I., Ibberson, M., Cedenilla, M., et al. (2018). Deciphering the dynamic transcriptional and post-transcriptional networks of macrophages in the healthy heart and after myocardial injury. *Cell Rep.* 23, 622–636. doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.029

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Badawi, Paccalet, Harhous, Pillot, Augeul, Van Coppenolle, Lachuer, Kurdi, Crola Da Silva, Ovize and Bidaux. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

1.2. An innovative sequence of hypoxia-réoxygénation on adult mouse cardiomyocytes in suspension to perform multilabeling analysis by flow cytometry

a) Introduction

Afin d'étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu durant l'infarctus du myocarde, tout comme pour l'évaluation de différentes stratégies pharmacologiques de protection, l'utilisation de la culture cellulaire de CMA est un élément central. Les différentes stratégies d'isolation et de culture primaire de CMA adultes ne permettent pas un maintien des cellules sur le long terme, la transfection de ces cellules par lipofection est très compliquée et leurs temps de culture n'est pas compatible avec les méthodes adénovirales²⁵. Ainsi, ces cellules sont couramment utilisées pour les méthodes traditionnelles d'analyses telles que la microscopie sur cellules isolées ou la fluorométrie. Contrairement à la cytométrie en flux, ces techniques sont très chronophages, et nécessitent un grand nombre d'échantillons pour atteindre une puissance statistique et une reproductibilité suffisante. Jusqu'à présent, la cytométrie en flux a été utilisée pour l'évaluation du phénotype des cellules non cardiaques²⁸⁸ ou encore pour la mesure de la taille des cardiomyocytes de lapin²⁸⁹. Nous avons développé dans cette étude une technique d'hypoxie-réoxygénation permettant de maintenir les cellules en suspension, afin d'utiliser la cytométrie en flux par la suite. L'utilisation d'un panel de marquage de différentes fonctions cellulaires permet avec une même préparation une analyse couplée de plusieurs marqueurs de souffrance cellulaire en réponse au stress d'hypoxie-réoxygénation. Ce nouveau protocole permet un criblage plus large de molécules, réduisant drastiquement le nombre de préparations nécessaires à l'obtention d'une bonne puissance statistique pour chaque expérience.

J'ai participé dans cette étude à l'amélioration du protocole, à la réalisation et l'analyse des expériences ainsi qu'à l'écriture de l'article.

METHODS IN CELL PHYSIOLOGY

An innovative sequence of hypoxia-reoxygenation on adult mouse cardiomyocytes in suspension to perform multilabeling analysis by flow cytometry

Alexandre Paccalet,^{1*} Nolwenn Tessier,^{1*} Melanie Paillard,¹ Lucille Païta,¹ Ludovic Gomez,¹ Noëlle Gallo-Bona,¹ Christophe Chouabe,¹ Christelle Léon,¹ Sally Badawi,¹ Zeina Harhous,¹ Michel Ovize,^{1,2} and Claire Crola Da Silva¹¹Université Lyon, CarMeN Laboratory, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut National de la Recherche Agronomique, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Bron, France; and ²Service d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires and CIC de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

Submitted 16 September 2019; accepted in final form 17 December 2019

Paccalet A, Tessier N, Paillard M, Païta L, Gomez L, Gallo-Bona N, Chouabe C, Léon C, Badawi S, Harhous Z, Ovize M, Crola Da Silva C. An innovative sequence of hypoxia-reoxygenation on adult mouse cardiomyocytes in suspension to perform multilabeling analysis by flow cytometry. *Am J Physiol Cell Physiol* 318: C439–C447, 2020. First published December 25, 2019; doi:10.1152/ajpcell.00393.2019.—Cardiovascular diseases remain the leading cause of death worldwide. Although major therapeutic progress has been made during the past decades, a better understanding of the underlying mechanisms will certainly help to improve patient's prognosis. In vitro models, particularly adult mouse cardiomyocytes, have been largely used; however, their fragility and large size are major obstacles to the use of flow cytometry. Conventional techniques, such as cell imaging, require the use of large numbers of animals and are time consuming. Here, we described a new, simple, and rapid one-day protocol using living adult mouse cardiomyocytes in suspension exposed to hypoxia-reoxygenation that allows a multilabeling analysis by flow cytometry. Several parameters can be measured by fluorescent probes labeling to assess cell viability (propidium iodide, calcein-AM, and Sytox Green), mitochondrial membrane potential [DiIC1(5) and TMRM], reactive oxygen species production (MitoSOX Red), and mitochondrial mass (MitoTracker Deep Red). We address the robustness and sensitivity of our model using a cardioprotective agent, cyclosporine A. Overall, our new experimental set-up offers a high-speed quantitative multilabeling analysis of adult mouse cardiomyocytes exposed to hypoxia-reoxygenation. Our model might be interesting to investigate other cellular stresses (oxidative and inflammation) or to perform pharmacological screening.

cardiomyocytes; flow cytometry; myocardial infarction

INTRODUCTION

Coronary artery diseases are among the leading causes of death worldwide. Despite major progress made during the past three decades, the incidence of mortality and heart failure after a prolonged myocardial ischemia-reperfusion remains way too

high. Despite very encouraging experimental data and proof-of-concept clinical studies, most protective intervention, e.g., “conditioning strategies” have failed so far to bring significant clinical benefit (6, 12, 13). Obviously, insufficient understanding of the mechanisms of ischemia-reperfusion injury of cardiomyocytes (CM) exposed to a prolonged hypoxia-reoxygenation (H/R) precludes the development of successful therapies.

To decipher these molecular mechanisms, various cellular models have been developed over the years. Several cardiac cell lines are available, and many studies have been performed using newborn mouse or rat primary CM culture (1, 16). A more relevant model for studying cardiac function would however be the isolated adult CM, owing to the preservation of the contractile apparatus and cellular electrophysiological properties. However, resistance of adult CM to ischemia-reperfusion injury varies according to species and the duration of the experiment, in part because of the inability to detach them after plating. These cells are not easily transfectable by lipofection methods and the required adenovirus strategy is not compatible with their conservation time. Despite reports mentioning the possibility of preserving mouse CM several days, studies have shown that they differentiate after 24 h (2, 21).

As a matter of fact, these cells are mainly used with conventional techniques, including single-cell imaging or fluorometry. As opposed to flow cytometry, these techniques are time-consuming and necessitate a large sample size to achieve sufficient statistical power and reproducibility. Flow cytometry has been performed in mouse heart cells suspensions for different goals like sorting nonmyocyte cardiac lineage (2, 26, 27, 31), assessing the size of rabbit fixed CM (20), and evaluating the purification yield or one labeling function performed in mouse and rat CM (9, 17, 27). These studies did not take advantage of flow cytometry to perform a wide array of cellular functions under a cellular stress.

In the present study, we describe how an innovative sequence of hypoxia-reoxygenation applied to CM in suspension combined with flow cytometry provides a high-speed quantitative multilabeling analysis. We have built a one-day sequence to study key factors of the adaptation to in vitro ischemia-reperfusion injury. We propose, for example, the use

* A. Paccalet and N. Tessier contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: C. Crola Da Silva, IHU OPERA-INSERM-U1060 CarMeN, Groupement Hospitalier EST-Batiment B13, 59 Boulevard Pinel, 69500 Bron, France (e-mail: claire.crola-da-silva@univ-lyon1.fr).

of various fluorescent probes to measure several intracellular physiological parameters such as mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species production, cell viability, and cell death pathways. Our new protocol sequence holds promise for a better understanding of the underlying mechanisms of ischemia-reperfusion damages in CM, together with a more efficient screening of protective treatments.

METHODS

Animals

Eight- to twelve-week-old C57Bl/6J mice (Charles River) were housed in our laboratory animal facility under controlled-temperature (23°C) conditions, with a 12:12-h light-dark cycle and free access to water and food (Standard Diet/SAFE). All mice used in this study were males. All procedures were applied in accordance with the principles and guidelines established by the European Convention for the Protection of Laboratory Animals and were approved by the Lyon 1 Claude Bernard University Committee for Animal Research. In all experimental protocols, the *n* value indicates one CM preparation from one mouse.

All reagents, buffers, culture media, and the troubleshooting concerning the following protocols are described in Supplemental Methods sections SI, SII, and SIII (all Supplemental Materials are available at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.9852221.v2>).

The first objective was to keep CM in suspension, a prerequisite step for flow cytometry. We propose a methodological chain to allow

the multilabeling of cardiomyocytes to investigate physiological functions under hypoxia-reoxygenation stress conditions (Fig. 1).

Isolation of Adult Cardiomyocytes

Following the protocol of O'Connell et al. (23), the mouse heart was perfused using the Langerdorff technique for 3 min with the perfusion buffer at 37°C. Then, the perfusion buffer was replaced by myocyte digestion buffer for a duration of 2 min. CaCl₂ (final concentration 40 μM) was added to the myocyte digestion buffer, and digestion was continued for 6 min. Once the digestion was completed, the heart was removed and placed in a 100-mm dish and cut into small pieces with myocyte digestion buffer. Pipetting was repeated for optimal dissociation of the heart.

To check cell viability at the end of the isolation, 250 μL of this suspension were collected into a cytometry tube containing 250 μL of stopping buffer. CM morphology was also checked under the microscope using a single drop of cellular suspension. The cell suspension was then centrifuged for 3 min at 20 g at room temperature. The pellet was resuspended in 10 mL of stopping buffer containing 200 mM ATP before calcium reintroduction. Calcium lifts were realized by successive centrifugations (3 min, 20 g) and changing buffer with increased calcium concentrations until reaching a final calcium concentration at 0.9 mM.

Adult Cardiomyocyte Quantification

At this step, CM were already placed in 900 μM calcium solution. The supernatant was removed, and 1 mL of complete medium [42.5

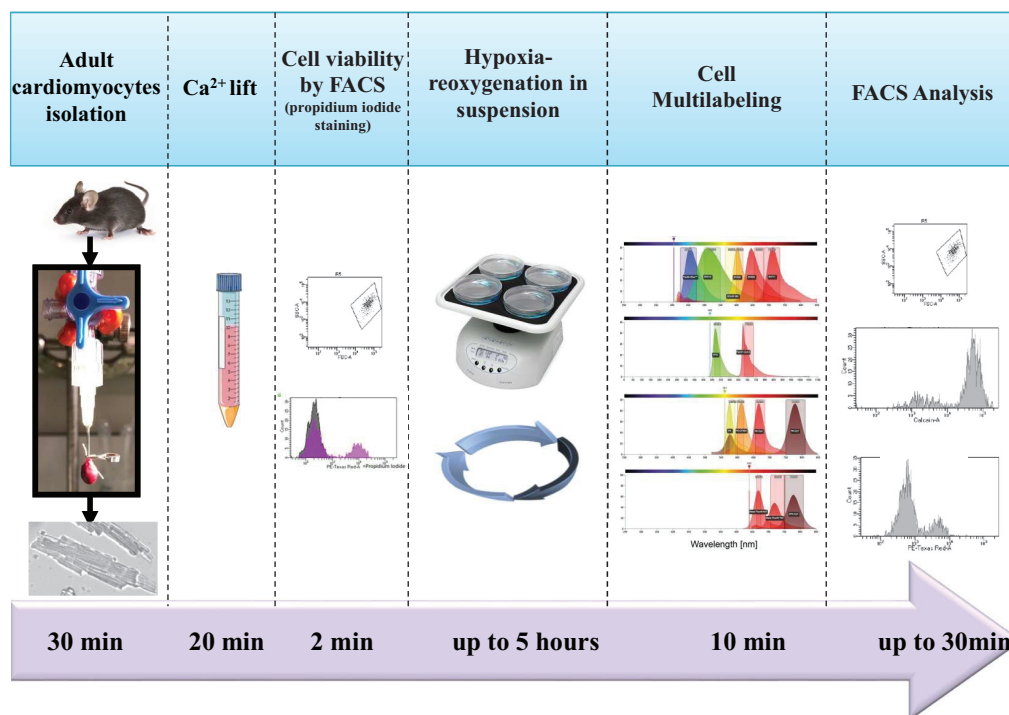


Fig. 1. Combining in-suspension hypoxia-reoxygenation protocol with multilabeling flow cytometry analysis to unravel new protective strategies using mouse adult cardiomyocytes. Schematic representation of the one-day sequence from adult mouse cardiomyocyte isolation to acquisition by flow cytometry.

mL of MEM, 5 mL of fetal bovine serum (10%), 10 mM 2,3-butanedione monoxime (BDM), 100 U/mL penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine, and 2 mM Na-ATP] was added to the pellet (Fig. 2).

Two microliters of the cellular suspension were diluted 25 times and used to quantify the protein concentration of this solution. This quantification was repeated in triplicates to ensure its accuracy. Standard curve was done with bovine serum albumin at the following concentrations: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1 mg/mL. Bio-Rad DC Protein Assay Kit 2 was used to quantify the protein concentration. Following quantification, 9 mL of complete medium were added to the previous tube to adjust the final calcium concentration to 1.8 mM.

To check cell viability by flow cytometry at the end of calcium gradient, 250 μ L of this suspension were collected in a cytometry tube containing 250 μ L of complete medium. Of note, a mortality rate <30% at the end of the Ca^{2+} lifts was necessary to proceed with the H/R sequence.

Sequence of Hypoxia-Reoxygenation

The suspension of CM was divided into two tubes (Fig. 2): 3.3 mL in the first tube for the normoxia group and 6.6 mL in the second for the hypoxia group. These two tubes were centrifuged for 3 min at 20 g. The cell pellets were either rinsed with 5 mL of complete medium

or 5 mL of hypoxia buffer (HB) (in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl_2 , 10 HEPES, and 2 CaCl_2) in the hypoxia group to remove any nutrients. They were then centrifuged for 3 min at 20 g. Eventually, the volume of hypoxia buffer or CM complete medium was adjusted to get 1 mg/mL of CM in each tube following the protein quantification.

Hypoxia. Isolated CM (250 μ g proteins) were put on a glass petri dish according to the number of experimental groups. Importantly, glass petri dishes combined with gentle shaking were used to avoid fixation of the CM to the plate during the experiment. Hypoxic cells were incubated with 2 mL hypoxia buffer and then transferred into a hypoxia incubator (Eppendorf Galaxy 48R) on a rocking platform (Grant-bio PS-M3D: 50 rpm orbital 360° reciprocal 0° vibro) at 37°C. The O_2 percentage was set to 0.5%. Cells were exposed to different durations of hypoxia (from 45 to 90 min).

Reoxygenation. At the end of the hypoxia phase, the medium was replaced step-by-step by complete medium. A volume of 500 μ L was replaced by 500 μ L of complete medium. This step was repeated three times to gently change the medium after hypoxia. At the end of the series of medium changing, 500 μ L of complete medium were added to adjust the final volume at 2 mL of complete medium. Cells were then placed in an incubator at 37°C (atmospheric O_2 without CO_2) to

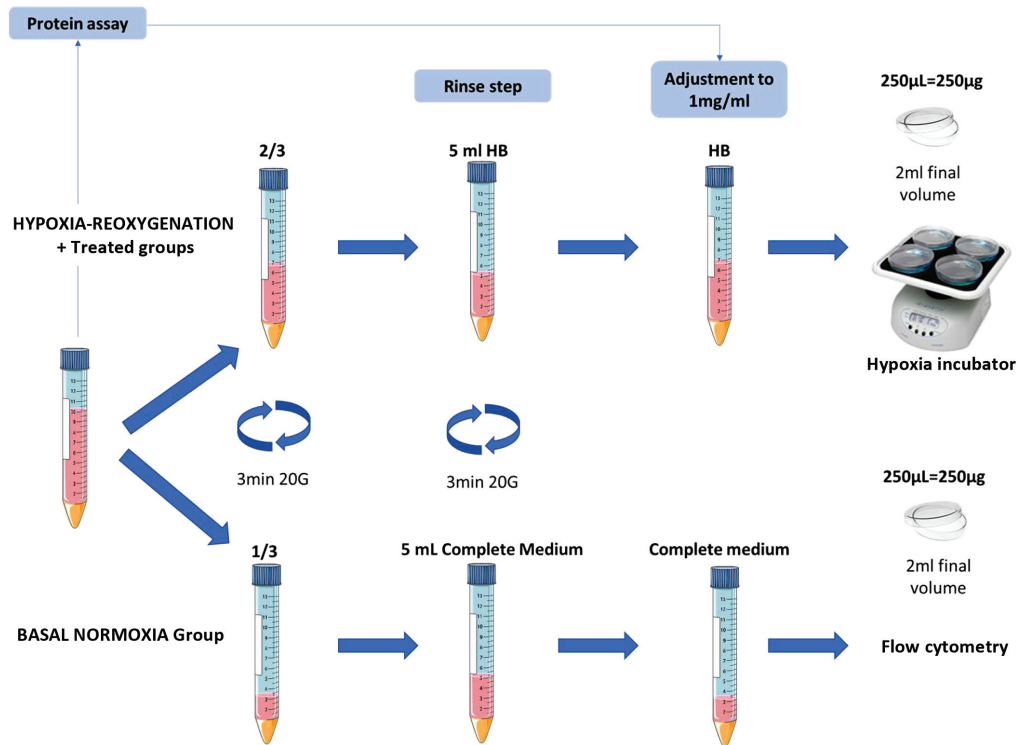


Fig. 2. Experimental design of the cardiomyocyte (CM) preparation for the hypoxia-reoxygenation (H/R) sequence. While the protein content of CM was quantified, based on the Lowry method, the CM suspension was separated into two tubes according to the experimental groups: in this study, 2/3 for hypoxia and 1/3 for basal normoxia. One rinsing step was performed to remove any nutrients contamination from the complete medium in the hypoxic group. Finally, based on the protein quantification obtained, CM were resuspended in the desired volume to be at 1 mg/mL to be dispensed at 250 μ g per glass petri dish. HB, hypoxia buffer.

explore a range of reoxygenation durations (from 1 to 3 h). In the treated group, 1 μ M cyclosporine A (CsA) was added at the onset of the reoxygenation.

Probes Multilabeling

Description of fluorescent probes. We focused our attention on variables commonly assessed during H/R. MitoSOX was used to measure the production of the superoxide anion. The MitoTracker Deep Red evaluated the total mitochondrial mass. To address cell viability, we used three different probes: propidium iodide (PI), the gold standard for dead cell labeling acting as an intercalating and impermeable agent; Sytox Green, comparable to PI, allows the use of other probes which are not compatible with the optical properties of PI; and calcein, often used to assess the opening probability of the mitochondrial permeability transition pore. In the present study, calcein was considered as a viability index since it is retained by living cells. Mitochondrial membrane potential was measured using tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM), the gold standard for membrane potential measurement, or with DiIC1(5), according to their emission wavelength specificity (Table 1). The list and reference of all probes are described in Supplemental Methods S.V.

Probe loading. Ten minutes before the end of the reperfusion phase, cells were loaded for 10 min at 37°C with one of the labeling panels (Table 1), except for PI, which was added directly in the FACS tube right before the acquisition.

One-hundred microliters of concentrated probe were added to the petri dish with the loading being performed under gentle agitation. Cells were then collected and transferred into cytometer tubes. Tubes were centrifuged for 3 min at 20 g; this step was used to wash away the dyes from the cells. Cells were then resuspended into 500 μ L of complete medium and immediately analyzed by flow cytometry.

Flow Cytometry Acquisition

Flow cytometry experiments were conducted using a BD Fortessa X-20 flow cytometer with the configuration described in the online Supplemental Methods Section IV. The flow cell size of the BD Fortessa X-20 was 430 \times 180 μ m, i.e., compatible with the adult mouse cardiomyocyte size. Because the size of the flow cell is standardized for any flow cytometer in any company (see table in Supplemental Methods Section IV), our approach can be applied to all flow cytometers. Because the CM size varies between 80 and 120 μ m, the 488-nm laser needs to be set at 25 mW and the "HIGH" speed was chosen to ensure a better fluidity of the sample but not to acquire more events. Data were analyzed by DIVA Software (BD Biosciences). The population of interest was gated in P1. A threshold of forward scatter (FSC; 5,000) allowed to eliminate debris and non-CM cells. We decided to record 1,000 events in triplicates to ensure the quality of the CM. The viability was checked at the beginning of the H/R sequence by PI staining. Acquisitions were performed according to the fluorescent channel corresponding to each fluorescent probe in histogram plots.

As shown in Fig. 1, our goal was to provide an easy and fast protocol sequence to assess CM main functions following H/R. A prerequisite of this method was to proceed to the settings of the population of interest and to the cytometer parameters.

Gating of events. To confirm that our analysis was specific for CM, the gating of the cardiomyocytes was based on two combined parameters. First, the removal of cellular debris due to the primary cell preparation was done by threshold of population, based on both side scatter (SSC) and FSC, leading to the P1 gating (in red in Supplemental Fig. S1A). Second, to check the enrichment of the CM population after isolation, we performed an immunostaining of the cells by flow cytometry with an antibody against troponin T as a CM-specific marker. Cells in the P1 gate were positive for troponin T, which reflects an enrichment of pure CM population after isolation and calcium lifts (Supplemental Fig. S1A). Thus the combination of these two gating strategies allowed us to proceed for acquisition on our population of interest, i.e., CM. Cell viability was checked throughout the experiment by PI staining (Supplemental Fig. S1B).

Settings of flow cytometer parameters to perform multilabeling analysis of CM: control with unstained cells. The settings of each photomultiplier tube (PMT) for each fluorescent channel were done using unstained versus stained cardiomyocytes. The unstained CM were arbitrarily set to the low logarithmic scale by adjusting the PMT to better discriminate the stained cells. The goal of the experiment was to compare the effect of H/R in a control (placebo) versus a treated (CsA) group. To perform our multilabeling panels, settings for panel 1 [calcein, DiIC1(5), and propidium iodide; Fig. 3A], for panel 2 (MitoSOX Red and MitoTracker Deep Red; Fig. 3B), and for panel 3 (Sytox Green and TMRM; Fig. 3C) were realized according to the configuration of the Fortessa X-20 flow cytometer (emission filters for each fluorescent channel: Table 1). Some probes were read on the same channel, and for MitoTracker Deep Red (MTR) and DiIC1(5), the same unstained control was used (data not shown). As for the subsequent analysis, results were expressed as a percentage of positively stained population (PI, Sytox Green, and MitoSOX) or negatively stained population corresponding in that case to the loss of fluorescence intensity [DiIC1(5), TMRM, and calcein]. MTR variations were analyzed by the median of fluorescence intensity since the mitochondrial mass gives a global fluorescence intensity.

Statistical Analysis

The nonparametric statistical test of Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test was used in Fig. 4, which presents nonranked data sets. The nonparametric statistical test of Friedman, for ranked data, followed by Student-Newman-Keuls post hoc test was used in Fig. 5. Data are expressed as median of relative fluorescent intensity or of percentage of population \pm interquartile (25%–75%). All statistical analyses were done with Sigma Plot software. Differences were considered significant at $P < 0.05$. The sample size for each experiment is reported in the figure legends.

Table 1. Fluorescent probes used in adult CM exposed to hypoxia-reoxygenation

Probe	Extracted Information	Concentration	Loading Time	Excitation/Emission Maximum, nm
<i>Panel 1</i>				
Propidium iodide	Viability	1 μ g/mL	Extemporaneously (before acquisition)	535/620
DiIC1(5)	Mitochondrial membrane potential	15 nM	10 min	638/658
Calcein AM	Viability	1 μ M	10 min	488/520
<i>Panel 2</i>				
MitoSOX red	Superoxide indicator	2 μ M	10 min	510/580
MitoTracker Deep Red FM	Mitochondrial mass	50 nM	10 min	644/665
<i>Panel 3</i>				
TMRM	Mitochondrial membrane potential	20 nM	10 min	548/574
Sytox Green	Viability	1 μ M	10 min	504/523

The probes were separated into 3 panels according to their optical properties (excitation and emission wavelengths). CM, cardiomyocytes; TMRM, tetramethylrhodamine methyl ester.

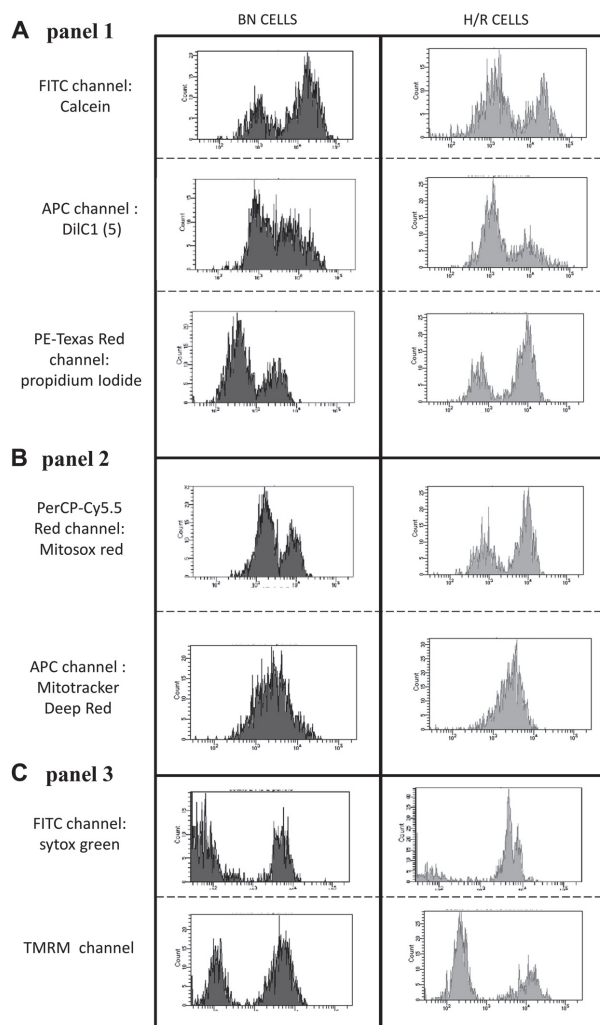


Fig. 3. Validation of the settings of each fluorescent channel. *Left* histograms represent the basal normoxic (BN) conditions. *Right* histograms display the peak distribution of stained cells after hypoxia-reoxygenation (H/R). *A*: for *panel 1*, probes: calcein, DiIC1(5) and propidium iodide. *B*: for *panel 2*, probes: MitoTracker Deep Red (MTR) and MitoSOX Red. *C*: for *panel 3*, probes: tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) and Sytox Green. Note that the same unstained cells were used for MTR and DiIC1(5).

RESULTS

Optimization of the H/R Sequence in Suspension by Flow Cytometry Analysis in CM

Our primary goal was to design a new and innovative 1-day long protocol to explore the mechanisms of the tolerance of CM to H/R and screen protective treatments. We set up a modified version of the routinely used protocols of H/R. Since plated CM cannot be detached without affecting their viability and functions, we decided to perform the H/R sequence in a suspension of CM, under gentle shaking. Light shaking was effectively required to avoid potential plating of CM on the

dish and glass petri dishes were also used to decrease cell adhesion. The time duration of the H/R stress sequence was optimized to induce cell death yet still enabled the evaluation of the protective effect. Based on our previous H/R protocols (10, 24), we first considered three durations of hypoxia at 0.5% O₂: 45, 60, and 90 min (Fig. 4A). Flow cytometry analysis of PI-positive CM revealed that 60 and 90 min of hypoxia induced high levels of cell death (60 min: 87 ± 4%, 90 min: 84 ± 8%), leading to a very narrow window to reverse cell damage or create additional reoxygenation injury. Cell death averaged 63 ± 7% after 45 min of hypoxia (Fig. 4B); therefore, we chose 45 min as the hypoxia duration. Then,

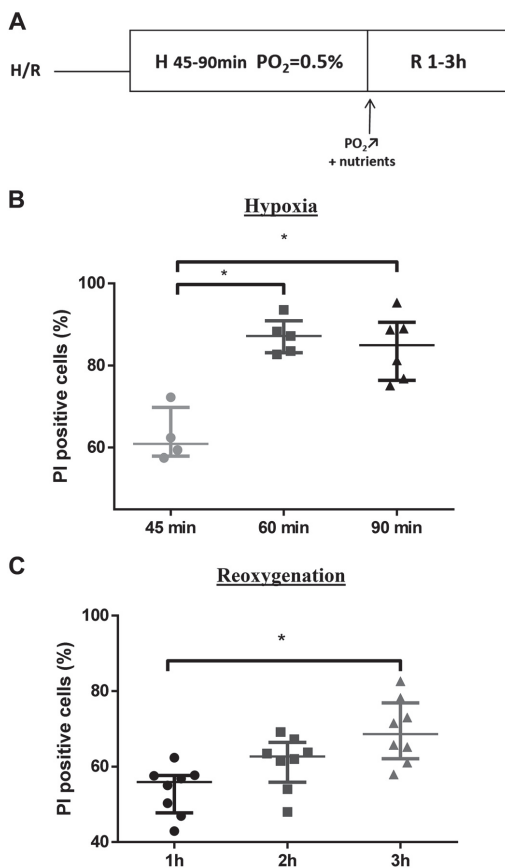


Fig. 4. Optimization of the sequence of hypoxia-reoxygenation on adult mouse cardiomyocytes. *A*: design of experimental procedure to optimize both hypoxia and reoxygenation (H/R) times. *B*: cell viability was evaluated by propidium iodide (PI) staining at the end of the different hypoxia durations (45, 60, and 90 min). Data were collected from 4 to 6 independent mice. *C*: cell viability was also evaluated by PI staining at the end of the different reoxygenation times (1, 2, and 3 h) following 45-min hypoxia. Data are from 8 independent mice. All data are expressed as a percentage of PI-positive cells. The nonparametric statistical test of Kruskal-Wallis with Dunn's post hoc test was performed. * $P < 0.05$. Data are expressed as median of percentage of population \pm interquartile (25%–75%).

we selected the optimal time of reoxygenation to obtain a major reoxygenation damage (Fig. 4C). There was a significant 28% increase in CM death between 1 and 3 h of reoxygenation, depicting the reoxygenation injury. Importantly, the percentage of dead CM in each group was comparable to that previously obtained in a plated model (10). Eventually, we set our H/R protocol in suspension to 45 min of hypoxia followed by 3 h of reoxygenation. This sequence was the optimal to induce CM death and to define the potential window for protective strategies.

Multilabeling Flow Cytometry Analysis of CM Allows Assessment of Protection Against H/R

We designed this new methodology both for screening putative protective interventions and for investigating the potential role of proteins in cardiovascular diseases using transgenic animals. To test the ability of our model to evaluate protective interventions (Fig. 5), we used CsA that has previously been shown to attenuate ischemia-reperfusion injury in various animal models (15, 29). We designed three complementary panels to simultaneously assess the effect of the administration at the time of reoxygenation of 1 μ M CsA, on both cell viability and mitochondrial functions, including 1) PI, DiIC1(5), and calcein; 2) MitoSOX and MitoTracker Deep Red; and 3) TMRM and Sytox Green. The baseline normoxia controls were used to address cells before exposure to H/R. The effect of CsA on reperfusion injury was evaluated by comparing groups exposed to H/R with or without CsA.

CsA significantly and consistently decreased cell death as measured either by PI or Sytox Green (i.e., due to the permeabilization of damaged cells) and calcein (Fig. 5A). Because CsA was added at the time of reoxygenation, the observed 13–15% decrease in cell death in the CsA-treated CM suggests a near 50% attenuation of the reoxygenation injury (Fig. 4), in agreement with the well-known protective effect of this drug. TMRM and DiIC1(5) were used to measure mitochondrial membrane potential in two different panels. No significant change in mitochondrial membrane potential was observed with DiIC1(5). In contrast, TMRM detected a decrease of negatively stained cells, suggesting a mild recovery of H/R-reduced mitochondrial membrane potential in CM after CsA treatment (Fig. 5B). CsA did not prevent the H/R-induced increase in superoxide anion production (MitoSOX) and did not modify the mitochondrial mass (MitoTracker Deep Red) (Fig. 5C). Overall, our multilabeling analysis by flow cytometry was able to confirm that CsA can attenuate CM cell death following H/R and further showed that this protection is not mediated by oxidative stress and does not involve any change in mitochondrial morphology. Data supplements can be found at <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11416749>.

DISCUSSION

Up to now, the use of flow cytometry for mechanistic studies in adult mouse CM has been limited by the high fragility and large size of these cells. Multilabeling analysis by flow cytometry allows an individual, qualitative, and quantitative unbiased characterization of cells. We here report and validate a new protocol that overcomes the cellular size and fragility issues.

There have been many attempts during the past three decades to develop new therapies that would attenuate ischemia-reperfusion injury and improve clinical outcomes in patients with acute ischemic heart disease (3, 19, 25, 30). Unfortunately, most studies were neutral or negative (7, 8, 11, 28, 32, 33). Part of the explanation might be due to insufficient in-depth understanding of the mechanisms of CM cell death after a prolonged ischemic insult. Although the adult mouse CM is recognized as a fragile cell model, it remains the most relevant for in vitro cardiac analysis when compared with cell lines or neonatal CM (4). Isolation of adult mouse CM has not been standardized, and there is still no reference method. A major challenge is to keep cells viable with

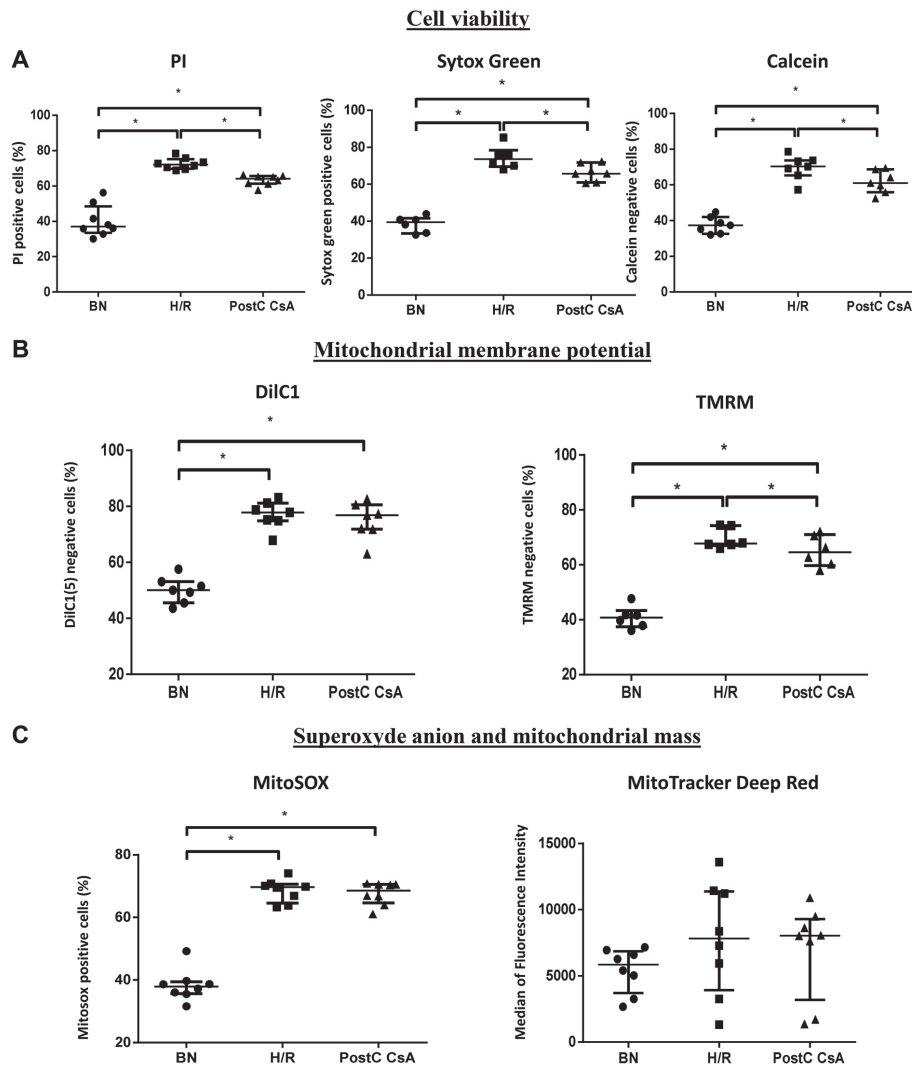


Fig. 5. Cyclosporine A (CsA) postconditioning (PostC) as a typical example of drug effect on cardiomyocytes (CM) after hypoxia-reoxygenation (H/R) by multilabeling flow cytometry analysis. Results are presented for the 3 experimental groups: basal normoxia (BN), H/R, and H/R + CsA. *A*: cell viability was assessed by staining with three fluorescent probes: propidium iodide (PI), calcein, and Sytox Green. Data are from 8 independent mice. *B*: impact of CsA on mitochondrial membrane potential, assessed by DiIc1(5) and tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) probes. Data are from 6 independent mice. *C*: MitoSOX and MitoTracker Deep Red allowed to measure reactive oxygen species production and mitochondrial mass, respectively. Data are from 8 independent mice. The nonparametric statistical test of Friedman followed by Student-Newman-Keuls post hoc test was performed. * $P < 0.05$. Data are expressed as median of percentage of population \pm interquartile (25%–75%) except for MitoTrackerDeep Red, where results are represented as median of fluorescence intensity \pm interquartile (25%–75%).

preserved morphological and metabolic characteristics. Investigation of adult CM functions remains complex and is usually done using spectrophotometry, spectrofluorometry, and microscopy. These techniques are time and material

consuming, have low statistical power, and carry a risk of biased analysis, notably in single-cell imaging.

We endeavored to adapt the powerful analytic potential of flow cytometry to isolated adult mouse CM. The originality of

our protocol sequence comes from the ability to keep the CM in suspension, to validate the gating of CM by flow cytometry, and to combine a hypoxia-reoxygenation stress to a multilabeling analysis. A disadvantage of the suspension method is that it leads to some extra cell death when compared with the plating model in which dead cells are washed away and only living cells stay attached to the matrix coating.

The constant development of new analytical tools and new fluorescent probes allowed us to perform multilabeling analysis in one single sample. We used H/R and a known protective treatment, CsA, to examine the sensitivity of our methodology. In line with previous *in vitro* and *in vivo* studies (5, 18, 22, 29), our new model was able to show the protective effect of CsA on cell death, as assessed by three different markers with a limited variability and a good sensitivity. PI and Sytox Green, working as intercalating agents, showed comparable results to the cell-permeant fluorescent probe calcein, *i.e.*, validating the combination of these probes in different panels. Currently available fluorescent probes allow assessment of other cell death pathway (apoptosis and autophagy) as well as various functions such as calcium fluxes (Fluo 4 and Rhod 2) or intracellular pH variations (SNARF indicators).

Our protocol can be applied with all existing and to-be-developed fluorescent probes. It can also be extended to compare transgenic animals for proteins supposedly involved in cardiovascular diseases. This method is particularly suitable for studying valuable samples, with limited amount of tissue, such as cardiomyocytes isolated from patient left ventricle biopsies during cardiac surgery.

In conclusion, we expect that this new method will expand and accelerate innovative research in the field of cardiac biology. It could be applied to studies of other stresses, such as oxidative stress and inflammation, which are two major processes involved into irreversible tissue damage during acute myocardial infarction.

Strengths and Limitations

Strengths. We set up a new original method to keep the adult mouse CM in suspension and allow multilabeling analysis by flow cytometry. We used a sequence of hypoxia-reoxygenation as a stress to demonstrate the possibility to measure cellular parameters after a combined stress and pharmacological treatment (CsA). This new approach not only enables the measurements of several physiological parameters from a single preparation of primary cardiac cells, but it also represents a time-saving method, limiting the number of animals used to achieve the required statistical power, in line with the 3R rules of the applicable regulations of animal experimentation.

Compared with routinely used sequences of plated H/R followed by microscopy analysis, our new approach provides several advantages: 1) it enables the measurements of several physiological parameters from a single preparation of primary cardiac myocytes; 2) it represents a time-saving method; 3) it limits the number of animals used to achieve the required statistical power, in agreement with the 3R rules imposed by the applicable regulations of animal experimentation, and 4) it decreases the risk of biased data.

Limitations. This method has been set up based on the material available in our laboratory and according to the CM isolation protocol described in this article. Depending on the

animal species (mouse, rat, pig, human...), the isolation method (Langendorff, syringe, enzyme type...), and the material used to realize the sequence (incubator, shaking platform) may be adjusted. Our *in vitro* proposed method should be considered as a first step in a screening strategy to eliminate the toxic and noneffective candidates and should be used in combination with *in vivo* cardiac ischemia-reperfusion models in mice to validate the *in vivo* efficiency of potential candidates (14). The demonstrated dedifferentiation of mouse CM after 24 h unfortunately precludes a longer reoxygenation time to assess long-term effect of H/R.

GRANTS

This work was supported by the Institut Hospitalo Universitaire OPeRa Grant ANR-10-IBHU-004 within the program "Investissements d'Avenir" operated by the French National Research Agency and by the RHU-MARVELOUS within the program "Investissements d'Avenir" operated by the French National Research Agency.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.P. and C.C.D.S. conceived and designed research; A.P., N.T., M.P., L.P., L.G., N.G.B., C.C., C.L., and C.C.D.S. performed experiments; A.P., N.T., N.G.B., C.C., and C.C.D.S. analyzed data; A.P., N.T., M.P., and C.C.D.S. interpreted results of experiments; A.P., N.T., and C.C.D.S. prepared figures; A.P., N.T., M.P., L.G., and C.C.D.S. drafted manuscript; A.P., N.T., M.P., S.B., Z.H., M.O., and C.C.D.S. edited and revised manuscript; A.P., N.T., M.P., L.P., L.G., N.G.B., C.C., C.L., S.B., Z.H., M.O., and C.C.D.S. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Abas L, Bogoyevitch MA, Guppy M. Mitochondrial ATP production is necessary for activation of the extracellular-signal-regulated kinases during ischaemia/reperfusion in rat myocyte-derived H9c2 cells. *Biochem J* 349: 119–126, 2000. doi:10.1042/bj3490119.
- Ackers-Johnson M, Li PY, Holmes AP, O'Brien SM, Pavlovic D, Foo RS. A simplified, Langendorff-free method for concomitant isolation of viable cardiac myocytes and nonmyocytes from the adult mouse heart. *Circ Res* 119: 909–920, 2016. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.309202.
- Araszkievicz A, Grygier M, Pyda M, Rajewska J, Michalak M, Lesiak M, Grajek S. Postconditioning reduces enzymatic infarct size and improves microvascular reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Cardiology* 129: 250–257, 2014. doi:10.1159/000367965.
- Bötter HE, Hausenloy D, Andreadou I, Antonucci S, Boengler K, Davidson SM, Deshwal S, Devaux Y, Di Lisa F, Di Sante M, Efentakis P, Femminò S, García-Dorado D, Gircz Z, Ibanez B, Iliodromitis E, Kaludercic N, Kleinbongard P, Neuhäuser M, Ovize M, Pagliaro P, Rahbek-Schmidt M, Ruiz-Meana M, Schlüter KD, Schulz R, Skyschally A, Wilder C, Yellon DM, Ferdinandy P, Heusch G. Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 113: 39, 2018. doi:10.1007/s00395-018-0696-8.
- Cour M, Abrial M, Jahandiez V, Loufouat J, Belaïdi E, Gharib A, Varennes A, Monneret G, Thibault H, Ovize M, Argaud L. Ubiquitous protective effects of cyclosporine A in preventing cardiac arrest-induced multiple organ failure. *J Appl Physiol* (1985) 117: 930–936, 2014. doi:10.1152/jappphysiol.00495.2014.
- Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, Bonnefoy-Cudraz E, Guérin P, Elbaz M, Delarche N, Coste P, Vanzetto G, Metzger M, Aupetit JF, Jouve B, Motreff P, Tron C, Labeque JN, Steg PG, Cottin Y, Range G, Clerc J, Claeys MJ, Coussement P, Prunier F, Moulin F, Roth O, Belle L, Dubois P, Barragan P, Gilard M, Piot C, Colin P, De Poli F, Morice MC, Ider O, Dubois-Randé JL, Untersee T, Le Breton H, Béard T, Blanchard D, Grollier G, Malquarti V, Staat P, Sudre A, Elmer E, Hansson MJ, Bergerot C, Boussaha I, Jossan C, Derumeaux G, Newton N, Ovize

- M. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 373: 1021–1031, 2015. doi:10.1056/NEJMoa1505489.
7. Dwyer NB, Mikami Y, Hilland D, Aljizeeri A, Friedrich MG, Traboulsi M, Anderson TJ. No cardioprotective benefit of ischemic postconditioning in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Interv Cardiol* 26: 482–490, 2013. doi:10.1111/joic.12064.
 8. Freixa X, Beltera N, Ortiz-Pérez JT, Jiménez M, Paré C, Bosch X, De Caralt TM, Betriu A, Masotti M. Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 33: 103–112, 2012. doi:10.1093/eurheartj/ehr297.
 9. Givvimani S, Pushpakumar SB, Metreveli N, Veeranki S, Kundu S, Tyagi SC. Role of mitochondrial fission and fusion in cardiomyocyte contraction. *Int J Cardiol* 187: 325–333, 2015. doi:10.1016/j.ijcard.2015.03.352.
 10. Gomez L, Thiebaut PA, Paillard M, Ducreux S, Abrial M, Crola Da Silva C, Durand A, Alam MR, Van Coppenolle F, Sheu SS, Ovize M. The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3 β during reperfusion injury. *Cell Death Differ* 23: 313–322, 2016 [Erratum in *Cell Death Differ* 22: 1890, 2015]. doi:10.1038/cdd.2015.101.
 11. Hahn JY, Song YB, Kim EK, Yu CW, Bae JW, Chung WY, Choi SH, Choi JH, Bae JH, An KJ, Park JS, Oh JH, Kim SW, Hwang JY, Ryu JK, Park HS, Lim DS, Gwon HC. Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial. *Circulation* 128: 1889–1896, 2013. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001690.
 12. Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolvekar S, Knight R, Kunst G, Laing C, Nicholas J, Pepper J, Robertson S, Xenou M, Clayton T, Yellon DM; ERICCA Trial Investigators. Remote ischemic preconditioning and outcomes of cardiac surgery. *N Engl J Med* 373: 1408–1417, 2015. doi:10.1056/NEJMoa1413534.
 13. Hausenloy DJ. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res* 116: 674–699, 2015. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305348.
 14. Ibanez B, Aletras AH, Arai AE, Arheden H, Bax JJ, Berry C, Bucciarelli-Ducci C, Croisille P, Dall'Armellina E, Dharmakumar R, Eitel I, Fernández-Jiménez R, Friedrich MG, García-Dorado D, Hausenloy DJ, Kim RJ, Kozek S, Kramer CM, Salerno M, Sánchez-González J, Sanz J, Fuster V. Cardiac MRI endpoints in myocardial infarction experimental and clinical trials: JACC Scientific Expert Panel. *J Am Coll Cardiol* 74: 238–256, 2019. doi:10.1016/j.jacc.2019.05.024.
 15. Ikeda G, Matoba T, Nakano Y, Nagaoka K, Ishikita A, Nakano K, Funamoto D, Sunagawa K, Egashira K. Nanoparticle-mediated targeting of cyclosporine A enhances cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Sci Rep* 6: 20467, 2016. doi:10.1038/srep20467.
 16. Kamiya K, Guo W, Yasui K, Toyama J. Hypoxia inhibits the changes in action potentials and ion channels during primary culture of neonatal rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31: 1591–1598, 1999. doi:10.1006/jmcc.1999.0992.
 17. Larcher V, Kunderfranco P, Vacchiano M, Carullo P, Erreni M, Salamon I, Colombo FS, Lugli E, Mazzola M, Anselmo A, Condorelli G. An autofluorescence-based method for the isolation of highly purified ventricular cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 114: 409–416, 2018. doi:10.1093/cvr/cvx239.
 18. Lemoine S, Pillot B, Augeul L, Rabeyrin M, Varennes A, Normand G, Baetz D, Ovize M, Juillard L. Dose and timing of injections for effective cyclosporine A pretreatment before renal ischemia reperfusion in mice. *PLoS One* 12: e0182358, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0182358.
 19. Lönborg J, Kelbaek H, Vejstrup N, Jørgensen E, Helqvist S, Saunamäki K, Clemmensen P, Holmvang L, Treiman M, Jensen JS, Engström T. Cardioprotective effects of ischemic postconditioning in patients treated with primary percutaneous coronary intervention, evaluated by magnetic resonance. *Circ Cardiovasc Interv* 3: 34–41, 2010. doi:10.1161/CIRCINTERVENTIONS.109.905521.
 20. López JE, Jaradeh K, Silva E, Aminololama-Shakeri S, Simpson PC. A method to increase reproducibility in adult ventricular myocyte sizing and flow cytometry: avoiding cell size bias in single cell preparations. *PLoS One* 12: e0186792, 2017. doi:10.1371/journal.pone.0186792.
 21. Louch WE, Sheehan KA, Wolska BM. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J Mol Cell Cardiol* 51: 288–298, 2011. doi:10.1016/j.yjmcc.2011.06.012.
 22. Nighoghossian N, Ovize M, Mewton N, Ong E, Cho TH. Cyclosporine A, a potential therapy of ischemic reperfusion injury: a common history for heart and brain. *Cerebrovasc Dis* 42: 309–318, 2016. doi:10.1159/000446850.
 23. O'Connell TD, Rodrigo MC, Simpson PC. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol Biol* 357: 271–296, 2007. doi:10.1385/1-59745-214-9:271.
 24. Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, Gomez L, Fauconnier J, Crola Da Silva C, Teixeira G, Mewton N, Belaidi E, Durand A, Abrial M, Lacampagne A, Rieusset J, Ovize M. Depressing mitochondrial interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* 128: 1555–1565, 2013. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001225.
 25. Sloth AD, Schmidt MR, Munk K, Kharbada RK, Redington AN, Schmidt M, Pedersen L, Sørensen HT, Bøtker HE; CONDI Investigators. Improved long-term clinical outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing remote ischaemic conditioning as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J* 35: 168–175, 2014. doi:10.1093/eurheartj/ehz369.
 26. Smith AJ, Lewis FC, Aquila I, Waring CD, Nocera A, Agosti V, Nadal-Ginard B, Torella D, Ellison GM. Isolation and characterization of resident endogenous c-Kit⁺ cardiac stem cells from the adult mouse and rat heart. *Nat Protoc* 9: 1662–1681, 2014. doi:10.1038/nprot.2014.113.
 27. Strijdom H, Muller C, Lochner A. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. *J Mol Cell Cardiol* 37: 897–902, 2004. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.05.018.
 28. Tarantini G, Favaretto E, Marra MP, Frigo AC, Napodano M, Cacciavillani L, Giovagnoni A, Renda P, De Biasio V, Plebani M, Mion M, Zaninotto M, Isabella G, Bilato C, Iliceto S. Postconditioning during coronary angioplasty in acute myocardial infarction: the POST-AMI trial. *Int J Cardiol* 162: 33–38, 2012. doi:10.1016/j.ijcard.2012.03.136.
 29. Teixeira G, Abrial M, Portier K, Chiari P, Couture-Lepetit E, Tourneur Y, Ovize M, Gharib A. Synergistic protective effect of cyclosporin A and rotenone against hypoxia-reoxygenation in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 56: 55–62, 2013. doi:10.1016/j.yjmcc.2012.11.023.
 30. Thibault H, Piot C, Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit JF, Finet G, André-Fouët X, Macia JC, Racza F, Rossi R, Itti R, Kirkorian G, Derrumieux G, Ovize M. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation* 117: 1037–1044, 2008. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.729780.
 31. Valiente-Alandi I, Albo-Castellanos C, Herrero D, Arza E, Garcia-Gomez M, Segovia JC, Capecci M, Bernad A. Cardiac Bmi1(+) cells contribute to myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Res Ther* 6: 205, 2015. doi:10.1186/s13287-015-0196-9.
 32. Woo JS, Kim W, Ha SJ, Kim JB, Kim SJ, Kim WS, Seon HJ, Kim KS. Cardioprotective effects of exenatide in patients with ST-segment-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of exenatide myocardial protection in revascularization study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33: 2252–2260, 2013. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301586.
 33. Xu X, Zhou Y, Luo S, Zhang W, Zhao Y, Yu M, Ma Q, Gao F, Shen H, Zhang J. Effect of remote ischemic preconditioning in the elderly patients with coronary artery disease with diabetes mellitus undergoing elective drug-eluting stent implantation. *Angiology* 65: 660–666, 2014. doi:10.1177/0003319713507332.

1.3. Heat-shock protein 70 as a biomarker of clinical outcomes after

STEMI

a) Introduction

Comme présenté précédemment, le projet de la cohorte HIBISCUS était double, définir la cinétique de libération des facteurs de l'inflammation dans la phase très précoce de l'infarctus du myocarde et découvrir de nouveaux biomarqueurs de la sévérité de l'infarctus. Dans cette seconde optique, les taux circulants d'un très grand nombre de cytokines et acteurs de l'inflammation tels que les DAMPs ont été évalués dans le sérum des patients STEMI. La protéine heat shock protein 70 (HSP70) est une protéine de stress inductible dont l'augmentation de son expression intracellulaire entraîne une protection des CMA contre les lésions d'ischémie-reperfusion²⁹⁰. En revanche sa libération cellulaire par les CMA mourant joue un rôle majeur dans l'activation de l'inflammation^{291,292}. Notre objectif avec cette étude était de déterminer la cinétique de libération de HSP70 dans la phase précoce de l'infarctus du myocarde et d'évaluer sa corrélation avec la survenue d'évènements cardiovasculaires majeurs. Nous avons démontré que le taux circulant de HSP70 atteint son pic quatre heures après l'admission. Les patients présentant un taux circulant de HSP70 supérieur à la médiane de la population présentent une taille d'infarctus plus grande, une plus grande dilatation ventriculaire gauche et une augmentation du nombre d'évènements cardiovasculaires majeurs par rapports aux patients présentant un taux circulant de HSP70 à H4 inférieur à la médiane de la population.

Dans cette étude, j'ai participé au choix de la cible, à la mesure des taux circulants de HSP70 dans le sérum et à l'analyse des résultats.

Letters

Heat Shock Protein 70 as a Biomarker of Clinical Outcomes After STEMI



Inflammation is a major component of tissue repair after acute myocardial infarction (MI). Excessive inflammation exacerbates myocardial injury in some circumstances. Little is known regarding the modulators of the inflammatory response after MI. Damage-associated molecular patterns (DAMPs), also known as alarmins, are molecules released by injured cells that contribute to the initiation of the inflammatory response after MI. Heat shock protein 70 (HSP70) is a 70-kd stress-inducible protein whose intracellular increased expression improves the tolerance of cardiomyocytes to ischemia/reperfusion injury (I/R) (1). Alternatively, when released from injured cardiomyocytes during acute MI, HSP70 may behave as a DAMPs and trigger detrimental pro-inflammatory effects (2-4). However, its release kinetics and potential relationship with clinical outcome are unknown. Our objective was to determine the kinetics of HSP70 release within the first month after acute MI in a population of patients admitted for ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) and its relationship with infarct size, left ventricular (LV) remodeling, and clinical prognosis.

From 2016 to 2018, we prospectively enrolled in our hospital 251 consecutive patients with STEMI who underwent percutaneous coronary intervention (PCI) revascularization into a prospective cohort. Blood samples were collected at 5 time points: admission and 4 h, 24 h, 48 h, and 1 month after admission (H0, H4, H24, H48, M1). Samples were stored at -80°C . HSP70 serum levels were assessed using an enzyme-linked immunosorbent assay (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota) according to the manufacturer's instructions. Patients underwent cardiac magnetic resonance imaging at 1 month for infarct size and LV ejection fraction assessment. Clinical outcomes were prospectively recorded. We used GraphPad Prism version 8.2.1 (GraphPad, La Jolla, California) for

statistical analysis. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to compare HSP70 levels at different time points. Comparison of survival curves was made using the log-rank (Mantel-Cox) test. A p value <0.05 was considered to be statistically significant.

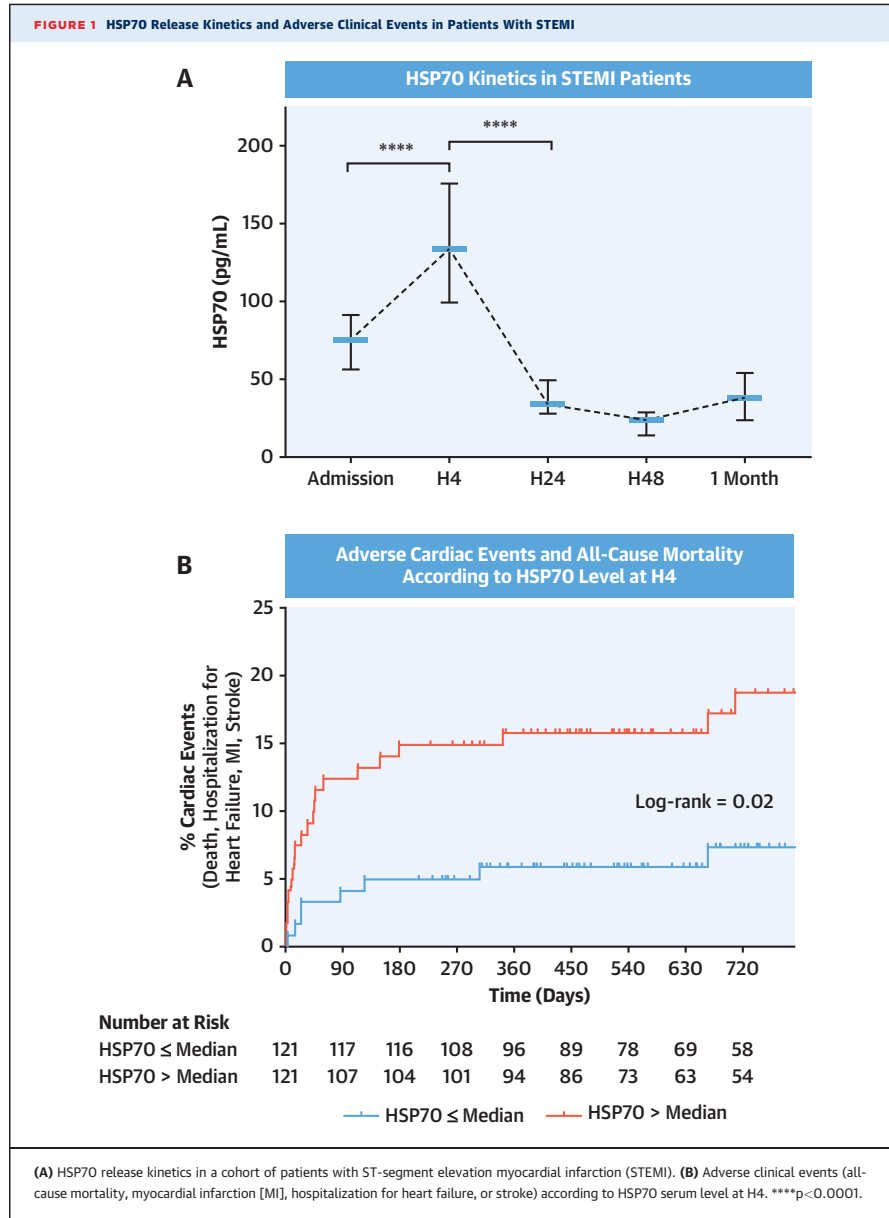
The mean age of the study population was 59 ± 12 years, and 48.5% patients exhibited anterior MI. Serum HSP70 significantly increased at H4 with a median of 133.7 pg/ml (95% confidence interval: 99.2 to 175.6 pg/ml) and was back to near baseline level at H24 (Figure 1A).

We compared patients with HSP peak level over versus under the median value of the study population. Patients with an HSP70 peak level greater than the median displayed a significantly larger final infarct size (17.2% [interquartile range (IQR): 11.0% to 29.3%] of LV mass vs. 9.1% [IQR: 4.5% to 20.0%]; $p < 0.0001$), a significantly larger indexed LV end-systolic volume (45.0 ml/m^2 [IQR: 35.1 to 55.0 ml/m^2] vs. 37.3 ml/m^2 [IQR: 29.7 to 47.1 ml/m^2]; $p = 0.001$), and a significantly lower LVEF (50.0% [IQR: 41.3% to 57.0%] vs. 55.0% [IQR: 48.0% to 59.0%]; $p = 0.001$) on cardiac magnetic resonance imaging.

A total of 27 patients experienced a clinical adverse event during the median 18-month follow-up (5 all-cause deaths, 4 MIs, 4 strokes, and 14 hospitalizations for heart failure). Patients with peak levels of HSP70 over the median value of the population were more likely to have an adverse clinical event during the first 18 months after STEMI (hazard ratio: 2.6; 95% confidence interval: 1.2 to 5.8; $p = 0.02$) (Figure 1B).

Although the role of HSP70 as DAMPs remains debated, it is admitted that extracellular HSP70 is a modulator of the inflammatory response (5). We report that MI is associated with a significant early and transient increase of HSP70 release. Importantly, patients exhibiting high HSP70 levels have larger infarcts, increased LV dilatation, and worse clinical outcome at 18 months after MI. This suggests that serum HSP70 might be an early prognosis biomarker in patients with STEMI.

*Thomas Bochaton, MD, PhD
Alexandre Paccalet, PhD
Pierre Jeantet, MD
Claire Crola Da Silva, PhD



Régine Cartier, MD, PhD
Cyril Prieur, MD
Claire Jossan, MSc
Eric Bonnefoy-Cudraz, MD, PhD
Nathan Mewton, MD, PhD
Michel Ovize, MD, PhD
*Cardiac Intensive Care Unit
Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon
59 Boulevard Pinel
F-69500 Bron
France
AND
Claude Bernard University Lyon 1
43 Boulevard du 11 Novembre 1918
F-69100 Villeurbanne
France
E-mail: thomas.bochaton@chu-lyon.fr
Twitter: @CHUdeLyon, @alexPaccalet
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.10.044>

© 2020 by the American College of Cardiology Foundation. Published by Elsevier.

Please note: This work was supported by the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" operated by the French National Research Agency (ANR). The authors thank the Clinical Investigation Center (Inesse Boussaha, Camille Amaz) and NeuroBiotec (Dr. N. Dufay) for all of the work that has been performed in data collection and management for this study. The authors also thank Murielle Robert for her help, and Danka Tomasevic and Nathalie Genot for their support.

REFERENCES

1. Tanimoto T, Parseghian MH, Nakahara T, et al. Cardioprotective effects of HSP72 administration on ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol* 2017; 70:1479-92.
2. Song Y-J, Zhong C-B, Wang X-B. Heat shock protein 70: a promising therapeutic target for myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Cell Physiol* 2019;234:1190-207.
3. Mathur S, Walley KR, Wang Y, Indrambarya T, Boyd JH. Extracellular heat shock protein 70 induces cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction via TLR2. *Circ J* 2011;75:2445-52.
4. Dybdahl B, Størdahl SA, Waage A, Kierulf P, Espevik T, Sundan A. Myocardial ischaemia and the inflammatory response: release of heat shock protein 70 after myocardial infarction. *Heart* 2005;91:299-304.
5. Broere F, van der Zee R, van Eden W. Heat shock proteins are no DAMPs, rather "DAMPERS." *Nat Rev Immunol* 2011;11:565.

Safely Ruling Out Myocardial Infarction Using a Single Cutoff Troponin Measurement



We congratulate Sandoval et al. (1) for their important study confirming, for the first time in a U.S.-based study, the safety and efficacy of using a single high-sensitivity cardiac troponin I (hs-cTnI) measurement strategy for stratifying patients with suspected myocardial infarction (MI). May we kindly ask the

investigators to provide some additional information to help put their findings into clinical perspective?

First, adjudication of MI performed at each study site included concentrations of cTn measured by different contemporary and not hs-cTn assays (except for 1 site). Please estimate the percentage of missed MIs using these less sensitive assays and the resulting drop in sensitivity if applied in clinical practice using hs-cTnI. Previous studies found a relative increase in the prevalence of MI of 22% (2). Second, please quantify the time from chest pain onset and time from presentation to the first study-specific blood draw. We are highly concerned that due to major delays in getting the first sample, your findings related to early presenters may not apply to clinical practice. Please provide the sensitivity for early presenters defined as time from chest pain onset to study blood draw <3 h (3,4). Clinicians obviously need this information. Third, 20% of patients did not have chest pain. Could such a high proportion of non-chest pain patients have overestimated the overall safety, because in patients with chest pain, sensitivity decreased to 98%?

Pedro Lopez-Ayala, MD
Luca Koechlin, MD
Jasper Boeddinghaus, MD
Thomas Nestelberger, MD
*Christian Mueller, MD, Prof

*CRIB and Department of Cardiology
University Hospital Basel
Petersgraben 4
CH-4031 Basel
Switzerland
E-mail: christian.mueller@usb.ch
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.08.1074>

© 2020 by the American College of Cardiology Foundation. Published by Elsevier.

Please note: Dr. Koechlin has received research grants from the University of Basel, the Swiss Academy of Medical Sciences, and the Gottfried and Julia Bangerter-Rhyner Foundation, as well as the "Freiwillige Akademische Gesellschaft Basel." Dr. Boeddinghaus has received research grants from the University Hospital of Basel, the Division of Internal Medicine, the University of Basel, the Swiss Academy of Medical Sciences and the Gottfried and Julia Bangerter-Rhyner Foundation; and has received speaker/consulting honoraria from Siemens, Roche Diagnostics, and Ortho Clinical Diagnostics. Dr. Nestelberger has received speaker honoraria/consulting honoraria from Beckman-Coulter and Ortho Clinical Diagnostics. Prof. Mueller has received research support from the Swiss National Science Foundation, the Swiss Heart Foundation, the KTI, the Stiftung für kardiovaskuläre Forschung Basel, Abbott, Quidel, AstraZeneca, Beckman Coulter, Biomerieux, Brahms, Ortho Diagnostics, Roche, Siemens, Singulex, Sphingotec, the University of Basel, the University Hospital Basel; and has received speaker/consulting honoraria from Abbott, Amgen, AstraZeneca, Biomerieux, Boehringer Ingelheim, BMS, Brahms, Idorsia, Novartis, Roche, Sanofi, Siemens, and Singulex. Dr. Lopez-Ayala has reported that he has no relationships relevant to the contents of this paper to disclose.

REFERENCES

1. Sandoval Y, Nowak R, DeFilippi CR, et al. Myocardial infarction risk stratification with a single measurement of high-sensitivity troponin I. *J Am Coll Cardiol* 2019;74:271-82.

1.4. Association of myocardial hemorrhage and persistent microvascular obstruction with circulating inflammatory biomarkers in STEMI patients

a) Introduction

L'obstruction micro-vasculaire post-infarctus et l'hémorragie cardiaque sont associées à une diminution des fonctions cardiaques et à une augmentation du risque d'évènements secondaires à l'infarctus du myocarde. En revanche ses corrélations avec des marqueurs inflammatoires est encore inconnue. Nous avons utilisé dans cette étude la cohorte de patients RIFIFI. Cette cohorte inclus 22 patients admis à l'hôpital Louis Pradel pour un STEMI. Sept prélèvements sanguins sont réalisés, à l'admission, 4h (H4), 12h (H12), 24h (H24), 48h (H48), 1 semaine (1W) et 1 mois après l'admission (M1). Une imagerie par résonance magnétique est réalisée à 1 semaine pour évaluer la taille d'infarctus, l'obstruction micro-vasculaire et l'hémorragie cardiaque. Les résultats de cette étude montrent que les patients souffrant d'hémorragie intracardiaque présentent des taux circulants d'IL-6, de neutrophiles, de CRP et de fibrinogène supérieur aux patients non hémorragiques. Les patients souffrants d'obstruction micro-vasculaire présentes des taux circulants de ces marqueurs également supérieurs à l'exception des taux d'IL-6. L'inflammation jouant un rôle central dans la survenue d'évènements secondaires²⁹³, cibler la diminution de l'hémorragie intracardiaque peu donc devenir une cible thérapeutique importante dans le STEMI.

Dans cette étude, j'ai participé au dosage des sécrétions cytokiniques et à l'analyse des résultats.

RESEARCH ARTICLE

Association of myocardial hemorrhage and persistent microvascular obstruction with circulating inflammatory biomarkers in STEMI patients

Thomas Bochaton^{1,2*}, Jules Lassus³, Alexandre Paccalet¹, François Derimay⁴, Gilles Rioufol⁴, Cyril Prieur², Eric Bonnefoy-Cudraz², Claire Crola Da Silva¹, Hugo Bernelin², Camille Amaz⁵, Sylvie Espanet⁵, Charles de Bourguignon⁵, Nathalie Dufay⁶, Régine Cartier⁷, Pierre Croisille⁸, Michel Ovize^{1,5,9}, Nathan Mewton^{1,5}

1 INSERM U1060, CarMeN Laboratory, Université de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Bron, France, **2** Unité de Soins Intensifs Cardiologiques, Hôpital Louis Pradel et Université Claude Bernard, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, **3** Centre Hospitalier Universitaire de Martinique, Université des Antilles, Fort de France, France, **4** Department of Interventional Cardiology, Cardiovascular Hospital and Claude-Bernard University, Bron, France, **5** Centre d'investigation Clinique de Lyon, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, **6** NeuroBioTec, Groupement Hospitalier Est, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, Bron, France, **7** Centre de biologie Est, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, **8** Université de Lyon, Université Jean-Monnet Saint-Etienne, INSA, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche, Creatis, Saint-Etienne, France, **9** Service d'explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

* thomas.bochaton@chu-lyon.fr



OPEN ACCESS

Citation: Bochaton T, Lassus J, Paccalet A, Derimay F, Rioufol G, Prieur C, et al. (2021) Association of myocardial hemorrhage and persistent microvascular obstruction with circulating inflammatory biomarkers in STEMI patients. *PLoS ONE* 16(1): e0245684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245684>

Editor: Stephane Germain, Centre National de la Recherche Scientifique, FRANCE

Received: July 6, 2020

Accepted: January 1, 2021

Published: January 28, 2021

Copyright: © 2021 Bochaton et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: The data underlying the results presented in the study are the property of the Hospices Civils de Lyon. Furthermore, currently, we do not have authorization in the content form from patients to share any personal data with third external parties. Upon request for scientific collaborations we are ready to file the appropriate forms with our regulatory authorities and ask patients' permission to share de-identified data. you can request access to the data by submitting an email to the person in charge at the

Abstract

Introduction

Myocardial hemorrhage (IMH) and persistent microvascular obstruction (MVO) are associated with impaired myocardial recovery and adverse clinical outcomes in STEMI patients. However, their relationship with circulating inflammatory biomarkers is unclear in human patients.

Methods and results

Twenty consecutive patients referred for primary percutaneous coronary intervention of first STEMI were included in a prospective study. Blood sampling was performed at admission, 4, 12, 24, 48 hours, 7 and 30 days after reperfusion for inflammatory biomarker (C reactive protein, fibrinogen, interleukin-6 (IL-6) and neutrophils count) assessment. At seven days, cardiovascular magnetic resonance (CMR) was performed for infarct size, MVO and IMH assessment. Median infarct size was 24.6% Interquartile range (IQR) [12.0–43.5] of LV mass and edema was 13.2% IQR [7.7–36.1] of LV mass. IL-6 reached a peak at H24 (5.6 pg/mL interquartile range (IQR) [2.5–17.5]), CRP at H48 (11.7 mg/L IQR [7.1–69.2]), fibrinogen one week after admission (4.4 g/L IQR [3.8–6.7]) and neutrophils at H12 (9.0 G/L IQR [6.5–12.7]). MVO was present in 11 patients (55% of the study population) and hemorrhage in 7 patients (35%). Patients with IMH had significantly higher IL-6, CRP, fibrinogen, and neutrophils levels compared to patients without IMH. Patients with persistent MVO had

Direction de la Recherche Clinique et de l'Innovation des Hospices Civils de Lyon: METZINGER, Anne: anne.metzinger@chu-lyon.fr

We confirm that we have received special privileges in accessing the data. We, the authors, are the principal investigators of this study, meaning we are doctors and we are the ones who designed the submitted protocol, obtained authorizations, and also, obtained the written informed consent of all patients participants in the trial for the purpose of the study that we are presenting in this manuscript. We designed the CRF, we obtained the funding for this study, we collected the data and analyzed it (biomarkers and CMRs).

Funding: The RIFIFI study was supported by grants from the French Ministry of Health and Research National Program (Programme Hospitalier de Recherche Clinique National 2010) and NeuroVive Pharmaceutical. M. Ovize has been supported by the OPeRa (ANR-10-IBHU-0004 OPeRa) and the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) programs. N. Mewton also received a grant from the French Federation of Cardiology (René Foudon) for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

significantly higher CRP, fibrinogen and neutrophils level compared to patients without MVO, but identical IL-6 kinetics.

Conclusion

In human patients with acute myocardial infarction, intramyocardial hemorrhage appears to have a stronger relationship with inflammatory biomarker release compared to persistent MVO. Attenuating myocardial hemorrhage may be a novel target in future adjunctive STEMI treatments.

Introduction

Cardiovascular disease, including acute myocardial infarction (MI), is the leading cause of death in Western countries [1,2]. Early reperfusion is currently the most effective treatment to reduce infarct size (IS) resulting from MI [3]. Although reperfusion reduces IS, it causes additional myocardial damage by itself. This process is called ischemia-reperfusion (I/R) injury [4]. Among, the different mechanisms involved in I/R injury, inflammation plays a significant part in the final damage to the ischemic myocardium [5]. The necrosis of ischemic cardiomyocytes triggers an intense inflammatory reaction releasing several mediators, including cytokines [6]. An excessive inflammatory response can cause adverse effects, leading to left ventricular remodeling (LV) and heart failure [5]. Inflammation is assessed through several biomarkers. C-reactive protein (CRP), interleukin-6 (IL-6), fibrinogen and neutrophils count are key inflammatory biomarkers and have been widely studied. They are all related to infarct size and long-term prognosis following MI [7–13]. However, the release kinetics of these biomarkers in reperfused human patients and their relationship with specific components of myocardial injury is poorly known [5,14,15].

Contrast-enhanced cardiovascular magnetic resonance (CMR) is a non-invasive technique that allows the accurate assessment of infarct size, edema, and areas with persistent microvascular obstruction (MVO) or intramyocardial hemorrhage (IMH) [16]. MVO and IMH are independent predictors of adverse LV remodeling and major adverse cardiovascular events (MACE) [16]. In experimental models of ischemia-reperfusion, it was shown that hemoglobin extravasation occurring during MVO and IMH induce a deposit of ferric iron crystals within the infarcted myocardium [17]. These iron crystals induce a sustained pro-inflammatory response [17]. The relationship between post-MI inflammation and the presence of MVO and IMH are not known.

The primary objective of our study was to assess the relationship between markers of CMR severity (IMH and persistent MVO) and the kinetics of the main pro-inflammatory biomarkers (CRP, fibrinogen, IL-6 and neutrophils count) in patients with a first acute ST-elevation myocardial infarction (STEMI) referred for primary percutaneous coronary intervention.

Methods

Study population

Consecutive patients admitted with a STEMI and referred for primary percutaneous coronary intervention (PCI) were prospectively enrolled at a single tertiary university hospital. STEMI was defined by the presence of clinical symptoms associated with an ST-elevation of more than 2 mm in two contiguous leads on a standard 12-lead electrocardiogram, or recent Left

Bundle Branch Block (LBBB), and presentation within 12-hours of symptom onset according to the European Society of Cardiology [18].

Only patients with a single occluded infarct-related artery (Thrombolysis in Myocardial Infarction grade ≤ 1) and optimal reperfusion (final TIMI flow ≥ 2) were included. To obtain a broad sample of infarct size, half of the patient population had a STEMI in the anterior territory and the other half in the inferior territory (LAD and RCA culprit coronary respectively). These selection criteria were set before patient enrollment.

Patients were included if they had: (i) no previous MI, (ii) demonstrated acute single-vessel occlusion; right coronary artery or left coronary artery, (iii) underwent optimal revascularization with TIMI flow ≥ 2 post PCI (iv) had no contraindications to CMR imaging.

Reasons for non-inclusion were as follow: history of prior myocardial infarction, cardiogenic shock, prior cardiac arrest, any contraindication to cardiac CMR (claustrophobia, pacemaker or cardiac defibrillator, known allergy to gadolinium), presence of permanent atrial fibrillation, unconscious patient, severe renal insufficiency (creatinine clearance ≤ 30 ml/min/m² or renal replacement therapy), long-term immunosuppressive therapy or chronic immunosuppression.

Our institutional review board and Ethics Committee approved this prospective monocentric study. All patients gave written informed consent. The trial design and protocol have been registered ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02823886.

Blood sampling protocol

Seven blood samples were collected for each patient. Venous blood samples were collected at admission to the hospital immediately before PCI and 4 hours, 12 hours, 1 day, 2 days, one week and one month following successful revascularization (H0 H4, H12, H24, H48, 1 week, and 1 month). Each blood sample was centrifuged and treated carefully and stored at the NeuroBioTec Biological Resource Center at -80° C within 4 hours of blood sampling. All samples from our study population were thawed only once to avoid cytokine alteration.

Biomarkers measurements

IL-6 concentrations were measured by the Human IL-6 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis MN, USA). The limit of detection was 0.7 pg/mL. C-reactive protein (CRP) was determined using immunoturbidimetric methods. Fibrinogen levels was measured in plasma using the Clauss method. Leucocytes and neutrophils count were assessed using fluorescence-activated cell sorting (XN-9000 SYSMEX) at the Hospices Civils de Lyon laboratory.

Cardiac magnetic resonance protocol

All patients were scanned on a 1.5T CMR MAGNETOM Avantofit system (Siemens, Erlangen, Germany). An intravenous bolus of gadolinium (0.2 mmol/kg body weight; Dotarem, Guerbet, France) was injected by a power injector (Medrad Spectris, Vol-kach, Germany) flushed by 15 ml of saline serum. Late gadolinium enhancement (LGE) was evaluated 10 minutes after contrast injection using a 3D-gradient spoiled TurboFLASH sequence with a selective 180° inversion recovery pre-pulse, in the short axis covering the whole ventricle. LV function at rest was assessed with retrospective ECG-gated steady-state free precession pulse cine sequences (cine TrueFISP) in long and short axis views in the true heart axis. Left ventricular ejection fraction (LVEF), LV end-diastolic volume (EDV), LV end-systolic volume (ESV) and myocardial mass were calculated for each patient with the post-processing software CMR42 (Circle Cardiovascular Imaging Inc., Calgary Canada).

Infarct size was assessed on the 3D data sets by manual planimetry of the LGE images using the post-processing software Osirix (OsiriX Foundation, Geneva, Switzerland). Thus, for all slices infarct absolute mass in grams was measured according to the following formula:

$Infarct\ mass\ (g) = \Sigma\ (hyper\ enhanced\ area(cm^2)) \times slice\ thickness\ (cm) \times myocardial\ specific\ density\ (1,05\ g/cm^3)$. Relative infarct size (%) was obtained by the ratio of (absolute infarct mass (g)/ LV myocardial mass (g)) $\times 100$.

Edema was quantified in T2 map images using the full-width at half maximum method. (FWHM). Edema was expressed as a percentage of the LV myocardial mass.

Persistent microvascular obstruction was detected on LGE images as hypointense regions in the core of the infarct.

Intramycardial hemorrhage was identified using T2*-weighted imaging as a hypointense region of reduced signal intensity within the infarcted area, with a T2* value of <20 ms. Delineation of IMH and MVO was performed by two experienced readers (N.M and C.D.B).

Statistical analysis

Levels of inflammatory biomarkers were identified as not normally distributed. Therefore, those variables were expressed as medians, and interquartile range (IQR) or 95% confident interval and non-parametric tests were used for comparison between groups. At each time-point, comparisons between groups were performed using a Mann-Whitney test. Categorical variables were analyzed using Fisher's exact test. Correlations were done using Pearson correlation method. We used GraphPad Prism 8.4.2. A p-value <0.05 was considered significant.

Results

Baseline characteristics

Twenty consecutive patients referred for primary percutaneous coronary intervention of first anterior or inferior STEMI were included. Patient characteristics at baseline are presented in [Table 1](#). Briefly, they were 55 \pm 15 years old with 85% males. There were 55% of anterior MI

Table 1. Baseline characteristics of the study population. Values are mentioned as mean \pm SD, median with [interquartile range], or absolute number (with percentage).

Age (yr)	55 \pm 15
Male Genders no. (%)	17 (85)
Body Mass Index (kg/m ²)	27 \pm 4
Systolic Blood Pressure (mmHg)	122 \pm 20
Diastolic Blood Pressure (mmHg)	73 \pm 20
Heart Rate (bpm)	74 \pm 15
Current Smoker no. (%)	11 (55)
Diabetes mellitus no. (%)	3 (15)
Dyslipidemia no. (%)	4 (20)
Hypertension no. (%)	4 (20)
Ischemia time (min)	163 [129–402]
Killip class at admission no. (%)	
Killip = 1	18 (90)
Killip \geq 2	2 (10)
Infarct-related artery no. (%)	
Left anterior descending coronary artery no. (%)	11 (55)
Right coronary artery no. (%)	9 (45)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245684.t001>

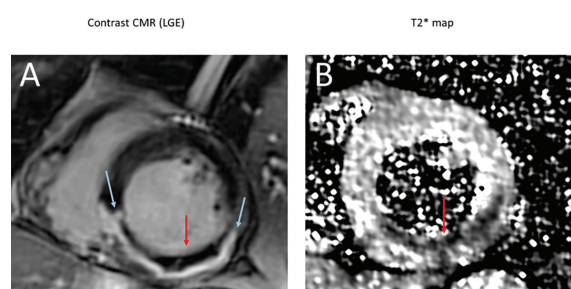


Fig 1. Cardiac magnetic resonance in a patient with an inferior ST-elevation myocardial infarction, treated by primary percutaneous coronary intervention. A. Late gadolinium enhancement (LGE) imaging shows the area of microvascular obstruction (red arrow) in the core of inferior transmural infarction (blue arrow). Contrast fails to penetrate the areas of microvascular obstruction and appears as pseudonormal myocardium. B. T2* mapping shows an area of intra-myocardial hemorrhage (red arrow).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245684.g001>

and 45% of inferior MI. CMR imaging was performed for all the patients at a median of 8 days (interquartile range IQR [6–8] days) following PCI. A representative case of a patient with images of myocardial infarction, MVO and IMH is reported in Fig 1. Median infarct size was 24.6% of LV mass IQR [12.0–43.5], and edema was 13.2% of LV mass IQR [7.7–36.1]. Intra-myocardial hemorrhage, as defined by T2* imaging was present in 7 patients (35% of the study population). Microvascular obstruction with late gadolinium enhancement CMR was present in 11 patients (55%). CMR infarct parameters are presented in Table 2.

All patients underwent blood sampling at seven-time points (n = 136, n missing = 4): before PCI, 4 hours (H4), 12 hours, 1 day, 2 days, 1 week and 1 month following successful revascularization.

Global kinetics of the four biomarkers is presented on Fig 2. In our cohort we observed that IL-6 reached a peak at 5.6 pg/mL IQR [2.5–17.5] twenty-four hours after admission (p = 0.002 compared with admission, Fig 2A). C-reactive protein reached a peak forty-eight hours after admission at 11.7 mg/L IQR [7.1–69.2] (p < 0.0001 compared with admission level, Fig 2B). Fibrinogen reached a delayed peak seven days after admission at 4.4 g/L IQR [3.8–6.7] (p < 0.0001 compared with admission, Fig 2C). Neutrophils reached an early peak twelve hours after admission at 9.0 G/L IQR [6.5–12.7] (p < 0.0001 compared with baseline level at one month, Fig 2D). The peak of each biomarker was significantly correlated with IS assessed by CMR (r = 0.55, p = 0.01 for CRP, r = 0.64, p = 0.003 for IL-6, r = 0.78, p < 0.0001 for fibrinogen and r = 0.67, p = 0.001 for neutrophils). Furthermore, the peak of each biomarker was inversely

Table 2. Cardiac magnetic resonance parameters. Values are mentioned as median with [interquartile range], or absolute number (with percentage).

LV end-diastolic volume (mL)	177.0 [168.0–191.3]
LV end-systolic volume (mL)	90.0 [69.5–105.0]
LV mass (g)	150.0 [123.8–167.3]
LV ejection fraction (%)	53.0 [44.5–57.8]
Infarct Size (% of LV)	24.6 [12.0–43.5]
Edema (% of LV)	13.2 [7.7–36.1]
Presence of MVO no. (%)	11 (55)
Presence of IMH no. (%)	7 (35)

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245684.t002>

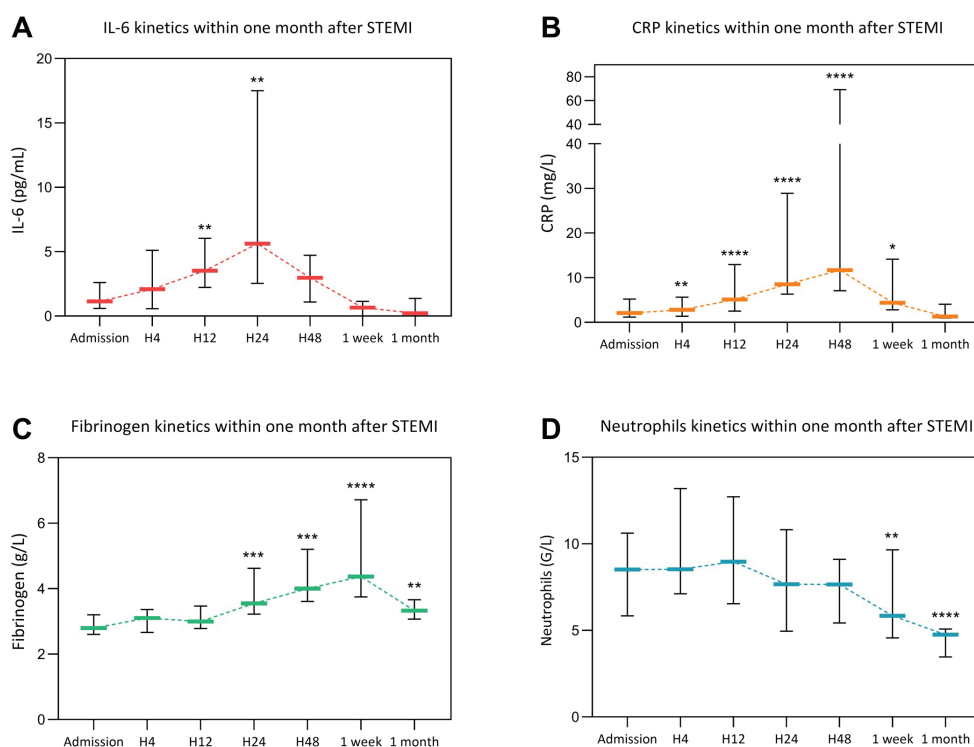


Fig 2. Interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), fibrinogen and neutrophils count kinetics according within the first month after STEMI. Data are expressed as median with interquartile range (IQR). H4: four hours after admission, H12: twelve hours after admission, H24: twenty-four hours after admission, H48: forty-eight hours after admission. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ in comparison with admission level.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245684.g002>

correlated with LVEF assessed by CMR ($r = -0.71$, $p = 0.0005$ for CRP, $r = -0.68$, $p = 0.0009$ for IL-6, $r = -0.80$, $p < 0.0001$ for fibrinogen and $r = -0.58$, $p = 0.007$ for neutrophils).

Association between IMH and inflammatory biomarkers

The association between inflammatory biomarkers kinetics and IMH are reported in Fig 3.

Patients were divided into two groups according to the presence ($n = 7/17$) or absence ($n = 10/17$) of IMH. IMH was undetermined for 3 patients. Patients with IMH had significantly higher IL-6 peak levels (at H24) compared to patients without IMH (18.2 pg/mL IQR [5.82–66.5] versus 3.8 pg/mL IQR [1.3–8.0] respectively, $p = 0.04$) (Fig 3A). Patient with IMH had higher CRP and fibrinogen levels one week after the admission for MI compared to patients without IMH (3.4 mg/L IQR [2.5–5.1] versus 29.8 mg/L IQR [5.7–75.8] for CRP, $p = 0.01$ and 4.0 g/L IQR [3.3–4.5] versus 7.1 g/L [4.6–9.3] for fibrinogen, $p = 0.002$) (Fig 3B and 3C). Patients with IMH had significantly higher neutrophils count levels from H4 to 1 week following MI with a peak at H4 (13.8 G/L IQR [10.9–15.6] versus 7.5 [5.9–8.6], $p = 0.0006$) (Fig 3D).

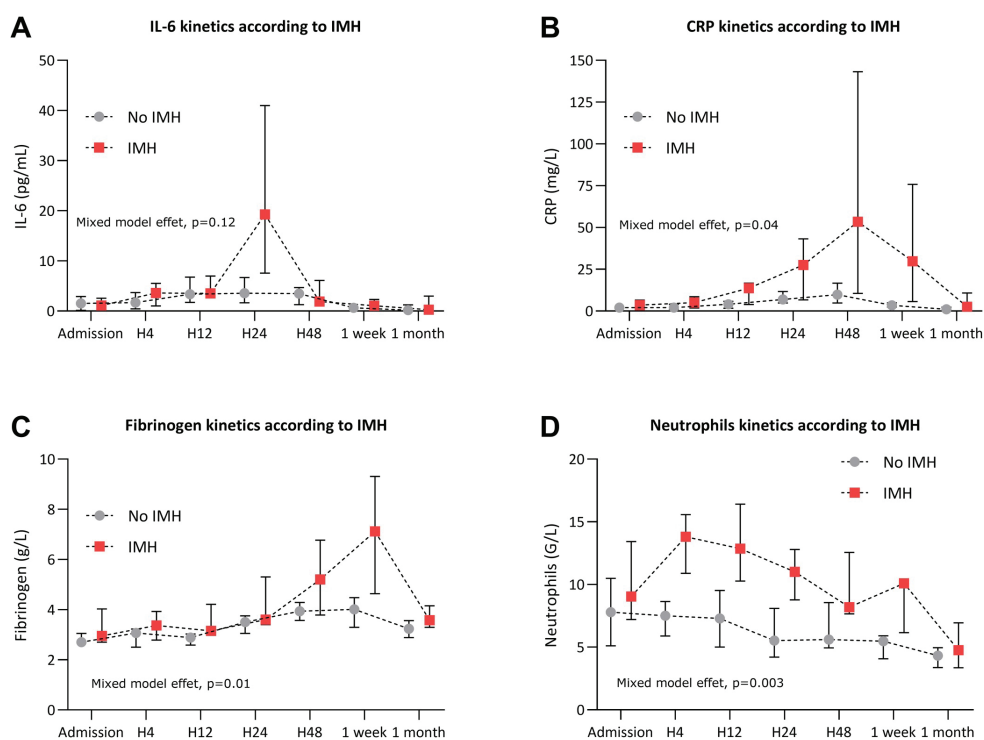


Fig 3. Association between intra-myocardial-hemorrhage (IMH) and inflammatory biomarkers kinetics levels. IL-6 (A), CRP (B), fibrinogen (C) and neutrophils count (D) kinetics according to the presence of IMH or no IMH on cardiac magnetic imaging 1 week after STEMI. Data are expressed as median with interquartile range (IQR). IL-6: Interleukin-6, CRP: C-reactive protein. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245684.g003>

Association between persistent MVO and inflammatory biomarkers

The association between inflammatory biomarkers and MVO is reported in Fig 4.

Patients were divided into two groups according to the presence ($n = 11/20$) or absence ($n = 9/20$) of MVO. Patients with MVO had similar IL-6 kinetics compared to patients without IMH (Fig 4A). However, patients with MVO had higher CRP level at H24 and H48 compared to patients without IMH (respectively 24.3 mg/L IQR [8.6–49.2] versus 6.6 mg/L IQR [4.8–6.9] at H24, $p = 0.005$ and 34.5 mg/L [11.8–120.7] versus 8.2 mg/L IQR [5.5–11.6] at H48, $p = 0.006$ (Fig 4B)). Patients with MVO had higher fibrinogen levels 1 week after MI compared to patients without MVO (5.8 mg/L IQR [4.2–7.4] versus 4.3 mg/L IQR [3.5–4.4], $p = 0.045$) (Fig 4C). They also showed higher neutrophils level count from H4 to H24 following MI with a peak at H4 (11.8 G/L IQR [8.6–14.5] versus 7.3 G/L IQR [5.9–8.5], $p = 0.006$) (Fig 4D).

Discussion

In a prospective study performed in human patients with reperused STEMI with inflammation biomarker kinetics over 30 days, our study had three main findings: 1) intramyocardial

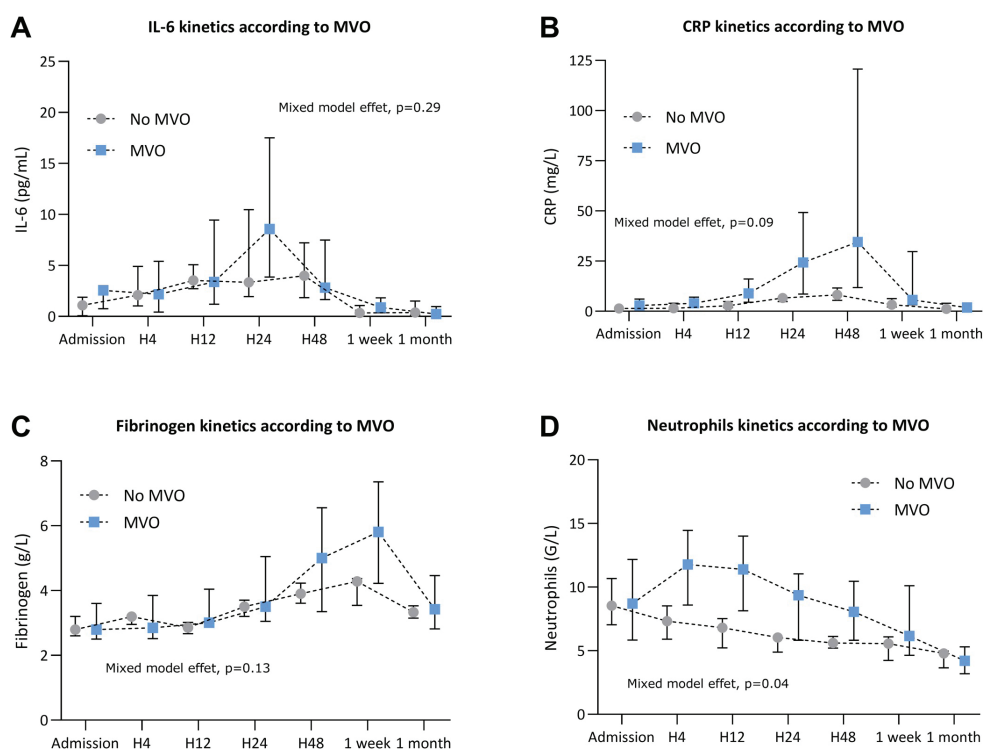


Fig 4. Association between microvascular obstruction (MVO) and inflammatory biomarkers kinetics levels. IL-6 (A), CRP (B), fibrinogen (C) and neutrophils count (D) kinetics according to the presence of MVO or no MVO on cardiac magnetic imaging 1 week after STEMI. Data are expressed as median with interquartile range (IQR). IL-6: Interleukin-6, CRP: C-reactive protein. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245684.g004>

hemorrhage is significantly related to systemic inflammation with a strong association with pro-inflammatory biomarkers (IL-6, fibrinogen, neutrophils count, CRP); 2) persistent microvascular obstruction was also associated with greater levels of inflammatory biomarkers but this association seemed to be weaker.

Inflammatory biomarkers at the acute phase of MI

Our study assessed kinetics levels of inflammatory biomarkers within 1 month and to date, it is the most detailed kinetics after STEMI. Liebetrau *et al.* showed an accurate kinetics of inflammatory biomarkers but this kinetics was limited to the first 24 hours and it was evaluated in patient undergoing transcatheter ablation of septal hypertrophy whose pathophysiology differs from STEMI [19]. We observed that all four studied biomarkers had a different peak time point: H4 for neutrophils, H24 for IL-6, H48 for CRP and 1 week for fibrinogen. These results highlight the fact that the knowledge of the precise peak time point is important when studying biomarkers in order not to lose information.

Association between MVO/IMH and systemic inflammation

This is the first study to systematically study the relationship between different CMR markers (hemorrhage, persistent microvascular obstruction, and edema) with inflammation biomarkers at the acute phase of reperfused ST-elevation myocardial infarction (STEMI). The results of our study show that IMH is significantly associated with a pro-inflammatory pattern.

In patients with STEMI, MVO represents a failure to restore optimal myocardial reperfusion despite re-permeabilization of the epicardial artery by PCI [20]. It is secondary to severe impairment of myocardial microcirculation involving several mechanisms; distal embolization of thrombotic debris, leukocyte infiltration, vasoconstriction, activation of inflammatory pathways and cellular edema [20]. IMH is secondary to the destruction of micro vascularization secondary to hypoxia, inducing extravasation and aggregation of erythrocytes into the tissue extra-vascular space [16,21]. Also, reperfusion is thought to increase leakage from the endothelial junction and damage, thus causing extravasation of red blood cells in the tissue extra-vascular space. MVO is an independent predictive factor of LV adverse remodeling and the occurrence of major cardiovascular adverse events in several clinical and preclinical studies [16,22]. Recent studies have shown that MVO could occur alone but was also frequently associated with IMH [16,21]. The association of these two phenomena in patients appears to carry the worst clinical prognosis with an increased risk of adverse ventricular remodeling, and major cardiac events such as re-hospitalization, heart failure, and death [16,23]. The pathological relationship between these two phenomena is poorly understood. A hypothesis recently suggested by Kali *et al.* [17] in a pre-clinical study is that the degradation products of hemoglobin are transformed into iron ferric crystals in the infarcted myocardium. These iron crystals cause a deleterious prolonged pro-inflammatory burden. Indeed, persistent and excessive inflammation, independent of the size of the infarction, has been suggested to contribute to adverse LV remodeling and an increased risk of future cardiovascular events after MI [5].

Following myocardial infarction, the increased IL-6 synthesis and signaling by myocytes lead to the preservation of heart tissue, in which damage is limited by reducing cell contractility and inducing an anti-apoptotic program [24–26]. However, pre-clinical and clinical studies have shown that excessive IL-6 production is deleterious. Indeed, by inducing an anti-apoptotic program and reducing long-term contractility, the excessive IL-6 secretion may finally lead to adverse LV remodeling and heart failure [27,28]. Also, IL-6 is a major mediator of CRP liver synthesis [29]. Post-STEMI, CRP elevation has been associated with the acute and chronic phase with an increased risk of mortality and cardiovascular events [29,30]. In our study, we found higher CRP levels in patients with IMH. Furthermore, we found a significant association between the presence of IMH and the neutrophil peak level. Neutrophils are involved early in the healing process following reperfusion [31]. However, their excessive recruitment and increased release of ROS (Reactive Oxygen Species) and proteases can be deleterious [31]. The neutrophil rate in post-STEMI is known to be associated with infarct size, adverse LV remodeling, and mortality [32,33]. Finally, we found a significant association between the fibrinogen peak levels, a pro-inflammatory marker associated with infarct size [34,35] and the presence of IMH.

Concerning the presence of MVO, we found a significant association with the CRP peak level. This result is in agreement with the results of Ørn *et al.* [36] showing a significant association between the CRP level at 48 hours and the presence of MVO. Carrick *et al.* [16] recently showed that MVO is a necessary condition for the occurrence of IMH but that MVO can occur alone. Our results suggest that the presence of MVO alone (without IMH) is associated with a less pro-inflammatory response than MVO associated with IMH. However, this

hypothesis must be confirmed by larger studies comparing systemic inflammation between MVO without IMH and MVO with IMH infarctions.

Taken together, our results show that IMH detected by CMR is associated with a systemic pro-inflammatory reaction potentially involved in the poor prognosis associated with this marker. The link between MVO and systemic inflammatory response appears to be weaker.

Clinical perspective

The clinical perspectives of our study are important. Indeed, the detection of myocardial hemorrhage by CMR may allow targeting patients with the highest inflammatory burden. These patients would be the most likely to benefit from the anti-inflammatory therapies under investigation.

Limitation

A significant limitation of our study is related to the small sample size of our population. However, our population was homogeneous with infarct sizes, and a frequency of occurrence of MVO and IMH comparable with recent studies [16]. This limited sample size affects the statistical power to demonstrate significant associations between MVO or IMH and biomarkers.

Despite the high number of blood samples taken, considering the short half-life of different markers measured, it is possible we missed the peak values of its marker. Another important limitation is that the biomarkers used to evaluate inflammation are not specific (e.g., CRP, fibrinogen). They reflect the subsequent consequences of the inflammatory activity but do not provide information on local tissue inflammation. Furthermore, if we have identified a relationship between IMH and systemic inflammation, the absence of anatomopathological comparison makes it difficult to describe a causal relationship.

Finally, although the detection of myocardial hemorrhage by T2* sequences is currently the gold standard [16], T2* acquisition was associated with imaging artifacts that limited the quantification of hemorrhage in some patients, and only 85% of the cohort had analyzable T2* data. However, these results are consistent with recent studies evaluating IMH by T2* sequences [16].

Conclusion

In human patients with acute myocardial infarction, myocardial hemorrhage appears to have the strongest relationship with inflammatory biomarker release compared to persistent MVO or myocardial edema. Attenuating myocardial hemorrhage-induced inflammation may be a novel target in future adjunctive STEMI treatments.

Supporting information

S1 Fig. Association between intra-myocardial-hemorrhage (IMH) and other inflammatory biomarkers kinetics levels. ST2 (A), IL-18 (B), IL-10 (C), TGF- β (D), IL-8 (E), MCP1 (F) kinetics according to the presence of IMH or no IMH on cardiac magnetic imaging 1 week after STEMI. Data are expressed as median with interquartile range (IQR). ST2: Interleukin 1 receptor-like 1, IL-18: Interleukin-18, IL-10: Interleukin-10, TGF- β : Transforming Growth Factor- β , IL-8: Interleukin-8, MCP1: Monocyte Chemoattractant Protein 1. Differences between curves were assessed using a mixed-effect model.
(TIF)

S2 Fig. Association between microvascular obstruction (MVO) and other inflammatory biomarkers kinetics levels. ST2 (A), IL-18 (B), IL-10 (C), TGF- β (D), IL-8 (E), MCP1 (F)

kinetics according to the presence of MVO or no MVO on cardiac magnetic imaging 1 week after STEMI. Data are expressed as median with interquartile range (IQR). ST2: Interleukin 1 receptor-like 1, IL-18: Interleukin-18, IL-10: Interleukin-10, TGF- β : Transforming Growth Factor- β , IL-8: Interleukin-8, MCP1: Monocyte Chemoattractant Protein 1. Differences between curves were assessed using a mixed-effect model.
(TIF)

S3 Fig. ST2 (A), IL-18 (B), IL-10 (C), TGF- β (D), IL-8 (E), MCP1 (F) kinetics within the first month after STEMI. Data are expressed as median with interquartile range (IQR). H4: four hours after admission, H12: twelve hours after admission, H24: twenty-four hours after admission, H48: forty-eight hours after admission.
(TIF)

Author Contributions

Conceptualization: Thomas Bochaton, Régine Cartier, Michel Ovize, Nathan Mewton.

Data curation: Alexandre Paccalet, Nathan Mewton.

Formal analysis: Nathan Mewton.

Funding acquisition: Michel Ovize, Nathan Mewton.

Investigation: Thomas Bochaton, Jules Lassus, Alexandre Paccalet, Michel Ovize, Nathan Mewton.

Methodology: Thomas Bochaton, Camille Amaz, Sylvie Espanet, Charles de Bourguignon, Régine Cartier, Michel Ovize, Nathan Mewton.

Project administration: Claire Crola Da Silva, Charles de Bourguignon, Michel Ovize.

Resources: Thomas Bochaton, Jules Lassus, François Derimay, Gilles Rioufol, Cyril Prieur, Eric Bonnefoy-Cudraz, Charles de Bourguignon, Nathalie Dufay, Régine Cartier, Michel Ovize, Nathan Mewton.

Software: Thomas Bochaton, Charles de Bourguignon.

Supervision: Thomas Bochaton, Cyril Prieur, Eric Bonnefoy-Cudraz, Michel Ovize, Nathan Mewton.

Validation: Thomas Bochaton, Alexandre Paccalet, François Derimay, Gilles Rioufol, Cyril Prieur, Eric Bonnefoy-Cudraz, Hugo Bernelin, Camille Amaz, Pierre Croisille, Michel Ovize, Nathan Mewton.

Visualization: François Derimay, Gilles Rioufol, Cyril Prieur, Claire Crola Da Silva, Hugo Bernelin, Pierre Croisille, Michel Ovize, Nathan Mewton.

Writing – original draft: Thomas Bochaton, Jules Lassus, Nathan Mewton.

References

1. Mendis S, Puska P, Norrving B, World Health Organization., World Heart Federation., World Stroke Organization. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization; 2011.
2. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J.* 2016; 37: 3232–3245. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw334> PMID: 27523477
3. Gale CP, Allan V, Cattle BA, Hall AS, West RM, Timmis A, et al. Trends in hospital treatments, including revascularisation, following acute myocardial infarction, 2003–2010: a multilevel and relative survival

- analysis for the National Institute for Cardiovascular Outcomes Research (NICOR). *Heart*. 2014; 100: 582–589. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-304517> PMID: 24436220
4. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1121–1135. <https://doi.org/10.1056/NEJMra071667> PMID: 17855673
 5. Westman PC, Lipinski MJ, Luger D, Waksman R, Bonow RO, Wu E, et al. THE PRESENT AND FUTURE Inflammation as a Driver of Adverse Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *JAC*. 2016; 67. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.01.073> PMID: 27126533
 6. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2002; 53: 31–47. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744011> [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00434-5](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00434-5) PMID: 11744011
 7. de Beer FC, Hind CRK, Fox KM, Allan RM, Maseri A, Pepys MB. Measurement of serum C-reactive protein concentration in myocardial ischaemia and infarction. *Br Heart J*. 1982; 47: 239–243. <https://doi.org/10.1136/hrt.47.3.239> PMID: 7059401
 8. Pietilä K, Harmoinen A, Hermens W, Simoons ML, Van De Werf F, Verstraete M. Serum c-reactive protein and infarct size in myocardial infarct patients with a closed versus an open infarct-related coronary artery after thrombolytic therapy. *Eur Heart J*. Oxford University Press; 1993; 14: 915–919. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/14.7.915> PMID: 8375415
 9. Tommasi S, Carluccio E, Bentivoglio M, Buccolieri M, Mariotti M, Politano M, et al. C-reactive protein as a marker for cardiac ischemic events in the year after a first, uncomplicated myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1999; 83: 1595–9. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(99\)00162-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(99)00162-9) PMID: 10392860
 10. Ziakas A, Gavrilidis S, Giannoglou G, Souliou E, Gemtziis K, Kalampalika D, et al. In-hospital and long-term prognostic value of fibrinogen, CRP, and IL-6 levels in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis. *Angiology*. 2006; 57: 283–293. <https://doi.org/10.1177/000331970605700304> PMID: 16703188
 11. Toss H, Lindahl B, Siegbahn a, Wallentin L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease*. *Circulation*. 1997; 96: 4204–10. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9416883> <https://doi.org/10.1161/01.cir.96.12.4204> PMID: 9416883
 12. Hashmi JA, Afroze N, Syed SA. Fibrinogen levels in patients suffering from acute myocardial infarction. *J Atheroscler Res*. 1969; 10: 277–281. [https://doi.org/10.1016/s0368-1319\(69\)80016-5](https://doi.org/10.1016/s0368-1319(69)80016-5) PMID: 5381849
 13. Park JJ, Jang HJ, Oh IY, Yoon CH, Suh JW, Cho YS, et al. Prognostic value of neutrophil to lymphocyte ratio in patients presenting with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2013; 111: 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2012.11.012> PMID: 23273716
 14. Christia P, Frangogiannis NG. Targeting inflammatory pathways in myocardial infarction. *Eur J Clin Invest*. 2013; 43: 986–995. <https://doi.org/10.1111/eci.12118> PMID: 23772948
 15. Ruparelina N, Chai JT, Fisher EA, Choudhury RP. Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies. *Nat Rev Cardiol*. NIH Public Access; 2017; 14: 133–144. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.185> PMID: 27905474
 16. Carrick D, Haig C, Ahmed N, McEntegart M, Petrie MC, Eteiba H, et al. Myocardial Hemorrhage After Acute Reperfused ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction: Relation to Microvascular Obstruction and Prognostic Significance. *Circ Cardiovasc Imaging*. American Heart Association, Inc.; 2016; 9: e004148. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.115.004148> PMID: 26763281
 17. Kali A, Cokic I, Tang R, Dohnalkova A, Kovarik L, Yang H-J, et al. Persistent Microvascular Obstruction After Myocardial Infarction Culminates in the Confluence of Ferric Iron Oxide Crystals, Proinflammatory Burden, and Adverse Remodeling. *Circ Cardiovasc Imaging*. NIH Public Access; 2016; 9. <https://doi.org/10.1161/CIRCIMAGING.115.004996> PMID: 27903536
 18. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J*. Oxford University Press; 2018; 39: 119–177. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx393> PMID: 28886621
 19. Liebetrau C, Nef HM, Dörr O, Gaede L, Hoffmann J, Hahnel A, et al. Release kinetics of early ischaemic biomarkers in a clinical model of acute myocardial infarction. *Heart*. 2014; 100: 652–657. <https://doi.org/10.1136/heartjnl-2013-305253> PMID: 24488609
 20. Bouleti C, Mewton N, Germain S. The no-reflow phenomenon: State of the art. *Arch Cardiovasc Dis*. Elsevier Masson; 2015; 108: 661–674. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2015.09.006> PMID: 26616729
 21. Robbers LFHJ, Eerenberg ES, Teunissen PFA, Jansen MF, Hollander MR, Horrevoets AJG, et al. Magnetic resonance imaging-defined areas of microvascular obstruction after acute myocardial infarction

- represent microvascular destruction and haemorrhage. *Eur Heart J. Oxford University Press*; 2013; 34: 2346–2353. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehf100> PMID: 23594591
22. Hamirani YS, Wong A, Kramer CM, Salerno M. Effect of microvascular obstruction and intramyocardial hemorrhage by CMR on LV remodeling and outcomes after myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis. *JACC Cardiovasc Imaging. NIH Public Access*; 2014; 7: 940–52. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2014.06.012> PMID: 25212800
 23. Husser O, Monmeneu J V, Sanchis J, Nunez J, Lopez-Lereu MP, Bonanad C, et al. Cardiovascular magnetic resonance-derived intramyocardial hemorrhage after STEMI: Influence on long-term prognosis, adverse left ventricular remodeling and relationship with microvascular obstruction. *Int J Cardiol. Elsevier*; 2013; 167: 2047–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.05.055> PMID: 22682700
 24. Gwechenberger M, Mendoza LH, Youker K a., Frangogiannis NG, Smith CW, Michael LH, et al. Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation. 1999*; 99: 546–51. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.4.546> PMID: 9927402
 25. SMART N, MOJET M, LATCHMAN D, MARBER M, DUCHEN M, HEADS R. IL-6 induces PI 3-kinase and nitric oxide-dependent protection and preserves mitochondrial function in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res. 2006*; 69: 164–177. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.08.017> PMID: 16219301
 26. Dawn B, Xuan Y-T, Guo Y, Rezaazadeh A, Stein AB, Hunt G, et al. IL-6 plays an obligatory role in late preconditioning via JAK-STAT signaling and upregulation of iNOS and COX-2. *Cardiovasc Res. NIH Public Access*; 2004; 64: 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2004.05.011> PMID: 15364614
 27. Gabriel AS, Martinsson A, Wretling B, Ahnve S. IL-6 levels in acute and post myocardial infarction: their relation to CRP levels, infarction size, left ventricular systolic function, and heart failure. *Eur J Intern Med. 2004*; 15: 523–528. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2004.07.013> PMID: 15668089
 28. Ohtsuka T, Hamada M, Inoue K, Ohshima K, Sujzaki J, Matsunaka T, et al. Relation of circulating interleukin-6 to left ventricular remodeling in patients with reperfused anterior myocardial infarction. *Clin Cardiol. 2004*; 27: 417–20. <https://doi.org/10.1002/clc.4960270712> PMID: 15298045
 29. Ridker PM. From C-Reactive Protein to Interleukin-6 to Interleukin-1: Moving Upstream to Identify Novel Targets for Atheroprotection. *Circ Res. 2016*; 118: 145–156. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306656> PMID: 26837745
 30. Fordjour PA, Wang Y, Shi Y, Agyemang K, Akinyi M, Zhang Q, et al. Possible mechanisms of C-reactive protein mediated acute myocardial infarction. *Eur J Pharmacol. 2015*; 760: 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.04.010> PMID: 25895642
 31. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res. Oxford University Press*; 2004; 61: 481–497. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2003.10.011> PMID: 14962479
 32. Chia S, Nagurney JT, Brown DFM, Raffel OC, Bamberg F, Senatore F, et al. Association of Leukocyte and Neutrophil Counts With Infarct Size, Left Ventricular Function and Outcomes After Percutaneous Coronary Intervention for ST-Elevation Myocardial Infarction. *Am J Cardiol. 2009*; 103: 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2008.09.085> PMID: 19166685
 33. Meissner J, Irfan A, Twerenbold R, Mueller S, Reiter M, Haaf P, et al. Use of neutrophil count in early diagnosis and risk stratification of AMI. *Am J Med. 2011*; 124: 534–542. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.10.023> PMID: 21507368
 34. Davalos D, Akassoglou K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin Immunopathol. Springer-Verlag*; 2012; 34: 43–62. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0290-8> PMID: 22037947
 35. De Sutter J, De Buyzere M, Gheeraert P, Van de Wiele C, Voet J, De Pauw M, et al. Fibrinogen and C-reactive protein on admission as markers of final infarct size after primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Atherosclerosis. Elsevier*; 2001; 157: 189–96. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(00\)00703-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(00)00703-6) PMID: 11427220
 36. Ørn S, Manhenke C, Ueland T, Damàs JK, Mollnes TE, Edvardsen T, et al. C-reactive protein, infarct size, microvascular obstruction, and left-ventricular remodelling following acute myocardial infarction. *Eur Heart J. 2009*; 30: 1180–6. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehp070> PMID: 19299430

1.5. Kinetics and prognostic value of soluble VCAM-1 in ST-segment elevation myocardial infarction patients

a) Introduction

Cette étude repose également sur l'analyse des taux circulants dans la cohorte de patients HISCUS STEMI. VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1), est une protéine d'adhésion qui intervient dans l'adhésion des cellules de l'immunité innée sur l'endothélium mais également dans la transduction du signal des leucocytes. Son rôle dans le recrutement des leucocytes a été grandement étudié dans le développement de l'athérosclérose²⁹⁴. La forme membranaire de VCAM-1 peut-être clivée et ainsi le domaine extracellulaire va se retrouver dans la circulation sanguine sous forme soluble. Ce phénomène médié par plusieurs facteurs tels que la thrombine ou encore la protéine TIMP3²⁹⁵.

La forme soluble de VCAM-1 est un bon prédicteur de la survenue de complication cardiovasculaire²⁹⁶ mais sa valeur pronostic après un infarctus du myocarde reste débattue. L'objectif de cette étude était donc de déterminer la cinétique de libération de la forme soluble de VCAM-1 dans la circulation à la suite d'un STEMI, et d'évaluer si cette libération était associée à la survenue d'évènements cardiovasculaires majeurs. Le taux circulant de sVCAM-1 augmente de manière significative jusque un mois post infarctus. Une dichotomie des patients sur la base de l'aire sous la courbe de leurs taux circulant de sVCAM-1 jusque H48 permet de démontrer que les patients avec une aire sous la courbe supérieure à la médiane de la population sont plus à risque de souffrir d'un événement cardiaque majeur que les patients avec une aire sous la courbe inférieure à la médiane de la population. Ces résultats démontrent que sVcam-1 peut être une cible intéressante pour le développement de stratégies thérapeutiques dans l'infarctus du myocarde.

Dans cette étude, j'ai réalisé les dosages des taux circulants de sVCAM-1 et participé au choix de la cible.



Received: 14 December 2020 | Revised: 18 January 2021 | Accepted: 21 January 2021
 DOI: 10.1002/iid3.409

ORIGINAL RESEARCH

Immunity, Inflammation and Disease

Open Access

WILEY

Kinetics and prognostic value of soluble VCAM-1 in ST-segment elevation myocardial infarction patients

Ahmad Hayek MD¹ | Alexandre Paccalet² | Laura Mechtouff MD³ |
 Claire C. Da Silva PhD¹ | Fabrice Ivanès MD, PhD^{4,5} | Hadrien Falque MD⁶ |
 Simon Leboube¹ | Yvonne Varillon⁷ | Camille Amaz⁷ |
 Charles de Bourguignon⁷ | Cyril Prieur MD¹ | Danka Tomasevic MD¹ |
 Nathalie Genot MD¹ | François Derimay MD, PhD⁶ |
 Eric Bonnefoy-Cudraz MD, PhD¹ | Gabriel Bidaux PhD² |
 Nathan Mewton MD, PhD⁷ | Michel Ovize MD, PhD^{2,7,8} |
 Thomas Bochaton MD, PhD^{1,2}

¹Intensive Cardiological Care Division, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

²INSERM U1060, CarMeN Laboratory, University of Lyon, Groupement Hospitalier Est, Bron, France

³Department of Neurology and Stroke Center, Hospices Civils de Lyon, Lyon University, Lyon, France

⁴Faculty of Medicine, Loire Valley Cardiovascular Collaboration, University of Tours, Tours, France

⁵Department of Cardiology and FACT, CHRU de Tours, Tours, France

⁶Department of Cardiology, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

⁷Clinical Investigation Center and Heart Failure Department, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

⁸Department of Cardiovascular Functional Exploration, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

Abstract

Background: Soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) is a biomarker of endothelial activation and inflammation. There is still controversy as to whether it can predict clinical outcome after ST-elevation myocardial infarction (STEMI). Our aim was to assess the sVCAM-1 kinetics and to evaluate its prognostic predictive value.

Method: We prospectively enrolled 251 consecutive STEMI patients who underwent coronary revascularization in our university hospital. Blood samples were collected at admission, 4, 24, 48 h and 1 month after admission. sVCAM-1 serum level was assessed using ELISA assay. All patients had cardiac magnetic resonance imaging at 1-month for infarct size (IS) and left ventricular ejection fraction (LVEF) assessment. Clinical outcomes were recorded over 12 months after STEMI.

Results: sVCAM-1 levels significantly increased from admission up to 1 month and were significantly correlated with IS, LVEF, and LV end-systolic and diastolic volume. (H48 area under curve (AUC) \geq H48 median) were associated with an increased risk of adverse clinical events during the 12-month follow-up period with a hazard ratio (HR) = 2.6 (95% confidence interval [CI] of ratio = 1.2–5.6, $p = .02$). The ability of H48 AUC for sVCAM-1 to

Abbreviations: ACS, acute coronary syndrome; CAM, cell adhesion molecule; CK, creatine Kinase; CMR, cardiac magnetic resonance; CRP, C reactive protein; IL, interleukin; IS, infarct size; LVEF, left ventricle ejection fraction; MI, myocardial infarction; STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule 1.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2021 The Authors. *Immunity, Inflammation and Disease* published by John Wiley & Sons Ltd.

Correspondence

Thomas Bochaton, MD, PhD, Intensive Cardiological Care Division, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, 59 Blvd Pinel, F-69500 Bron, France.
Email: thomas.bochaton@chu-lyon.fr

Funding information

Université de Lyon,
Grant/Award Number:
ANR-16-RHUS-0009

discriminate between patients with or without the composite endpoint was evaluated using receiver operating characteristics with an AUC at 0.67 (0.57–0.78, $p = .004$). This ability was significantly superior to H48 AUC creatine kinase ($p = .03$).

Conclusions: In STEMI patients, high sVCAM-1 levels are associated with a poor clinical outcome. sVCAM-1 is an early postmyocardial infarction biomarker and might be an interesting target for the development of future therapeutic strategies.

KEYWORDS

acute coronary syndrome, cell adhesion molecules, inflammation, STEMI, VCAM-1

1 | INTRODUCTION

In recent decades, new concepts of the pathogenesis of acute myocardial infarction (MI) have emerged.¹ It is now well recognized that in the aftermath of a MI, an inflammatory response occurs and that its importance is associated with larger infarct size (IS) and increased mortality. The long-term consequence is the onset of myocardial fibrosis and cardiac remodeling, which compromise survival and increase clinical heart failure. Leukocyte adhesion and endothelial transmigration are considered to be the main component of inflammation post-acute coronary syndrome (ACS).^{2,3} This mechanistic phenomenon is possible through cell adhesion molecules (CAM),⁴ leading to endothelial activation. In 1996, Shyu et al. reported increased levels of soluble CAM (sCAM), which are released from leukocyte and endothelial surface probably by enzymatic cleavage, in ACS patients.^{5–7}

Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) is one of the most important CAM. VCAM-1 plays an important role in the recruitment of inflammatory cells and thus the development of atherosclerotic plaques.⁸ Its levels have been shown to increase following ACS, and it is upregulated by tumor necrosis factor- α and interleukin (IL)-1 β or other mediators including reactive oxygen species (ROS).^{9–12} VCAM-1 is a cell surface glycoprotein present in the endothelium but there is also a soluble form of VCAM-1 (sVCAM-1), resulting from the release of VCAM-1 ectodomain, which is regulated by thrombin and metalloproteinase inhibitor 3 (TIMP-3).^{10,13} Several studies found sVCAM-1 to be a predictor of cardiovascular events.^{14,15} Yet, the prognostic value of sVCAM-1 levels after ACS has come under scrutiny and there is controversy as to whether it can predict clinical outcome.^{16–19} Lino et al. found that elevated VCAM-1 levels were predictive of heart failure after ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) while Tekin et al. showed that blood levels of sVCAM-1 at presentation, in non-STEMI patients, were not predictive of any

adverse cardiac event.^{20,21} Therefore, the objectives of our study were to describe sVCAM-1 kinetics in patients within the first month of STEMI and to assess its prognostic value.

2 | METHODS

2.1 | Study design and blood sample collection

The HIBISCUS cohort is composed of consecutive patients admitted to our institution (a tertiary referral university hospital) with an acute STEMI from 2016 to 2019. Our institution Review Board and Ethics Committee approved the study. All patients gave written informed consent and the study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. STEMI was defined according to the European Society of Cardiology guidelines by the presence of clinical symptoms (chest pain) associated with an ST-segment elevation of more than 2 mm in two contiguous leads on a standard 12-lead electrocardiogram, and significant troponin-I elevation.²² Urgent reperfusion was achieved in all patients by primary percutaneous intervention (PCI) at admission. All patients underwent contrast-enhanced cardiac magnetic resonance (CMR) at 1 month after STEMI.

All individual clinical treatment and outcome data were collected prospectively in the database of the Centre for Clinical Investigation (CIC) of Hospices Civils de Lyon. Adverse clinical events were registered during follow-up visits scheduled at 1 month, 1 year, and 2 years after the index hospitalization. A primary endpoint was defined as the composite of all-cause death, acute MI, stroke, and rehospitalization for heart failure.

Sera from HIBISCUS patients cohort were collected at five time-points: admission, 4 h (H4), 24 h (H24), 48 h (H48), and 1 month (M1) after reperfusion. Samples were

frozen at -80°C and stored at the local hospital biobank (NeuroBioTec Biological Resource Center, Hospices Civils de Lyon). All sera from our study population were thawed only once to avoid biomarker alteration.

2.2 | Biomarker measurement

We assessed soluble VCAM-1 concentration using an ELISA kit (R&D systems ELISA kit). The minimum detectable dose in our conditions was 30.0 pg/ml. IL-6 assessed using ELISA Ready-SET-Go (eBioscience) with a sensitivity of 2 pg/ml. Routine biomarkers were assessed in the central laboratory of the Hospices Civils de Lyon. C-reactive protein was assessed using immunoturbidimetry (architect Abbott) (Hospices Civils de Lyon laboratory). Troponin I (Immunoassay Access1 AccuTnI Troponin I Assay) and total creatine kinase levels (Beckman Coulter Inc, expressed in IU/L) were measured at admission, at 4, 24, and 48 h after PCI. Leukocytes were collected at admission, 24, 48 h, and 1 month after admission and assessed using fluorescence-activated cell sorting (XN-9000 SYSMEX).

2.3 | CMR analysis

Patients underwent CMR 1 month after admission for STEMI. All patients were scanned in a supine position using a 1.5T MAGNETOM Avanto TIM system (Siemens) as previously described.²³ Cine free precession sequences in two-chamber, four-chamber, and ventricular short-axis planes were used for quantitative ventricular measurements. Myocardial delayed enhancement sequences were assessed in short and long-axis planes with a nonselective 180° inversion recovery 10–15 min after the injection of 0.2 mmol/kg gadolinium-based contrast agent. IS was measured using CMRSegTools segmentation plugin (CREATIS) with OsiriX software (Pixmeo). Late gadolinium enhancement regions were quantified with a Full Width at Half Maximum algorithm and IS was expressed as a percentage of left ventricular (LV) mass. LV ejection fraction (LVEF), LV end-diastolic volume index (LVEDVi), LV end-systolic volume index (LVESVi), and LV mass were measured offline on all short-axis views in the cine images (Philips View Forum, Philips Healthcare). LVEF, LVEDVi, and LVESVi assessment helped define ventricular remodeling.

2.4 | Statistical analysis

Data are expressed as median and 95% confidence interval (CI) or interquartile range (IQR) or mean and *SD*

according to their distribution. Comparisons between the different time points were performed using a paired *t*-test with Wilcoxon matched-paired signed-rank test for continuous variables with the nonparametric distribution. Mann-Whitney test was used for group comparisons of continuous variables. Associations between sVCAM-1 and clinical variables were assessed by correlation analyses (nonparametric Spearman). The ability of sVCAM-1 to discriminate between patients with or without a clinical event was also assessed by the area under (AUC) the receiver-operating curve (ROC). ROC curves comparison was done using DeLong et al. test. A $p < .05$ was considered significant. Multivariate analysis was performed using Cox proportional-hazard regression. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.01. DeLong et al. test and multivariate analysis were performed using MedCalc Version 12.4.0.0.

3 | RESULTS

3.1 | Baseline demographics

We included 251 patients. Characteristics of the study population are presented in Table 1. Briefly, the median age was 59 ± 12 years with 79.2% male. There were 132 anterior MI (52.8%), 166 patients (66.4%) had TIMI flow grade 0–1 before and 241 (96.4%) had TIMI flow grade greater than or equal to 2 after PCI. Two hundred and sixteen patients (86.4%) were Killip 1 at admission and median LVEF at admission was 52% (interquartile range (IQR) [46–58]).

3.2 | Soluble VCAM-1 kinetics after STEMI

The temporal profile of sVCAM-1 after STEMI is presented in Figure 1A, illustrating a significant and constant increase since admission up to 1 month. Median admission sVCAM-1 level was 328.7 ng/ml (IQR [269.3–413.3]) with a continuous increase and reached 386.1 ng/ml (IQR [309.0–471.0]) at 1 month ($p < .0001$ between admission and 1-month). sVCAM-1 kinetics were also presented according to IS, localization of MI, and HS troponin (Figure S1). Patients with an IS higher than 25% had higher levels of sVCAM-1 when comparing to patients with an IS lower than 25% ($p = .03$). Patients with an anterior MI had a slight tendency for higher levels of sVCAM-1 when compared to nonanterior MI (Figure S1).

Other main inflammatory markers were also assessed. We found a rise in IL-6 with a peak at H24 (5.5 pg/ml IQR [2.2–11.0]) and in C-reactive protein

TABLE 1 Baseline characteristics of the study population

Baseline characteristics (<i>n</i> = 251 patients)	
Age, years	59 ± 12
Male sex, no (%)	199 (79.3)
BMI, kg/m ²	26.8 ± 4.4
Hypertension, no (%)	70 (27.9)
Hypercholesterolemia, no (%)	70 (27.9)
Diabetes mellitus, no (%)	37 (14.7)
Current smoker, no (%)	126 (50.2)
Clinical characteristics	
Time from symptoms to PCI, min	200 [145–315]
Anterior MI, no (%)	132 (52.6)
Killip status = 1, no (%)	216 (86.1)
TIMI at admission = 0–1	167 (66.5)
LVEF at 1 month (%)	52 [46–58]
Biochemical analyses	
Peak troponin I, ng/L	43,904 [15,731–114,083]
Peak creatine kinase, mUI/L	1561 [686–3666]
CRP at admission, mg/L	2.6 [1.4–6.2]
Peak CRP, mg/L	17.9 [7.1–47.1]
Admission BNP, nmol/L	31 [15–80]
Admission creatinine, mmol/L	71 [61–83]
Admission hemoglobin, g/L	140 [130–150]
Leukocytes count at admission, g/L	11.8 [9.3–14.5]
Total cholesterol, g/L	1.98 [1.70–2.36]
LDL cholesterol, g/L	1.26 [1.01–1.57]
HbA1c (%)	5.7 [5.5–6.0]

Note: Data are expressed as mean ± SD or median and interquartile range. Abbreviations: BMI, body mass index; BNP, brain natriuretic peptide; CRP, C-reactive protein; HbA1c, glycated hemoglobin; LDL, low density lipoprotein; LVEF, left ventricular ejection fraction; TIMI, thrombolysis in myocardial infarction.

(CRP) at H48 (18.1 mg/L IQR [7.6–52.0]). AUC sVCAM-1 level at H48 was correlated with IL-6 peak ($r = .17$, $p = .01$) and with CRP peak ($r = .19$, $p = .003$).

3.3 | Soluble VCAM-1 levels, IS, and ventricular remodeling

We assessed the area under curve for sVCAM-1 within the first 48 h (H48 AUC for sVCAM-1). We observed a significant correlation between IS (assessed by cardiac magnetic resonance imaging) and H48 AUC for sVCAM-1 ($r = .20$, $p = .007$) (Figure S2A). We also found a significant correlation between H48 AUC for sVCAM-1 and ventricular remodeling. H48 AUC for sVCAM-1 was correlated with left ventricular end-diastolic volume (LVEDV, $r = .18$, $p = .02$) and left ventricular end-systolic volume

(LVESV, $r = .22$, $p = .003$) and was inversely correlated with LVEF ($r = -0.17$, $p = .02$) (Figure S2B–D).

3.4 | sVCAM-1 and clinical outcomes

Twenty-seven patients experienced an adverse clinical event during the 12-month follow-up period (four all-cause deaths, six MI, three strokes, and 14 hospitalizations for heart failure). As shown in Figure 1B, The AUC for sVCAM-1 release within the first 48 h was significantly increased in the group of patients with a clinical adverse event as compared with patients without clinical event, with a median of 1248 arbitrary units IQR [993–1491] versus 991 arbitrary units IQR [832–1225] ($p = .003$).

Furthermore, we divided the study population into two groups according to the H48 AUC for sVCAM-1: a group with H48 AUC for sVCAM-1 below the median value and a group with H48 AUC for sVCAM-1 equal to or above the median value. Patients with H48 AUC for sVCAM-1 equal to or above the median value were more likely to experiment an adverse clinical event within the 12 months of follow-up compared to patients with H48 AUC for sVCAM-1 below the median value with a hazard ratio (HR) = 2.6 (95% CI of ratio = 1.2–5.6, $p = .02$) (Figure 1C). The ability of H48 AUC for sVCAM-1 to discriminate between patients with or without the composite endpoint was also evaluated. The area under the curve was assessed at 0.67 (0.57–0.78) $p = .004$. This ability to discriminate between patients with or without the composite endpoint was significantly superior to that of H48 AUC creatine kinase ($p = .03$) but not to that of H48 AUC troponin (Figure 1D).

3.5 | Level of sVCAM-1 is associated with adverse clinical events upon admission

The sVCAM-1 level was significantly increased upon admission in the group presenting an adverse clinical event within the 12 first months, reaching 407.1 ng/ml IQR [330.0–453.7] compared to 326.1 ng/ml IQR [262.4–404.8] in the group without clinical event in the follow-up period ($p = .003$) (Figure 2A). Patients with an sVCAM-1 level at admission equal to or above the median value were more likely to experiment an adverse clinical event during the first 12 months of follow-up (HR = 3.3; 95% CI of ratio = 1.5–7.1, $p = .008$) (Figure 2B). In multivariable Cox regression analyses with models including age, gender, hypertension, renal dysfunction (eGFR < 60 ml/min/1.73 m²), creatine kinase peak, and TIMI flow grade before

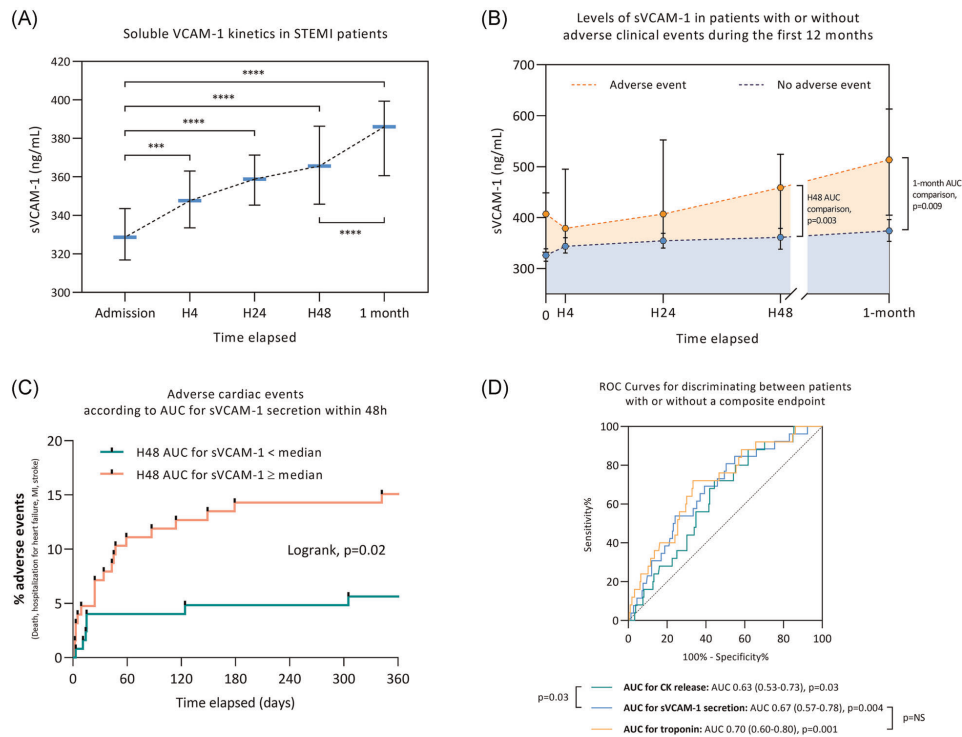


FIGURE 1 (A) sVCAM-1 kinetics in STEMI patients within the first month ($n = 251$ patients). (B) Level of sVCAM-1 in patients with or without adverse clinical events (all-cause death, MI, stroke, and hospitalization for heart failure) during the first 12 months after MI ($n = 251$ patients). (C) Adverse clinical events according to AUC for sVCAM-1 secretion within 48 h ($n = 251$ patients). (D) ROC for discriminating patients with or without a composite endpoint (adverse clinical event). *** $p < .001$, **** $p < .0001$. AUC, area under curve; CK, creatine kinase; MI, myocardial infarction; ROC, receiver operating characteristic; sVCAM-1, soluble VCAM-1; STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction

PCI, sVCAM-1 remained associated with an increased risk of experiencing the composite endpoint during the 12 months of follow-up (adjusted HR = 2.9 [1.0–8.2], $p = .046$).

4 | DISCUSSION

The main findings in the present study were that (1) there is a sustained endothelial activation evaluated by sVCAM-1 release, which lasts at least one month following MI, and (2) sVCAM-1 level upon admission is an early prognosis biomarker following STEMI, correlated with IS, cardiac remodeling, and adverse clinical events.

MI is generally the result of an atherosclerotic plaque rupture resulting in thrombus formation. CAM is involved in the thrombus formation through the coagulation pathway and platelet adhesion.² Inflammation plays

a pivotal and consequent role with cytokine, thrombin, and sCAM overproduction. Soluble CAM allows recruitment of circulating leukocyte cells to the inflammatory site and therefore maintains the inflammatory process.²⁴ VCAM-1 is a CAM mediating the adhesion mainly of leukocytes to the endothelium. Our study highlights the concept of endothelial activation post-STEMI since sVCAM-1 levels significantly increase during the first month. Our results are in accordance with previous observations that found a change in sVCAM-1 levels related to endothelial activation and release after MI reperfusion.²⁵ Mulvihill et al.²⁶ found a sustained sVCAM-1 increase up to 6 months following an ACS. Furthermore, the time course of VCAM-1 release was evaluated by Uitterdijk et al. on swine.²⁷ They reported a significant increase in sVCAM-1 expression during the first week after MI followed by a decrease up

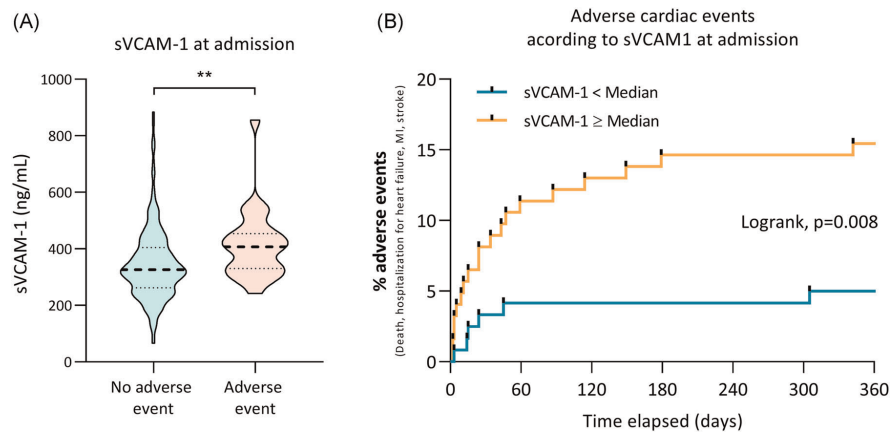


FIGURE 2 (A) Violin plot of sVCAM-1 serum level at admission in STEMI patients. $**p < .01$. (B) Adverse clinical events (all-cause death, myocardial infarction, stroke and hospitalization for heart failure) according to sVCAM-1 at admission. STEMI, ST-segment elevation myocardial infarction; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule-1

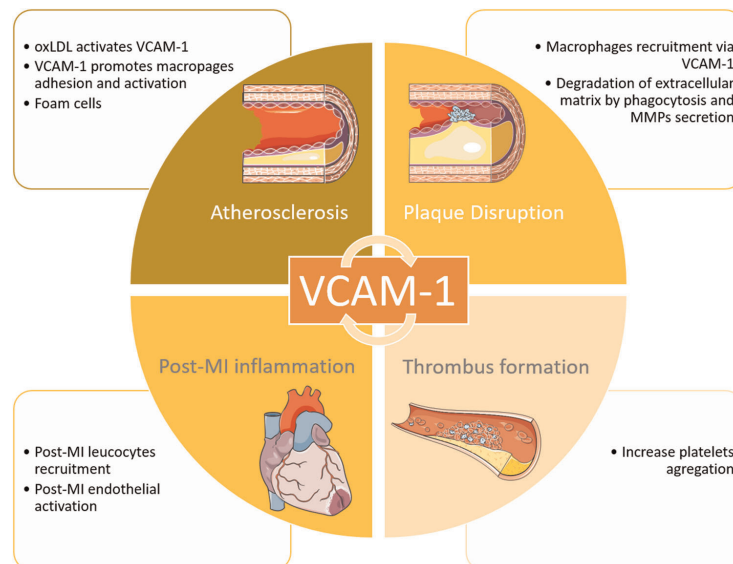


FIGURE 3 Central illustration: Graphical presentation summarizing the putative key role of sVCAM-1 after ST-elevation segment myocardial infarction. MI, myocardial infarction; MMP, matrix metalloproteinase; oxLDL, oxidized low-density lipoprotein; sVCAM-1, soluble vascular cell adhesion molecule 1

to 1 month. We can hypothesize that this sustained activation of VCAM-1 within the first month may participate in the LV remodeling process.

Here, we demonstrated that sVCAM-1 is an early biomarker of severity after STEMI and is correlated with

IS, LVEF, and LV remodeling. sVCAM-1 appeared as an efficient predictor of negative clinical outcome as illustrated by the ROC curve, superior to a classic marker of IS such as creatine kinase. We already demonstrated that, besides IS, several variables contribute strongly to the

clinical outcomes of STEMI patients and inflammation has probably an important role to play.²⁸

Our data highlight the importance of sVCAM-1 at the acute phase of MI (Figure 3). Few studies on STEMI patients have been published in this setting, with the majority of them including non-STEMI patients.^{16,19,21} The largest study prospectively enrolled all-coming acute MI and showed that elevated levels of sVCAM-1 associated with a reduced level of IL-17A at the time of admission for acute MI were associated with an increased risk of death and recurrent MI during the first year of follow-up, in line with our results.¹⁸

Soluble VCAM-1 has been reported to be higher in patients with LV dysfunction and is associated with a reduced prognosis. In a prospective study of 48 patients with acute MI, Lino et al. found that patients with heart failure had higher values of sVCAM-1.²⁰ Postadzhiyan et al.¹⁶ suggested that CAM serum levels may be more powerful than other inflammatory markers in predicting increased risk for cardiovascular events in patients after ACS. IS, as well as heart failure, involves physiological and pathological pathways that lead to an increase in several biomarkers.²⁹ In a clinical setting, troponin and creatinin phosphokinase are established biomarkers and correlate with IS and clinical outcomes. Our results support sVCAM-1 as a possible early prognosis biomarker. Alongside other markers, it could play a role in the assessment and management of STEMI patients at the acute phase and in identifying patients with a higher risk in the early stage. Postadzhiyan et al.¹⁶ also suggested that VCAM-1 release precedes myocardial injury and can hence identify patients with unstable atherosclerotic plaque formation even before complete microvascular obstruction.

The role of inflammation in the pathogenesis of MI leads to consider therapeutic strategies that target inflammation mediators.³⁰ This has been especially the case in atherosclerosis with the use of AGI-1067 therapy as an inhibitor of VCAM-1 gene expression.³¹ Cybuslky et al.³² demonstrated that this drug significantly reduced the extent of atherosclerotic lesions in a murine model of accelerated atherosclerosis, with decreased VCAM-1 expression. However, there is no available data regarding VCAM-1 inhibition during MI and it might be of interest to study the effect of sVCAM-1 inhibition in a preclinical model of MI. Also, as sVCAM-1 plays a key role in the onset of inflammation in a MI setting with a strong correlation with poor outcomes, it raises the question whereas these patients would be good candidates for anti-inflammatory therapeutic pathways such as colchicine and IL-1 inhibitors that recently showed promising results.^{33–35}

4.1 | Limitation of our study

There are a couple of limitations in our study. Blood samples were collected at the acute stage of STEMI and at 1 month after. Our cohort may lack an intermediate point of sampling (e.g., 1 week) and a late point of sampling (e.g., 1 year) to assess more accurately the kinetics of sVCAM-1 and to evaluate if it is back to baseline at 1 year. Furthermore, our study is descriptive and our data do not allow us to establish a cause-to-effect relationship. We assessed the soluble form of VCAM-1 that may differ from the cell surface form. This may question the representativeness of sVCAM-1 for endothelial activation. However, the study from Nakai et al. may help to answer this question. They showed that sVCAM-1 was correlated with the expression of VCAM-1 messenger RNA in patients with atherosclerotic aorta.³⁶ Thus, by extrapolating their results, we suppose that sVCAM-1 at the acute phase of MI may be representative of the cell surface form.

5 | CONCLUSION

sVCAM-1 serum levels increase within the first month following STEMI and are associated with IS, LV remodeling, and adverse clinical events at 1-year. These observations are of major clinical relevance as they warrant consideration around sVCAM-1 as an early biomarker of poor prognosis in STEMI patients.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Clinical Investigation Center and the NeuroBiotec (Nathalie Dufay and Guillaume Fiard) for all the work that has been performed in data collection and management for this study. This study was supported by the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) of Université de Lyon, within the program “Investissements d’Avenir” operated by the French National Research Agency (ANR).

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data are the property of the Hospices Civils de Lyon. Data can be requested by submitting an email to the person in charge at the Direction de la Recherche Clinique et de l’Innovation des Hospices Civils de Lyon: METZINGER Anne, anne.metzinger@chu-lyon.fr.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interests.


AUTHOR CONTRIBUTIONS

Dr. Ahmad Hayek contributed mainly to the writing of the article. M. Alexandre Paccalet participated in the

handling of the experiments and analysis of the samples. Dr. Laura Mechtouff participated in the analysis of the samples. Dr. Claire Crola Da Silva participated in the analysis of the samples. Pr Fabrice Ivanès: Participated in the proofreading of the article, corrections and proposal of additional analysis. Dr. Hadrien Falque participated in the experiments. Dr. Simon Leboube participated in the experiments. M^{me} Yvonne Varillon contributed largely to the handling of all technical aspects of the research. M^{me} Camille Amaz contributed to all statistical analysis. M. Charles de Bourguignon contributed by analysing all magnetic resonance imaging for all patients. Dr. Cyril Prieur participated largely in the patients' inclusion process. Dr. Danka Tomasevic participated largely in the patients' inclusion process. Dr. Nathalie Genot participated largely in the patients' inclusion process. Dr. François Derimay participated largely in the patients' inclusion process. Pr Eric Bonnefoy-Cudraz participated in the design of the study and its development. Dr. Gabriel Bidaux participated in the design of the study and its development. Pr Nathan Mewton participated in the design of the study and its development. Pr Michel Ovize participated in the design of the study and its development. Dr. Thomas Bochaton participated in the design of the study and its development, contributed to the writing of the article, analysis of samples, and statistical analysis.

ORCID

Ahmad Hayek  <https://orcid.org/0000-0002-5360-7039>

Thomas Bochaton  <https://orcid.org/0000-0002-5889-7506>

REFERENCES

- Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;104:365-372. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.104.3.365>
- Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 1994;24:1591-1601. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(94\)90162-7](https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)90162-7)
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143. <https://doi.org/10.1161/hc0902.104353>
- Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126. <https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207>
- Shyu KG, Chang H, Lin CC, Kuan P. Circulating intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute coronary syndrome. *Chest*. 1996;109:1627-1630. <https://doi.org/10.1378/chest.109.6.1627>
- Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJH. Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187:584-589. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(92\)91234-H](https://doi.org/10.1016/0006-291X(92)91234-H)
- Gearing AJ, Hemingway I, Pigott R, Hughes J, Rees AJ, Cashman SJ. Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. *Ann NY Acad Sci*. 1992;667:324-331. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1992.tb51633.x>
- O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques: implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest*. 1993;92:945-951. <https://doi.org/10.1172/JCI116670>
- Ghaisas NK, Shahi CN, Foley B, et al. Elevated levels of circulating soluble adhesion molecules in peripheral blood of patients with unstable angina. *Am J Cardiol*. 1997;80:617-619. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(97\)00432-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(97)00432-3)
- Singh R, Mason J, Lidington E, et al. Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ectodomain release is regulated by TIMP-3. *Cardiovasc Res*. 2005;67:39-49. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.02.020>
- Lin CC, Pan CS, Wang CY, Liu SW, Hsiao LDer, Yang CM. Tumor necrosis factor-alpha induces VCAM-1-mediated inflammation via c-Src-dependent transactivation of EGF receptors in human cardiac fibroblasts. *J Biomed Sci*. 2015;22:53. <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0165-8>
- Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxidants Redox Signal*. 2011;15:1607-1638. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3522>
- Barthel SR, Johansson MW, Annis DS, Mosher DF. Cleavage of human 7-domain VCAM-1 (CD106) by thrombin. *Thromb Haemost*. 2006;95:873-880.
- De Lemos JA, Hennekens CH, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 2000;36:423-426. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(00\)00742-7](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)00742-7)
- Mulvihill NT, Foley JB, Murphy RT, Curtin R, Crean PA, Walsh M. Risk stratification in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction using soluble cell adhesion molecules. *Heart*. 2001;85:623-627. <https://doi.org/10.1136/heart.85.6.623>
- Postadzhiyan AS, Tzontcheva AV, Kehayov I, Finkov B. Circulating soluble adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and their association with clinical outcome, troponin T and C-reactive protein in patients with acute coronary syndromes. *Clin Biochem*. 2008;41:126-133. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2007.09.001>
- Harling L, Lambert J, Ashrafian H, Darzi A, Gooderham NJ, Athanasiou T. Pre-operative serum VCAM-1 as a biomarker of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. *J Cardiothorac Surg*. 2017;12:70. <https://doi.org/10.1186/s13019-017-0632-2>
- Simon T, Taleb S, Danchin N, et al. Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2013;34:570-577. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs263>
- Rallidis LS, Gika HI, Zolindaki MG, Xydias TA, Paravolidakis KE, Velissaridou AH. Usefulness of elevated levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in predicting

- in-hospital prognosis in patients with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol.* 2003;92:1195-1197. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2003.07.029>
20. Lino DOC, Freitas IA, Meneses GC, et al. Interleukin-6 and adhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1 as biomarkers of post-acute myocardial infarction heart failure. *Brazilian J Med Biol Res.* 2019;52. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20198658>
 21. Tekin G, Tekin A, Sipahi I, Kaya A, Sansoy V. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and oncoming cardiovascular risk in patients with unstable angina pectoris and non-ST-segment elevation myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2005;96:379-381. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2005.03.080>
 22. Thygesen K, Alpert JS, Kristian Thygesen C, White HD, Lane Cardiovascular Service G. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J.* 2019;40:237-269. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy462>
 23. Bernelin H, Mewton N, Si-Mohamed S, et al. Nephilysin levels at the acute phase of ST-elevation myocardial infarction. *Clin Cardiol.* 2019;42:32-38. <https://doi.org/10.1002/clc.23090>
 24. Gearing AJH, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today.* 1993;14:506-512. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90267-O](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90267-O)
 25. Kerner T, Ahlers O, Reschreiter H, Bühner C, Möckel M, Gerlach H. Adhesion molecules in different treatments of acute myocardial infarction. *Crit Care.* 2001;5:145-150. <https://doi.org/10.1186/cc1014>
 26. Mulvihill NT, Foley JB, Murphy R, Crean P, Walsh M. Evidence of prolonged inflammation in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:1210-1216. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(00\)00824-X](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)00824-X)
 27. Uitterdijk A, Groenendijk BCW, Gorsse-Bakker C, et al. Time course of VCAM-1 expression in reperfused myocardial infarction in swine and its relation to retention of intracoronary administered bone marrow-derived mononuclear cells. *PLoS One.* 2017;12:e0178779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178779>
 28. Bochaton T, Claeys MJ, Garcia-Dorado D, et al. Importance of infarct size versus other variables for clinical outcomes after PPCI in STEMI patients. *Basic Res Cardiol.* 2019;115:4. <https://doi.org/10.1007/s00395-019-0764-8>
 29. Chow SL, Maisel AS, Anand I, et al. Role of biomarkers for the prevention, assessment, and management of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation.* 2017;135:e1054-e1091. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000490>
 30. Preiss DJ, Sattar N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis? *Int J Clin Pract.* 2007;61:697-701. <https://doi.org/10.1111/j.1742-1241.2007.01330.x>
 31. Kunsch C, Luchoomun J, Grey JY, et al. Selective inhibition of endothelial and monocyte redox-sensitive genes by AGI-1067: a novel antioxidant and anti-inflammatory agent. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;308:820-829. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.059733>
 32. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis Find the latest version: a major role for VCAM-1. *J Clin Invest.* 2001;107:1255-1262. <https://doi.org/10.1172/JCI11871>
 33. Asahina A, Tada Y, Nakamura K, Tamaki K. Colchicine and griseofulvin inhibit VCAM-1 expression on human vascular endothelial cells—evidence for the association of VCAM-1 expression with microtubules. *J Dermatol Sci.* 2001;25:1-9. [https://doi.org/10.1016/S0923-1811\(00\)00097-9](https://doi.org/10.1016/S0923-1811(00)00097-9)
 34. Nidorf SM, Fiolet ATL, Mosterd A, et al. Colchicine in patients with chronic coronary disease. *N Engl J Med.* 2020;383:1838-1847. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2021372>
 35. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med.* 2017;377:1119-1131. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1707914>
 36. Nakai K, Itoh C, Kawazoe K, et al. Concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) correlated with expression of VCAM-1 mRNA in the human atherosclerotic aorta. *Coron Artery Dis.* 1995;6:497-502.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Hayek A, Paccalet A, Mechtouff L, et al. Kinetics and prognostic value of soluble VCAM-1 in ST-segment elevation myocardial infarction patients. *Immun Inflamm Dis.* 2021;1–9. <https://doi.org/10.1002/iid3.409>

1.6. Myocardial ischemia-reperfusion and diabetes, lessons learned from bedside to bench

a) Introduction

Dans cette publication collaborative avec une autre étudiante en thèse du laboratoire, l'objectif était de souligner l'importance du choix des modèles pré-cliniques pour l'étude de l'infarctus du myocarde. En effet, face aux différents échecs cliniques, l'utilisation de modèle pré-clinique réalisé sur des modèles animaux jeunes, sans facteurs de co-morbidités associés est remis en question. Les facteurs d'âge, de sexe, de pathologies associées et les différentes médications doivent être prise en considération afin de s'approcher au plus près de la diversité biologique présente en clinique²⁸⁶. Parmi ces facteurs associés, le diabète apparaît comme une pathologie importante à évaluer. L'organisation mondiale de la santé rapporte que 420 millions de personnes vivent actuellement avec le diabète. Les patients diabétiques présentent un risque accru de mortalité et de développer une pathologie cardiovasculaire par rapport aux patients non diabétiques^{297,298}. Malgré l'augmentation du risque de survenue de l'infarctus, l'effet du diabète sur la récupération post infarctus du myocarde reste discutée au niveau clinique²⁹⁹⁻³⁰¹ et pré-clinique^{302,303}. Dans les modèles animaux, l'hétérogénéité des résultats peut être expliquée par l'utilisation de différents modèles de diabètes quand la variabilité entre les patients et la médication associée peuvent expliquer une différence de résultats dans les études cliniques.

L'objectif de cette étude était d'évaluer l'effet du diabète de type 2 sur la taille d'infarctus en comparant en parallèle les effets chez les patients de la cohorte HIBISCUS STEMI et dans un modèle murin de cardiomyopathie diabétique précoce³⁰⁴. Ces analyses soulèvent la question de la pertinence de l'utilisation de modèle murin diabétique pour étudier l'infarctus du myocarde.

Les résultats de cette étude montrent qu'une faible proportion de patients ayant subi un STEMI souffrent de diabète (14%). Aucune différence de taille d'infarctus n'est observée entre ces patients traités et les patients non diabétiques. Dans un modèle *in vitro* d'hypoxie-reoxygénation sur CMA adultes isolés, la mortalité est augmentée pour les CMA isolés à partir de souris diabétiques, cette augmentation est éliminée dans les souris diabétiques traitées à

la metformine. Ces résultats démontrent que la médication des patients doit être prise en considération dans les études pré-cliniques. Par ailleurs, la faible proportion de patients diabétiques soulève la question de la pertinence clinique de l'utilisation de modèles diabétiques. D'autres facteurs associés à la survenue d'événements cardiovasculaires tels que l'âge²⁸¹ peuvent s'avérer plus importants.

Dans cet article signé en co-premier auteur, j'ai réalisé les dosages cytokiniques et l'analyse des résultats de la cohorte HIBISCUS. J'ai également réalisé les mesures de taille d'infarctus dans le modèle murin. Nous avons avec les Dr Dia et Paillard écrit le manuscrit et réalisé les différentes révisions.



Myocardial Ischemia-Reperfusion and Diabetes: Lessons Learned From Bedside to Bench

Maya Dia^{1,2†}, Alexandre Paccalet^{1†}, Bruno Pillot¹, Christelle Leon¹, Michel Ovize^{1,3}, Claire Crola Da Silva¹, Thomas Bochaton^{1,3} and Melanie Paillard^{1*}

¹ Laboratoire CarMeN-équipe IRIS, INSERM, INRA, Université Claude Bernard Lyon-1, INSA-Lyon, Univ-Lyon, Bron, France,

² Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Faculty of Sciences, Lebanese University-Beirut, Beirut, Lebanon,

³ IHU OPERA, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Stéphanie Barrere-Lemaire,
INSERM U1191 Institut de Génétique
Fonctionnelle (IGF), France

Reviewed by:

Kroekkiat Chinda,
Naresuan University, Thailand
Anne Vincent,
Université de Montpellier, France

*Correspondence:

Melanie Paillard
melanie.paillard@univ-lyon1.fr

[†] These authors share first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Cardiovascular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

Received: 29 January 2021

Accepted: 09 March 2021

Published: 26 March 2021

Citation:

Dia M, Paccalet A, Pillot B, Leon C,
Ovize M, Crola Da Silva C, Bochaton T
and Paillard M (2021) Myocardial
Ischemia-Reperfusion and Diabetes:
Lessons Learned From Bedside to
Bench.
Front. Cardiovasc. Med. 8:660698.
doi: 10.3389/fcvm.2021.660698

In front of the failure to translate from bench to bedside cardioprotective drugs against myocardial ischemia-reperfusion, research scientists are currently revising their animal models. Owing to its growing incidence nowadays, type 2 diabetes (T2D) represents one of the main risk factors of co-morbidities in myocardial infarction. However, discrepancies exist between reported animal and human studies. Our aim was here to compare the impact of diabetes on cell death after cardiac ischemia-reperfusion in a human cohort of ST-elevation myocardial infarction (STEMI) patients with a diet-induced mouse model of T2D, using a high-fat high-sucrose diet for 16 weeks (HFHSD). Interestingly, a small fraction (<14%) of patients undergoing a myocardial infarct were diabetic, but treated, and did not show a bigger infarct size when compared to non-diabetic patients. On the contrary, HFHSD mice displayed an increased infarct size after an *in vivo* cardiac ischemia-reperfusion, together with an increased cell death after an *in vitro* hypoxia-reoxygenation on isolated cardiomyocytes. To mimic the diabetic patients' medication profile, 6 weeks of oral gavage with Metformin was performed in the HFHSD mouse group. Metformin treatment of the HFHSD mice led to a similar extent of lower cell death after hypoxia-reoxygenation as in the standard diet group, compared to the HFHSD cardiomyocytes. Altogether, our data highlight that due to their potential protective effect, anti-diabetic medications should be included in pre-clinical study of cardioprotective approaches. Moreover, since diabetic patients represent only a minor fraction of the STEMI patients, diabetic animal models may not be the most suitable translatable model to humans, unlike aging that appears as a common feature of all infarcted patients.

Keywords: diabetes mellitus, myocardia infarction, human, animal model, medication

INTRODUCTION

In front of the failure of cardioprotective approaches against myocardial infarction (MI) in several clinical studies (1–3), reconsidering animal models by taking into account all the patients' confounding factors may become inevitable for researchers. Aging, gender, co-morbidities, accompanying diseases and medications are underestimated factors that disrupt the translation of basic research into humans (4). Among them, diabetes appears as one of the most relevant due to its growing rise in prevalence and incidence nowadays.

The World Health Organization reports 422 million people living currently with diabetes worldwide. Diabetes increases the risk of mortality compared with non-diabetic patients and mainly cardiovascular diseases such as stroke and acute coronary syndromes (5, 6). Indeed, diabetes slightly increases the risk of mortality in all type of acute coronary syndromes (7). However, patients with type 2 diabetes (T2D) are often followed and treated with medications to regulate their metabolic dysfunction and these treatments may have an impact on the response to other injury such as an ischemic stress. While a higher risk to develop MI for a diabetic patient is recognized, the effect of diabetes on post-MI infarct size is still not clear. In fact, some studies, focusing on ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI), have showed that diabetic patients may develop a larger infarct size, as demonstrated in both clinical trials CORE and EMERALD (8, 9). On the contrary, De Luca et al. have indicated no changes in infarct size between non-diabetic and diabetic patients after primary angioplasty (10). Similar infarct size was also observed in a clinical study comparing diabetic patients with and without insulin treatment (11). Interestingly, these discrepancies among clinical trials mirror the results in diabetic animal studies (12). For example, using the high-fat insulin resistant rat, bigger infarct sizes were reported after *in vivo* cardiac ischemia-reperfusion (13), while the recent study using the T2D Zucker rats showed no difference in infarct size between lean and fatty animals (14).

In the diabetic animal models, the heterogeneity in findings may be related to the diabetic inducers (genetic, treatment, diet...) and/or to the timing (early diabetic cardiomyopathy vs. late heart failure stage); while in patients, the intra- and inter-variabilities between humans, as well as their companion medications schedule could have an impact. It should be noted that *in vivo* cardiac ischemia-reperfusion animal protocols rather represent STEMI patients. In this context, infarct size remains an important determinant of the post-MI outcome and is used as an endpoint in both animal and clinical studies of cardioprotective strategies. Therefore, we ought to investigate further the effect of T2D on myocardial infarct size by confronting the results of STEMI patients to a mouse model of early diabetic cardiomyopathy (15) in order to question the relevance of diabetic animal models in studies of cardioprotection against MI.

METHODS

Human Cohort and Consent Information

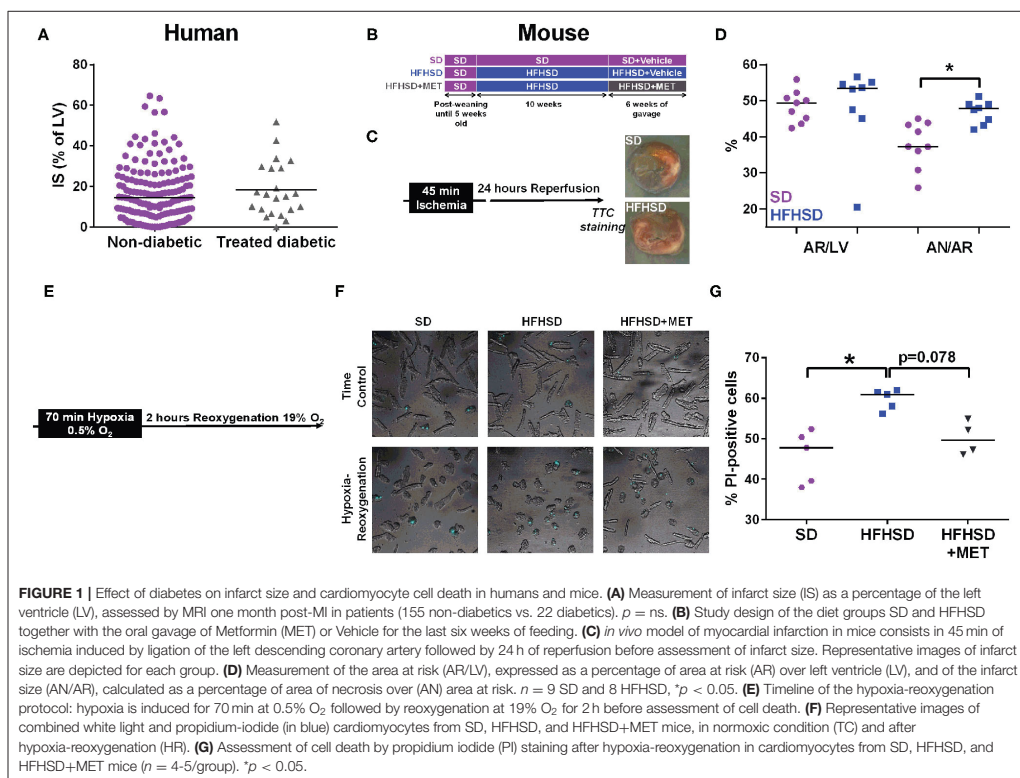
The study was approved by our institution Review Board and Ethics Committee and is registered with the ClinicalTrials.gov identifier NCT03070496. Patients have given their written consent. From the previously described cohort composed of 250 consecutive patients admitted to the Louis Pradel Hospital for a suspected ST-elevation myocardial infarction (STEMI) from 2016 to 2020 (16), all patients underwent coronary angiography at admission with subsequent reperfusion by primary percutaneous intervention (PCI); but only 177 patients underwent contrast enhanced Cardiac Magnetic Resonance

(CMR) at one month after MI for infarct size and LV function measurements.

Type 2 Diabetes Animal Model and *in vivo* Ischemia-Reperfusion Protocol

All animal procedures performed conform to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and were approved by the institutional animal research committee from Université Claude Bernard Lyon 1 and the French ministry (#15,627–2018062118508398 and BH2012-65). Male C57BL/6J^{OlaHsd} (Envigo, France) mice were from the same cohort as characterized previously (15): they were subjected to either a standard diet (SD: LASQC diet Rod16-A, Genobios: 16.9% proteins, 4.3% lipids) or a high-fat high-sucrose diet (HFHSD: 260HF U8978 version 19, from SAFE: 20% proteins, 36% lipids, and 35% carbohydrates) for 16 weeks (Figure 1B). For the last 6 weeks of the feeding protocol, metformin gavage (200 mg/kg) was performed daily for half of the HFHSD mice, with the other control group being given the vehicle (0.5% methylcellulose) (17).

For the *in vivo* ischemia-reperfusion (Figure 1C), mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg body weight, intraperitoneal injection) and xylazine (5 mg/kg body weight, intraperitoneal injection) and were orally intubated and ventilated via a rodent ventilator (Physiosuite[®] system from Kent Scientific). Body temperature was monitored by a rectal thermometer and maintained within the normal range by using a heating pad. A left thoracotomy was performed and the pericardium was opened to expose the heart. An 8-0 polypropylene suture was passed around the left anterior descending artery, under an Euromex microscope, for further creating ischemia. Ischemia was confirmed by ST segment shift on the ECG and appearance of epicardial pallor. After 45 min of coronary artery occlusion, the snare was loosened, and reperfusion was confirmed by visual inspection and reduction of ST segment shift on the ECG. The chest wall was closed with a 5-0 vicryl suture and the endotracheal tube was removed once spontaneous breathing had resumed. The mice were then allowed to recover from the anesthesia in a temperature-controlled area enriched with O₂. At the end of the 24-h reperfusion, the mice were deeply anesthetized to allow reocclusion of the artery (the suture material was still in place from the previous surgery) and Unisperse blue pigment (0.5 mg/kg i.v.; Ciba-Geigy) was injected in the inferior vena cava. With this technique, the non-ischemic myocardium appears blue, whereas the ischemic myocardium [area at risk (AR)] remains unstained. The heart was then excised and the atrial and right ventricular tissues were removed. The left ventricle was then cut into four 1 mm thick transverse slices. The basal surface of each slice was photographed for later measurement of the area at risk. Slices were then incubated for 15 min in a 1% solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) at 34°C. With this technique, the viable myocardial tissues appear brick red, whereas the infarcted tissues remain pale. The slices were then photographed for later measurement of the area of necrosis (AN). The extent of the area at risk and the infarcted



area was quantified by computerized planimetry and corrected for the weight of the tissue slices.

Adult Cardiomyocyte Isolation

Mice were heparinized and euthanized by cervical dislocation. Cardiomyocytes were then isolated using O'Connell's protocol (18) and plated for 2 h on glass bottom 35 mm dishes (MatTek) with complete plating medium (MEM Eagle's w/HBSS, FBS 10%, BDM 10 mM, penicillin 100 U/ml, Glutamine 2 mM, ATP 2 mM) prior to the sequence of hypoxia-reoxygenation.

In vitro Hypoxia-Reoxygenation Protocol

Cardiomyocytes were washed twice to remove serum and nutrients with 1 mL Hypoxia Buffer at 37°C (HRB: 0.14 M NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 2 mM $CaCl_2$, pH 7.4). Hypoxia was performed in 1 mL of HRB solution for 70 min at 0.5% O_2 / 37°C (including a stabilization period of 25 min to reach the desired level of O_2 in an hypoxic incubator New Brunswick, Eppendorf). Reoxygenation at 19% O_2 /120 min/37°C was next achieved by quickly but gently replacing the hypoxic medium with 1.5 mL plating medium. At the end of the 2 h of reoxygenation, counting of propidium iodide-positive cells (PI

at 1 $\mu g/ml$) and of morphologically dead cardiomyocytes (loss of rod-shape) was performed by confocal microscopy (Nikon) and subsequent analysis was done on ImageJ software.

Statistics

All data were subjected to normality test. Mann-Whitney was applied for the ones which failed the normality test and data were presented as median [Interquartile range]. However, parametric tests were applied for normally distributed data, presented as mean \pm SD. For the three groups comparison, a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's multiple comparison test was performed. A p -value < 0.05 was considered statistically significant. Analysis was performed on GraphPad Prism.

RESULTS

Treated Diabetic Patients Exhibit Similar Infarct Size as the Non-diabetics

Patients were included with a median age of 59 ± 12 years. Among the 250 patients, 37 patients suffered from type 2 diabetes, giving a proportion of 14.8% diabetic patients suffering from MI

TABLE 1 | Characteristics of the study population.

	Non-diabetic patients (n = 213)	Diabetic patients (n = 37)	p value
Age, years	57 ± 11	63 ± 10	0.02
Male sex, nb (%)	168 (78.9)	30 (81.1)	0.83
Body Mass Index (BMI), kg/m ²	26.3 [23.9-29.4]	25.9 [23.7-29.6]	0.69
Dyslipidemia, nb (%)	50 (23.5)	23 (62.1)	<0.0001
Hypertension, nb (%)	52 (24.4)	22 (59.5)	<0.0001
Current smoker, nb (%)	150 (70.4)	21 (56.8)	0.12
Time from symptoms to PCI, min	205 [145-334.0]	200.0[120.0-251.3]	0.46
Anterior MI, nb (%)	113 (53.3)	19 (51.4)	0.86
Killip status = 1, nb (%)	193 (90.5)	31 (79.5)	0.05
TIMI flow grade at admission = 0-1, nb (%)	140 (72.5)	28 (75.7)	0.84
Post-PCI TIMI flow grade >2 (%)	207 (98.1)	34 (91.9)	0.07
LVEF at baseline (%)	55.0 [46.0-61.3]	50.0 [44.0-62.0]	0.2957
Peak troponin I, ng/L	43907 [16642-107843]	46466 [14353-144943]	0.55
Peak creatine kinase, mU/L	1529 [684.3-3542.0]	1815 [641.0-4076.0]	0.68
Peak CRP, mg/L	16.1 [7.1-40.5]	42.6 [11.7-74.3]	0.02
Aspirin, nb (%)	24 (11.3)	10 (27.0)	0.02
Betablockers, nb (%)	17 (8.0)	9 (24.3)	<0.0001
ACEi / ARB, nb (%)	27 (12.7)	17 (45.9)	0.006
Statins, nb (%)	21 (9.9)	13 (35.1)	0.0002

Values are expressed as Mean ± SD, Median [interquartile range] or number with percentage (%). PCI, percutaneous coronary intervention; MI, myocardial infarction; TIMI, thrombolysis in myocardial infarction; LVEF, left ventricular ejection fraction; CRP, C-reactive protein. ACEi, angiotensin-converting enzyme inhibitors; ARB, angiotensin II receptor blockers.

in this cohort. The characteristics of the study population are presented in **Table 1**. Type 2 diabetic patients were significantly older than non-diabetic patients with a median age of 62 ± 11 vs. 57 ± 12 years ($p < 0.05$), and were more prone to hypertension (**Table 1**). Diabetic patients had a higher percentage of medications taken, including aspirin, statins, betablockers, and angiotensin-converting enzyme inhibitors/angiotensin II receptor blockers (ACEi/ARB) (**Table 1**). All diabetic patients were treated with antidiabetics, mainly Metformin and 9 were under insulin, therefore being considered as treated diabetic. Based on the analysis of the Killip Status, we observed a higher rate of patients with sign of heart failure development in the treated-diabetic patients group compared to the non-diabetic patients (**Table 1**). No differences were observed between the two population regarding the coronary flux evaluated with the TIMI flow grade. Treated-diabetic patients displayed a higher level of C-reactive protein compared to non-diabetic patients (42.6 mg/L interquartile range (IQR): [11.7-74.3] compare to 16.1 mg/L IQR [7.1-40.5], $p = 0.02$). In our cohort population, dyslipidemia affected more patients with treated diabetes than non-diabetic patients (23.5% compare to 62.1%, $p < 0.001$).

No differences were observed neither on the infarct size measurement between treated-diabetic and non-diabetic patients (**Figure 1A**) (respectively, 14.5% [6.8-24.2] of the left ventricle mass compared to 15.6% [IQR: 8.1-29.1]), nor on the left ventricular ejection fraction assessed at one month (treated-diabetic, 53% [IQR: 46.0-58.5] compared to non-diabetic, 50.5 [IQR: 41.5-57.0]).

Increased Cell Death After Hypoxia-Reoxygenation in Diabetic Cardiomyocytes Is Prevented by Metformin Treatment

The mice used in this study were from the same cohort in which we previously characterized the diet-induced T2D mouse model recapitulating the early stage of diabetic cardiomyopathy in human, notably glucose, and insulin intolerance, hyperglycemia, and hyperlipidemia (15). We thus investigated the effect of T2D on infarct size after an *in vivo* ischemia-reperfusion sequence in the 16 weeks diet-fed mice, at the age of 21 weeks (**Figure 1C**). While the areas at risk were comparable between SD and HFHSD mice, HFHSD displayed a significant bigger infarct size compared to the SD mice (**Figure 1D**: HFHSD, 47.8 [43.5, 49.0] vs. SD, 37.3 [33.5, 43.6] % AR/AN, $n = 8-9$ mice/group, $p < 0.05$). Similarly, cardiomyocytes freshly isolated from HFHSD diabetic mice displayed a significant increased cell death upon simulated ischemia-reperfusion, namely hypoxia-reoxygenation, compared to the SD cardiac cells (**Figures 1E-G**, HFHSD, 60.9 [57.1, 61.8] vs. SD, 47.8 [38.8, 51.4] % of PI-positive cells, $n = 5$ /group, $p < 0.05$).

One could wonder whether the difference in diabetes-induced cell death after an ischemic event between the patients and the mouse model could rely on the antidiabetic medication regimen taken by the diabetic patients of the cohort, notably Metformin. To this end, the HFHSD mice received an oral gavage with Metformin for the last 6 weeks of the feeding. As previously

described, Metformin did not decrease the body weight of the HFHSD mice but partially rescued the sensitivity to insulin and glucose (17) (data not shown). Interestingly, Metformin treatment of the HFHSD mice led to a reduction of cell death after hypoxia-reoxygenation compared to the HFHSD cardiomyocytes (HFHSD+MET, 49.7 [46.4, 54.2] % of PI-positive cells, $n = 4-5$ /group, $p = 0.078$ vs. HFHSD), reaching a similar extent as in the standard diet group ($p = ns$ vs. SD) (Figures 1E,G).

DISCUSSION

The goal of our study was to compare the impact of diabetes on cell death after cardiac ischemia-reperfusion in a human cohort of STEMI patients with a diet-induced mouse model of T2D. In our human study population, no differences have been observed regarding the infarct size between treated-diabetic and non-diabetic patients. The baseline characteristics of our study populations are in line with the literature. Indeed, dyslipidemia is a common feature of diabetes (19) and diabetic patients displayed a higher level of C-reactive protein (20). Our population cohort displayed a small proportion of diabetic patients (14.8 %), which may be explained by the selection of only STEMI patients. Indeed, the proportion of diabetic patients in non-STEMI population is more important than in STEMI, as previously reported in the FAST-MI study (21) (16.5% of STEMI patients are diabetic while 27% of non-STEMI patients are diabetic) and in a larger database study (7) (28.8% of non-STEMI patients were diabetic compared to 18.2% in the STEMI group). Interestingly, a temporal study between 1995 and 2003 also highlighted that the diabetic patients are now more prompt to non-STEMI events (5).

As to our results in the HFHSD mice, they revealed an increased infarct size in an *in vivo* model of myocardial infarction as well as an increased cell death following a simulated ischemia-reperfusion, which was prevented by a Metformin daily treatment, as usually performed in diabetic patients. Importantly, Metformin has been shown to exert a cardioprotection through activating the AMPK pathway and upregulating PGC-1 α , which improves mitochondrial organization and function (22, 23). Metformin is used as a first line antidiabetic drug, not only due to its glucose lowering potential, but also to its cardiovascular safety and protective contribution. Altogether, our data suggest that the similar infarct size seen between all STEMI patients regardless of their diabetic history may be mainly due to the protective effect afforded by their antidiabetic medication, such as Metformin, insulin, and sulfonylurea drugs, as previously described (13, 24). Therefore, evaluation of the protective effect of new therapeutic drugs in diabetic animal models is effectively of interest but should be combined with the routinely used antidiabetic medications, such as Metformin, to rule out any confounding action between the pre-existing medications and the potential protective therapy. However, while similar results were observed after *in vivo* and *in vitro* ischemia-reperfusion, i.e., increased infarct size/cell death in the HFHSD group vs. SD group, thus validating the relevance of the *in vitro* experiments, one limitation of our study relies on the absence of *in vivo* measurement of infarct size in the HFHSD+MET group.

Moreover, besides their antidiabetic treatments, diabetic patients were significantly receiving more treatments than non-diabetic patients, i.e., aspirin, betablockers, and ACEi, which may also have cardioprotective effects not directly on infarct size but on the major adverse cardiovascular events (25). Therefore, taking into consideration also the current medications used routinely by the patients and at the time of reperfusion in the clinical settings would be an invaluable asset in assessing the relevance of cardioprotective drugs in *in vivo* animal studies.

However, as shown by our human cohort of STEMI patients and by others, diabetic patients only represent a minor fraction (around 15%) of the STEMI patients while closer to 30% in the non-STEMI population. Since the current animal models of *in vivo* ischemia-reperfusion usually rely on a coronary artery occlusion, thus representing the STEMI population, diabetes may not be the best co-morbidities to be taken into account to evaluate new cardioprotective strategies. While aging and hypertension were significantly more present in the diabetic patients and could also explain a form of cardioprotection by favoring coronary collateral circulation (26), one main common factor of all patients is aging (4). Although this factor is more complicated to pursue in animal models, future studies are required to assess the relevance of aging in our animal models to study cardioprotection against MI.

Finally, it has been recently shown that infarct size is not the only factor to take into consideration regarding the patient post-MI clinical outcome (25), therefore highlighting the importance to evaluate the effect of cardioprotective strategies not only on infarct size but on the contractile function and the survival notably. Indeed, the higher rate of mortality observed in diabetic patients after MI may not be due to the infarct size but to several confounding factors observed in diabetic patients such as the diabetic cardiomyopathy and dyslipidemia.

All these discrepancies between studies, whether among animal models or clinical testing, have raised a lot of questioning about scientists' attempt to translate their fundamental research into clinics. Here, we provide some advices for translational research in the field of cardioprotective strategies against MI by: (1) considering comorbidities, such as diabetes, together with their daily medication, into the animal models; (2) evaluating the relevance of each comorbidity in the protective approaches, notably between diabetes and aging; and (3) extending our experimental endpoints beyond infarct size, i.e., contractile function and survival study.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by CPP of the Hospices Civils de Lyon. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study. The animal study was reviewed

and approved by Université Claude Bernard Lyon 1 and the French ministry.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MP, MD, AP, CC, and TB: conceptualization. MD, CL, BP, and MP: experimental investigation. MD, AP, TB, and MP: data collection and analysis. MD and AP: manuscript writing. MP, TB, and CC: manuscript reviewing. MP and MO: funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This study was funded by a grant from Fondation de France (n°00056853) to MP, by a contribution from the Azm and Saade association and supported by Fondation Leducq as part of its

TNE program (n°16CVD04: Mitocardia Network) to MO. MP was a recipient of postdoctoral fellowships from the Fondation Lefoulon-Delalande and Fondation pour la Recherche Médicale (n°ARF20160936149). MO was supported by the OPeRa (ANR-10-IBHU-0004 OPeRa) and the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) programs. AP was supported by the Fondation pour la Recherche Médicale (FDT202012010540). The authors would like to acknowledge the National Council for Scientific Research of Lebanon (CNRS-L), Agence Universitaire de la Francophonie (AUF) and Lebanese University for granting a doctoral fellowship to MD (AUF-CNRS-UL program).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Clinical Investigation Center (Inesse Boussaha, Camille Amaz) and NeuroBiotec (Dr. N. Dufay) for all of the work that has been performed in data collection and management for this study.

REFERENCES

- Ottani F, Latini R, Staszewsky L, La Vecchia L, Locuratolo N, Sicuro M, et al. Cyclosporine A in reperfused myocardial infarction: the multicenter, controlled, open-label CYCLE trial. *J Am Coll Cardiol*. (2016) 67:365–74. doi: 10.1016/j.jacc.2015.10.081
- Cung T-T, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, et al. Cyclosporine before PCI in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. (2015) 373:1021–31. doi: 10.1056/NEJMoa1505489
- Heusch G. Critical issues for the translation of cardioprotection. *Circ Res*. (2017) 120:1477–86. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310820
- Ruiz-Meana M, Boengler K, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Kaambre T, Kararigas G, et al. Ageing, sex, and cardioprotection. *Br J Pharmacol*. (2019) 177:5270–86. doi: 10.1111/bph.14951
- Cubbon RM, Wheatcroft SB, Grant PJ, Gale CP, Barth JH, Sapsford RJ, et al. Temporal trends in mortality of patients with diabetes mellitus suffering acute myocardial infarction: a comparison of over 3000 patients between 1995 and 2003. *Eur Heart J*. (2007) 28:540–5. doi: 10.1093/eurheartj/ehl510
- Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. *Am J Cardiol*. (1974) 34:29–34. doi: 10.1016/0002-9149(74)90089-7
- Donahoe SM, Stewart GC, McCabe CH, Mohanavelu S, Murphy SA, Cannon CP, et al. Diabetes and mortality following acute coronary syndromes. *JAMA*. (2007) 298:765. doi: 10.1001/jama.298.7.765
- Alegria JR, Miller TD, Gibbons RJ, Yi Q-L, Yusuf S, Collaborative Organization of RheothRx Evaluation (CORE) Trial Investigators. Infarct size, ejection fraction, and mortality in diabetic patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *Am Heart J*. (2007) 154:743–50. doi: 10.1016/j.ahj.2007.06.020
- Marso SP, Miller T, Rutherford BD, Gibbons RJ, Qureshi M, Kalynych A, et al. Comparison of myocardial reperfusion in patients undergoing percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation acute myocardial infarction with versus without diabetes mellitus from the EMERALD Trial. *Am J Cardiol*. (2007) 100:206–210. doi: 10.1016/j.amjcard.2007.02.080
- De Luca G, Parodi G, Sciagrà R, Bellandi B, Vergara R, Migliorini A, et al. Effect of diabetes on scintigraphic infarct size in STEMI patients undergoing primary angioplasty. *Diabetes Metab Res Rev*. (2015) 31:322–8. doi: 10.1002/dmrr.2620
- Reinstadler SJ, Stiermaier T, Eitel C, Metzler B, Waha S de, Fuernau G, et al. Relationship between diabetes and ischaemic injury among patients with revascularized ST-elevation myocardial infarction. *Diab Obes Metab*. (2017) 19:1706–13. doi: 10.1111/dom.13002
- Miki T, Itoh T, Sunaga D, Miura T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol*. (2012) 11:67. doi: 10.1186/1475-2840-11-67
- Apajai N, Chinda K, Palee S, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Combined vildagliptin and metformin exert better cardioprotection than monotherapy against ischemia-reperfusion injury in obese-insulin resistant rats. *PLoS ONE*. (2014) 9:e102374. doi: 10.1371/journal.pone.0102374
- Wider J, Undyala VVR, Whittaker P, Woods J, Chen X, Przyklen K. Remote ischemic preconditioning fails to reduce infarct size in the Zucker fatty rat model of type-2 diabetes: role of defective humoral communication. *Basic Res Cardiol*. (2018) 113:16. doi: 10.1007/s00395-018-0674-1
- Dia M, Gomez L, Thibault H, Tessier N, Leon C, Chouabe C, et al. Reduced reticulum-mitochondria Ca²⁺ transfer is an early and reversible trigger of mitochondrial dysfunctions in diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*. (2020) 115:74. doi: 10.1007/s00395-020-00835-7
- Bochaton T, Paccalet A, Jeantet P, Crola Da Silva C, Cartier R, Prieur C, et al. Heat shock protein 70 as a biomarker of clinical outcomes after STEMI. *J Am Coll Cardiol*. (2020) 75:122–4. doi: 10.1016/j.jacc.2019.10.044
- Tubbs E, Axelsson AS, Vial G, Wollheim CB, Rieusset J, Rosengren AH. Sulforaphane improves disrupted ER-mitochondria interactions and suppresses exaggerated hepatic glucose production. *Mol Cell Endocrinol*. (2018) 461:205–14. doi: 10.1016/j.mce.2017.09.016
- O'Connell TD, Rodrigo MC, Simpson PC. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol Biol*. (2007) 357:271–96. doi: 10.1385/1-59745-214-9:271
- Chapman MJ, Ginsberg HN, Amarencu P, Andreotti F, Borén J, Catapano AL, et al. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management. *Eur Heart J*. (2011) 32:1345–61. doi: 10.1093/eurheartj/ehr112
- Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, Gaw A, Ford I, Lowe GDO, et al. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes*. (2002) 51:1596–600. doi: 10.2337/diabetes.51.5.1596
- Puymirat E, Simon T, Cayla G, Cottin Y, Elbaz M, Coste P, et al. Acute myocardial infarction: changes in patient characteristics, management, and 6-month outcomes over a period of 20 years in the FAST-MI program (French registry of acute ST-elevation or non-ST-elevation myocardial infarction) 1995 to 2015. *Circulation*. (2017) 136:1908–19. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.030798
- Whittington HJ, Hall AR, McLaughlin CP, Hausenloy DJ, Yellon DM, Mocanu MM. Chronic metformin associated cardioprotection against infarction: not just a glucose lowering phenomenon. *Cardiovasc Drugs Ther*. (2013) 27:5–16. doi: 10.1007/s10557-012-6425-x

23. Yang Y, Sauve AA. NAD⁺ metabolism: bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. *Biochim Biophys Acta*. (2016) 1864:1787–800. doi: 10.1016/j.bbapap.2016.06.014
24. Lexis CPH, Wieringa WG, Hiemstra B, van Deursen VM, Lipsic E, van der Harst P, et al. Chronic metformin treatment is associated with reduced myocardial infarct size in diabetic patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*. (2014) 28:163–71. doi: 10.1007/s10557-013-6504-7
25. Bochaton T, Claeys MJ, Garcia-Dorado D, Mewton N, Bergerot C, Jossan C, et al. Importance of infarct size versus other variables for clinical outcomes after PPCI in STEMI patients. *Basic Res Cardiol*. (2019) 115:4. doi: 10.1007/s00395-019-0764-8
26. Kyriakides ZS, Kremastinos DT, Michelakakis NA, Matsakas EP, Demovelis T, Toutouzas PK. Coronary collateral circulation in coronary artery disease and systemic hypertension. *Am J Cardiol*. (1991) 67:687–90. doi: 10.1016/0002-9149(91)90522-m

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Dia, Paccalet, Pillot, Leon, Ovize, Crola Da Silva, Bochaton and Paillard. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

1.7. Soluble C-Met as a biomarker of clinical outcomes after STEMI

a) Introduction

Le maintien des fonctions cellulaires est principalement médié par des facteurs de croissance et leurs récepteurs respectifs à activité tyrosine kinase. Le récepteur Met (c-Met) a été découvert en 1984 et est activé par le facteur de croissance Hépatocyte Growth Factor (HGF). La voie de signalisation HGF-MET active les voies de l'angiogenèse et facilite la régénération tissulaire³⁰⁵. Pour ces particularités et sa forte expression au sein des cellules cancéreuses, l'inhibition de la voie c-Met est une approche thérapeutique prometteuse en oncologie³⁰⁶. De manière intéressante, dans le cœur infarcté, la voie de signalisation HGF-MET est activée et entraîne une activation de voies anti-apoptotiques, anti inflammatoires et anti fibrotiques³⁰⁷. Le domaine transmembranaire de C-Met peut être clivé et libéré dans le sérum. Cette forme soluble du récepteur est un biomarqueur intéressant en oncologie et est associé à un mauvais pronostic³⁰⁸.

L'objectif de cette étude, où j'ai réalisé les dosages de C-Met, participé à l'analyse des résultats et à l'écriture, était donc de déterminer la cinétique de libération de C-Met dans le premier mois post STEMI et sa potentielle relation avec la survenue d'événements cardiaque majeurs. Le taux circulant de C-Met diminue massivement à H48 et est augmenté à 1 mois. Le taux circulant à H48 n'est pas corrélé avec la taille d'infarctus et la LVEF. Les patients présentant un taux circulant à H48 inférieur à la médiane de la population sont plus à risque de souffrir d'un évènements cardiaques majeurs évalués à 1 an.

Ces résultats suggèrent que le maintien d'un niveau élevé de C-Met semble être associé à une meilleure récupération post infarctus, ouvrant de nouvelles perspectives d'étude pré-clinique.

b) Publication

En cours d'impression

2. Publications collaboratives portant sur l'ischémie-reperfusion cérébrale

Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la première cause de handicap acquis et touchent 140 000 personnes par an en France. Deux grandes catégories d'AVC sont décrites, avec les infarctus cérébraux ou AVC ischémiques, résultant de l'occlusion d'une artère cérébrale par un thrombus et les AVC hémorragiques. Les AVC ischémiques représentent environ 80% des AVC et résultent de la formation d'un thrombus à la suite d'arythmie cardiaque, de rupture de plaque d'athérome ou encore de maladie des petites artères. La première étape de la prise en charge du patient en unité neurovasculaire consiste à déterminer le type d'AVC par méthode d'imagerie utilisant le scanner cérébral et l'imagerie par résonance magnétique de perfusion. Concernant les AVC ischémiques, comme pour le STEMI, le traitement de reperfusion est l'élément primordial. Cette reperfusion se faisait classiquement par thrombolyse intraveineuse consistant en l'administration d'activateur du plasminogène recombinant afin de dégrader le caillot. Ce traitement doit être réalisé rapidement. Récemment, le développement de la thrombectomie mécanique a révolutionné la prise en charge du patient. Cette technique consiste à retirer le caillot et dé-occlure l'artère. Au-delà de la prise en charge, le suivi des patients est également très important et la survenue de complication post AVC est fréquente. Comme pour l'infarctus cardiaque, l'inflammation joue un rôle majeur dans la pathologie de l'ischémie-reperfusion cérébrale. Une meilleure compréhension des mécanismes inflammatoires mis en jeu permettrait d'améliorer la survie des patients et leurs récupérations. C'est donc avec la même approche que pour le STEMI, qu'une cohorte de patient AVC a été constitué au sein de l'hôpital Pierre Wertheimer des hospices civils de Lyon. Cette cohorte inclus des patients admis pour un AVC ischémique traités par thrombectomie mécanique. Le sérum de ces patients est prélevé à cinq temps comme pour la cohorte STEMI, en revanche ces temps sont différents : Admission (H0), six heures suivant l'admission (H6), 24h (H24), 48h (H48) et trois mois (M3) suivant l'admission. Une imagerie par résonance magnétique (IRM) pour évaluer la perfusion est réalisée à l'admission, puis une tomodensitométrie est réalisée à H24. Une IRM de suivi est également réalisée après six jours. Les atteintes neurologiques sont évaluées par le score NIHSS.

J'ai eu la chance au cours de ma thèse de pouvoir travailler en collaboration avec les docteurs Mechtouff et Bochaton sur l'évaluation des marqueurs inflammatoires circulants dans cette population de patients AVC. L'objectif global de cette étude était d'identifier les cinétiques de libérations de différents marqueurs de l'inflammation cérébrales et d'évaluer leurs corrélations avec des facteurs cliniques importants. Ces analyses ont donné lieu à plusieurs publications collaboratives qui vous sont présentées ici.

2.1. Association of Interleukin-6 levels and futile reperfusion after mechanical thrombectomy

a) Introduction

La reperfusion dite futile est un phénomène très courant consistant à une re-canalisation efficace mais n'apportant aucun effet physiologique d'amélioration. Les phénomènes de mauvaise reperfusion impliquant des facteurs thrombotiques et des acteurs de l'inflammation jouent un rôle majeur dans la reperfusion futile. La cytokine IL-6 est associée à la gravité de l'AVC et augmentation des complications post-infarctus mais son rôle précis est encore faiblement documenté. Par ailleurs, la cinétique de libération d'IL-6 et son association avec la reperfusion futile ne sont pas décrites dans le cadre de la thrombectomie mécanique. L'objectif de cette étude, où j'ai réalisé les dosages des taux circulants d'IL-6, était donc d'évaluer si les taux circulants d'IL-6 pouvait améliorer la détection et la caractérisation de la reperfusion futile chez les patients.

Les résultats démontrent que des taux circulants élevés d'IL-6 à 24 heures étaient indépendamment associés à une reperfusion futile chez les patients présentant un AVC ischémique.

ARTICLE

Association of Interleukin-6 Levels and Futile Reperfusion After Mechanical Thrombectomy

Laura Mechtouff, MD, Thomas Bochaton, MD, PhD, Alexandre Paccalet, Claire Crola Da Silva, PhD, Marielle Buisson, PhD, Camille Amaz, Laurent Derex, MD, PhD, Elodie Ong, MD, Yves Berthezene, MD, PhD, Omer Faruk Eker, MD, PhD, Nathalie Dufay, PhD, Nathan Mewton, MD, PhD, Michel Ovize, MD, PhD, Tae-Hee Cho, MD, PhD, and Norbert Nighoghossian, MD, PhD

Correspondence

Dr. Mechtouff
laura.mechtouff@chu-lyon.fr

Neurology® 2021;96:e752-e757. doi:10.1212/WNL.0000000000011268

Abstract

Objective

To assess whether interleukin-6 (IL-6) level is a marker of futile reperfusion in patients with acute ischemic stroke (AIS) with large vessel occlusion treated with mechanical thrombectomy (MT).

Methods

The Cohort of Patients to Identify Biological and Imaging Markers of Cardiovascular Outcomes in Stroke (HIBISCUS-STROKE) includes patients with AIS treated with MT after MRI. We performed a sequential assessment of IL-6 (admission, 6 hours, 24 hours, 48 hours and 3 months from admission). Among patients with successful reperfusion (Thrombolysis in Cerebral Infarction scale 2b/3), reperfusion was considered effective if 3-month modified Rankin Scale (mRS) score was 0 to 2 and futile if 3-month mRS score was 3 to 6. Our model was adjusted for the main confounding variables.

Results

One hundred sixty-four patients represent the study population. One hundred thirty-three patients had successful reperfusion (81.1%), while in 46 (34.6%), reperfusion was classified as futile. In single-variable analyses, high IL-6 levels at 6, 24, and 48 hours in combination with a higher age, a prestroke mRS score >2, a history of hypertension or diabetes, lack of current smoking, a higher baseline NIH Stroke Scale score, the absence of associated intravenous thrombolysis, an intracranial internal carotid artery or a tandem occlusion, and an increased infarct growth were associated with futile reperfusion. After multivariable analyses, a high IL-6 level at 24 hours (odds ratio 6.15, 95% confidence interval 1.71–22.10) remained associated with futile reperfusion.

Conclusions

IL-6 is a marker of futile reperfusion in the setting of MT.

From the Stroke Center (L.M., L.D., E.O., T.-H.C., N.N.), Cardiac Intensive Care Unit (T.B.), Clinical Investigation Center (M.B., C.A., N.M., M.O.), INSERM 1407, Neuroradiology Department (Y.B., O.F.E.), and NeuroBioTec (N.D.), CRB, Hospices Civils de Lyon; and INSERM U1060 (L.M., T.B., A.P., C.C.D.S., E.O., M.O., T.-H.C., N.N.), CarMeN Laboratory, and CREATIS (Y.B.), CNRS UMR 5220, INSERM U1044, University Lyon 1, France.

Go to [Neurology.org/N](https://www.neurology.org/N) for full disclosures. Funding information and disclosures deemed relevant by the authors, if any, are provided at the end of the article.

e752 Copyright © 2020 American Academy of Neurology

Copyright © 2020 American Academy of Neurology. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Glossary

AIS = acute ischemic stroke; **CI** = confidence interval; **FLAIR** = fluid-attenuated inversion recovery; **HIBISCUS-STROKE** = Cohort of Patients to Identify Biological and Imaging Markers of Cardiovascular Outcomes in Stroke; **hsCRP** = high-sensitivity C-reactive protein; **ICA** = internal carotid artery; **IL-6** = interleukin-6; **LVO** = large vessel occlusion; **mRS** = modified Rankin Scale; **MT** = mechanical thrombectomy; **NIHSS** = NIH Stroke Scale; **OR** = odds ratio; **TICI** = Thrombolysis in Cerebral Infarction; **WBC** = white blood cell.

The rate of futile reperfusion after mechanical thrombectomy (MT) for acute ischemic stroke (AIS) with large vessel occlusion (LVO) would be $\approx 54\%$.¹ The no-reflow phenomenon involving both thrombotic and inflammatory pathways contributes to futile reperfusion.^{2,3} Interleukin-6 (IL-6) plays a key role in this process.⁴ Consistently, several observational studies have shown a relationship between IL-6 levels and stroke severity and outcome, but its role in clinical practice remains controversial.⁵ However, the relationship between IL-6 and futile reperfusion remains undocumented in patients with AIS treated with MT. In this context, we assessed whether IL-6 level is a marker of futile reperfusion.

Methods

Study Population

The Cohort of Patients to Identify Biological and Imaging Markers of Cardiovascular Outcomes in Stroke (HIBISCUS-STROKE) is an ongoing cohort study that started in October 2016 and includes patients with AIS with LVO treated with MT after brain MRI assessment in the Lyon Stroke Center. Patients with known inflammatory disease, active malignancy, vasculitis, antibiotics at admission, myocardial infarction, or major surgery in the 30 previous days were excluded. Peripheral blood samples were collected from each patient at admission before IV thrombolysis administration and 6 hours, 24 hours, 48 hours, and 3 months from admission. A CT scan was performed at day 1 and a follow-up MRI at day 6.

Baseline data on demographic characteristics and medical history, including risk factors, were collected at admission. Baseline neurologic status was assessed by board-certified neurologists using NIH Stroke Scale (NIHSS) score. The modified Rankin Scale (mRS) score was assessed at 3 months during a face-to-face follow-up visit. Among patients with successful reperfusion defined as Thrombolysis in Cerebral Infarction (TICI) score $\geq 2b$, reperfusion was considered effective if 3-month mRS score was 0 to 2 and futile if 3-month mRS score was 3 to 6.

Standard Protocol Approvals, Registrations, and Patient Consents

The study was approved by the local ethics committee, and all participants or their relatives signed an informed consent form (Institutional Review Board No. 00009118).

Neuroimaging

All MRI studies were performed with 1.5T Intera or 3T Achieva scanners (Philips, Best, the Netherlands). The admission protocol included fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), T2 gradient echo, diffusion-weighted imaging, time-of-flight magnetic resonance angiography, and perfusion-weighted imaging. A CT scan was performed at day 1 to classify any hemorrhagic transformation according to the European Cooperative Acute Stroke Study II classification. A final MRI was performed at 1 month to map the final infarct on FLAIR. The follow-up MRI protocol at day 6 included a FLAIR sequence. A stroke neurologist with expertise in neuroradiology who was blinded to clinical data and follow-up independently reviewed MRI using a dedicated postprocessing workstation (3-dimensional slicer software). Alberta Stroke Program Early CT score and baseline volume on the diffusion-weighted imaging sequence and final volumes on the FLAIR sequence were measured. Infarct growth corresponds the difference between final and baseline volumes. Pre-treatment collateral status was categorized into poor (Higashida score 0–2) and good (Higashida score 3–4).

Blood Sampling Protocol

White blood cell (WBC) count and high-sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were routinely measured at admission. IL-6 was measured with an ELISA kit from Thermo Fisher Scientific (Invitrogen, Carlsbad, CA). Sensitivity was 2 pg/mL. Sera were stored at -80°C within a 3-hour delay at the NeuroBioTec biobank (CRB-HCL: BB-0033-00,046, France). All samples were thawed only once for study measurements.

Statistical Analysis

Descriptive statistics are presented as mean \pm SD or median (interquartile range) for continuous variables and as absolute number (percentages) for categorical variables. Correlations between IL-6 levels and MRI parameters were performed with the Spearman rank. Single-variable then multivariable logistic regression using a backward selection procedure with a p threshold of 0.20 was performed to assess independent markers of futile reperfusion among patients with successful reperfusion. Baseline covariates with a significant association with futile reperfusion in the single-variable model were included in the multivariable model along with other potential predictors independently of their p value in the single-variable model, selected a priori as age, baseline NIHSS score, and baseline lesion volume.^{6,7} Normality of distributions was assessed graphically and with the Shapiro-Wilk test. Because IL-6, hsCRP, and WBC did not have a normal distribution, we

Table 1 Characteristics of the Study Population

	No or Partial Reperfusion (n = 31)	Successful Reperfusion	
		Effective (n = 87)	Futile (n = 46)
Age, y	68 ± 17	66 ± 15	75 ± 13
Male	18 (58.1)	55 (63.2)	25 (54.4)
Prestroke mRS score >2	2 (6.5)	1 (1.2)	7 (15.2)
Hypertension	13 (41.9)	31 (35.6)	36 (78.3)
Diabetes	4 (12.9)	10 (11.5)	13 (28.3)
Hyperlipidemia	5 (16.1)	21 (24.1)	16 (34.8)
Current smoking	7 (22.6)	23 (26.4)	4 (8.7)
Baseline NIHSS score	15 (9–19)	14 (8–18)	17 (13–21)
SBP, mm Hg	139.1 ± 23.5	138.7 ± 20.5	144.8 ± 24.4
DBP, mm Hg	77.0 ± 15.2	78.6 ± 15.8	75.2 ± 20.9
Glucose level, mmol/L	6.8 (5.8–8.0)	6.0 (5.4–7.0)	6.8 (5.9–8.7)
WBC count at admission, 10 ⁹ /L ^a	8.7 (6.6–11.6)	8.4 (6.5–10.0)	8.1 (6.9–10.4)
hsCRP at admission, mg/L ^b	3 (1.7–8.2)	3.3 (1.4–7.7)	3.3 (1.9–9.7)
Etiology			
Cardioembolism	14 (45.2)	45 (51.7)	25 (54.4)
LAA	7 (22.6)	10 (11.5)	9 (19.6)
Other	4 (12.9)	9 (10.3)	4 (8.7)
Undetermined	6 (19.3)	23 (26.4)	8 (17.4)
IV thrombolysis	15 (48.4)	54 (62.1)	19 (41.3)
Thrombus location			
M1 MCA segment	24 (77.4)	68 (78.2)	39 (84.8)
M2 MCA segment	7 (22.6)	20 (23.0)	5 (10.9)
Intracranial ICA	9 (29.0)	21 (24.1)	23 (50.0)
Tandem occlusion	6 (19.4)	15 (17.2)	17 (37.0)
ASPECT score	7 (5–8)	7 (7–9)	7 (5–8)
Baseline lesion volume, cm ^{3c}	23.3 (11.7–48.5)	13.2 (4.1–30.2)	23.1 (10.4–54.3)
Poor collaterals ^d	14 (58.3)	26 (38.2)	11 (36.7)
Onset to groin puncture, min	307 (175–540)	187 (146–301)	246 (176–382)
Onset to reperfusion, min ^e	377 (276–1,035)	238 (184–352)	285 (208–467)
Final lesion volume, mL ^f	49.5 (20.7–150.3)	13.7 (4.7–37.6)	41.5 (16.3–76.2)
Infarct growth, mL ^f	20.4 (2.9–98.1)	1.0 (–4.4 to 6.2)	12.7 (–0.1 to 35.5)
Any hemorrhagic transformation	12/30 (25.5)	18/85 (21.2)	17/45 (37.8)
PH type 1 or 2	1/30 (3.3)	1/85 (1.2)	3/45 (6.7)
SAH	1/30 (3.3)	2/85 (2.4)	2/45 (4.4)
IL-6 level at admission, pg/mL ^g	1.3 (0.3–3.6)	1.3 (0.7–3.4)	2.0 (0.7–4.5)
High IL-6 level at admission	13/28 (46.4)	37/78 (47.4)	25/43 (58.1)
IL-6 level at 6 h, pg/mL ^h	3.1 (2.0–6.0)	2.1 (1.1–4.4)	3.3 (2.2–6.2)

Continued

Table 1 Characteristics of the Study Population (continued)

	No or Partial Reperfusion (n = 31)	Successful Reperfusion	
		Effective (n = 87)	Futile (n = 46)
High IL-6 level at 6 h	13/25 (52.0)	34/82 (41.5)	26/40 (65.0)
IL-6 level at 24 h, pg/mL ⁱ	5.0 (3.3–7.3)	2.7 (1.7–5.5)	4.3 (2.6–9.0)
High IL-6 level at 24 h	20/28 (71.4)	30/81 (37.0)	26/43 (60.5)
IL-6 level at 48 h, pg/mL ^j	5.2 (2.9–15.9)	2.5 (1.2–5.2)	5.3 (2.5–8.2)
High IL-6 level at 48 h	19/28 (67.9)	28/81 (34.6)	28/42 (66.7)
IL-6 level at 3 mo, pg/mL ^k	1.2 (0.3–2.0)	0.6 (0.3–1.1)	1.0 (0.4–2.6)
High IL-6 level at 3 mo	12/20 (60.0)	29/70 (41.4)	17/26 (65.4)

Abbreviations: ASPECT = Alberta Stroke Program Early CT; DBP = diastolic blood pressure; hsCRP = high-sensitivity C-reactive protein; ICA = internal carotid artery; IL-6 = interleukine-6; LAA = large artery atherosclerosis; MCA = middle-cerebral-artery segment; mRS = modified Rankin scale; NIHSS = NIH Stroke Scale; PH = parenchymal hematoma; SAH = subarachnoid hemorrhage; SBP = systolic blood pressure; WBC = white blood cell. Variables are displayed as absolute number/total number (percentage), mean \pm SD, or median (25th–75th percentiles) as appropriate.

^a Eleven patients missing data.

^b Fourteen patients missing data.

^c Nineteen patients missing data.

^d Forty-two patients missing data.

^e Three patients with available data in the group with no or partial reperfusion.

^f Thirty-seven patients missing data.

^g Fifteen patients missing data.

^h Seventeen patients missing data.

ⁱ Twelve patients missing data.

^j Thirteen patient missing data.

^k Forty-eight patients missing data.

dichotomized them according to their median. To prevent expected collinearity between intracranial internal carotid artery (ICA) and tandem occlusion and between baseline lesion volume and infarct growth, only intracranial ICA occlusion and infarct growth were entered into the multivariable analysis. We performed receiver operating curves for the prediction of futile reperfusion in the clinoradiologic model that included potential predictors independently of their *p* value in the single-variable model, selected a priori (age, baseline NIHSS score, and baseline lesion volume) with and without IL-6 level at 24 hours, and compared the 2 areas under the curve using the DeLong test. We performed a sensitivity analysis using imputation methods of missing data: last and next method for IL-6 level at 24 hours and last observation carried forward for final lesion volume when data were available; otherwise, we used the median. The data were analyzed with Stata version 15 (Stata-Corp, College Station, TX).

Data Availability

Further anonymized data can be made available to qualified investigators on request to the corresponding author.

Results

Study Population

A total of 643 consecutive patients with AIS were treated with MT in our institution from October 2016 to April 2019. Among them, 138 patients with CT at admission, 46 with posterior circulation stroke, 241 without scheduled follow-up

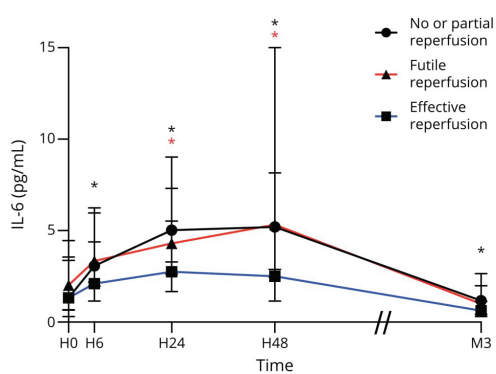
visit in our stroke center (secondary transfers from primary stroke center), 34 without informed consent, and 9 without available blood samples were excluded. Of the remaining 175 patients included in the HIBISCUS-STROKE cohort, 11 were excluded due to active disease resulting in systemic inflammation. The remaining 164 patients represent the study population. Excluded patients were less likely to be male (223 [46.5%] vs 98 [59.8%]), had a higher baseline NIHSS score (17 [12–21] vs 15 [9–19]), and were less likely to have an M1 segment middle cerebral artery occlusion (336 [70.1%] vs 131 [79.9%]). Mean age was 69 \pm 15 years. Median baseline NIHSS score was 15 (9–19). Successful reperfusion was obtained in 133 patients (81.1%); of them, 46 (34.6%) showed a futile reperfusion. No patient was lost at the 3-month follow-up. The main characteristics of the study population are shown in table 1.

IL-6 Levels in the Whole Study Population

IL-6 levels were significantly lower in patients with effective reperfusion compared to patients with futile and no or partial reperfusion at several time points. Kinetics of IL-6 in different subgroups are presented in the figure.

IL-6 levels did not correlate with baseline MRI parameters. In contrast, we found a slight but significant correlation between IL-6 levels at 48 hours and infarct growth ($p = 0.22$). No association was found between IL-6 levels at admission and collateral status (odds ratio [OR] 0.82, 95% confidence interval [CI] 0.39–1.74).

Figure Kinetics of IL-6



H0 = admission; H6 = hour 6; H24 = hour 24; H48 = hour 48; IL-6 = interleukin-6; M3 = month 3. * $p < 0.05$ when testing effective reperfusion vs futile reperfusion; * $p < 0.05$ when testing effective reperfusion vs no or partial reperfusion.

Factors Associated With Futile Reperfusion

Single-variable analyses showed that high IL-6 levels at 6 (OR 2.49, 95% CI 1.14–5.46) and 24 and 48 hours (OR 3.24, 95% CI 1.47–7.15) were associated with futile reperfusion in combination with a higher age, a prestroke mRS score >2 , a history of hypertension or diabetes, lack of current smoking, a higher baseline NIHSS score, the absence of associated IV thrombolysis, and an intracranial ICA or tandem occlusion (table 2). WBC count (OR 0.77, 95% CI 0.36–1.62) and hsCRP level (OR 1.03, 95% CI 0.48–2.19) at admission were not associated with futile reperfusion. We did not find any association between poor collateral status and futile reperfusion (OR 1.07, 95% CI 0.44–2.60). Among follow-up imaging data, an increased infarct growth was significantly associated with futile reperfusion.

The multivariable analysis confirmed that high IL-6 levels at 6 (OR 3.06, 95% CI 0.88–10.61) and 24 and 48 hours (OR 3.38, 95% CI 1.05–10.89) were associated with futile reperfusion together with a history of hypertension, a higher baseline NIHSS score, the absence of associated IV thrombolysis, and an increased infarct growth (table 2). The addition of IL-6 level at 24 hours to the clinicoradiologic model resulted in a slight but nonsignificant improvement in discriminatory accuracy for distinguishing futile from effective reperfusion (area under the curve 0.78 vs 0.72).

Sensitivity Analysis

The same covariates were retained in the multivariable model when an upward selection ($p < 0.5$) was used as an alternative variable selection procedure. After imputation of missing data, a high IL-6 level at 24 hours remained associated with futile reperfusion (OR 4.47, 95% CI 1.69–11.84).

Table 2 Factors Associated With Futile Recanalization in Single-Variable and Multivariable Analyses

	Single-Variable Analyses Crude OR (95% CI)	Multivariable Analysis Adjusted OR (95% CI)
High vs low IL-6 level at H24	3.01 (1.39–6.55)	6.15 (1.71–22.10)
Age ^a	1.54 (1.17–2.03)	—
Prestroke mRS score >2	15.44 (1.84–129.78)	—
Hypertension	6.50 (2.85–14.86)	7.99 (2.03–31.42)
Diabetes	3.03 (1.21–7.61)	—
Current smoking	0.27 (0.09–0.82)	—
Baseline NIHSS score ^b	1.10 (1.03–1.17)	1.12 (1.02–1.24)
IV thrombolysis	0.43 (0.21–0.89)	0.21 (0.06–0.77)
Intracranial ICA occlusion	3.14 (1.47–6.71)	2.77 (0.76–10.11)
Tandem occlusion	2.81 (1.24–6.37)	—
Infarct growth ^c	3.79 (1.25–11.47)	7.24 (1.28–41.08)

Abbreviations: CI = confidence interval; H24 = hour 24; ICA = internal carotid artery; IL-6 = interleukin-6; NIHSS = NIH Stroke Scale; OR = odds ratio. Model was adjusted for age, NIHSS score, hypertension, IV thrombolysis, intracranial ICA occlusion, and infarct growth (prestroke modified Rankin Scale score, diabetes, and current smoking were not retained by the backward procedure).
^a Per 10-year increase.
^b Per 1-unit increase.
^c Per a log + 1 increase.

Discussion

In our study, early high levels of IL-6 were independently associated with futile reperfusion in patients with AIS with LVO treated with MT. In this context, IL-6 seems a key factor of thromboinflammation and infarct growth.^{2,3,8}

A single study conducted in the setting of MT showed that IL-6 levels were not independently associated with poor outcome, defined as a 3-month mRS score of 5 to 6, in 41 patients with AIS involving anterior or posterior circulation, without adjustment for reperfusion status.⁹

The relationship between IL-6 levels and futile reperfusion does not necessarily imply a causal relationship. IL-6 may merely reflect ischemic core progression regardless of reperfusion status. Nevertheless, IL-6 may also contribute to infarct growth as reported with other systemic markers in the context of thrombectomy.^{4,6,10}

The major strength of our study lies in the sequential assessment of IL-6 coupled with MRI data within a homogeneous cohort of patients with AIS with LVO in the context of MT. We acknowledge some limitations. First, due to restrictive inclusion criteria, only one-quarter of patients treated

with MT in our institution were included, and they differed from excluded patients in terms of sex, baseline NIHSS score, and thrombus location, which may limit generalization. A propensity-weighted analysis would have been relevant as an additional sensitivity analysis, but the variables of interest (IL-6 levels and 3-month mRS score) were not collected in excluded patients. Second, the limited sample size and the subsequent limited precision with which the identified association is estimated call for further studies. In addition, the lack of follow-up vascular imaging may prevent the assessment of arterial reocclusion and downstream embolization after the index event, which may distort the true incidence of futile reperfusion.

We found that high IL-6 levels at 24 hours were associated with futile reperfusion in patients with AIS with LVO treated with MT.

Study Funding

Supported by the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) of Université Claude Bernard Lyon-1 within the Investissements d'Avenir program operated by the French National Research Agency and the CASDEN prize from CASDEN/Fondation de l'Avenir awarded to Laura Mechtouff.

Disclosure

The authors report no disclosures relevant to the manuscript. Go to Neurology.org/N for full disclosures.

Publication History

Received by *Neurology* February 19, 2020. Accepted in final form September 25, 2020.

Appendix Authors

Name	Location	Contribution
Laura Mechtouff, MD	Hospices Civils de Lyon, France, Université Lyon1, France	Major role in the acquisition of data, analysis of the data, statistical analysis, drafting the manuscript for intellectual content
Thomas Bochaton, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Major role in the acquisition of data, analysis of the data, drafting the manuscript for intellectual content
Alexandre Paccalet	Université Lyon1, France	Major role in the acquisition of data, revised the manuscript for intellectual content
Claire Crola-Da-Silva, PhD	Université Lyon1, France	Major role in the acquisition of data, revised the manuscript for intellectual content
Marielle Buisson, PharmD	Hospices Civils de Lyon, France	Major role in the acquisition of data, analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content

Appendix (continued)

Name	Location	Contribution
Camille Amaz	Hospices Civils de Lyon, France	Analysis of the data, statistical analysis, revised the manuscript for intellectual content
Laurent Derex, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, France	Major role in the acquisition of data
Elodie Ong, MD	Hospices Civils de Lyon, France	Major role in the acquisition of data
Yves Berthezene, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Major role in the acquisition of data, revised the manuscript for intellectual content
Omer Faruk Eker, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Major role in the acquisition of data
Nathalie Dufay, PhD	Hospices Civils de Lyon, France	Major role in the acquisition of data
Nathan Mewton, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, France	Design of the study, revised the manuscript for intellectual content
Tae-Hee Cho, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Major role in the acquisition of data, analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content
Michel Ovize, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Design of the study, revised the manuscript for intellectual content
Norbert Nighoghossian, MD, PhD	Hospices Civils de Lyon, Université Lyon1, France	Design of the study, major role in the acquisition of data, drafting the manuscript for intellectual content

References

- Goyal M, Menon BK, van Zwam WH, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet* 2016;387:1723–1731.
- De Meyer SF, Denorme F, Langhauser F, Geuss E, Fluri F, Kleinschnitz C. Thromboinflammation in stroke brain damage. *Stroke* 2016;47:1165–1172.
- Stoll G, Nieswandt B. Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke: implications for treatment. *Nat Rev Neurol* 2019;15:473–481.
- Tang YH, Vital S, Russell J, Seifert H, Neil Granger D. Interleukin-6 mediates enhanced thrombus development in cerebral arterioles following a brief period of focal brain ischemia. *Exp Neurol* 2015;271:351–357.
- Bustamante A, Sobrino T, Giralt D, et al. Prognostic value of blood interleukin-6 in the prediction of functional outcome after stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Neuroimmunol* 2014;274:215–224.
- Boisseau W, Desilles J-P, Fahed R, et al. Neutrophil count predicts poor outcome despite recanalization after endovascular therapy. *Neurology* 2019;93:e467–e475.
- Shi Z-S, Liebeskind DS, Xiang B, et al. Predictors of functional dependence despite successful revascularization in large-vessel occlusion strokes. *Stroke* 2014;45:1977–1984.
- Clark WM, Lutsep HL. Potential of anticytokine therapies in central nervous system ischaemia. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1:227–237.
- Schuppner R, Dirks M, Grosse G, et al. ADAMTS-13 activity predicts outcome in acute ischaemic stroke patients undergoing endovascular treatment. *Thromb Haemostasis* 2018;47:758–767.
- Bustamante A, Ning M, Garcia-Berrococo T, et al. Usefulness of ADAMTS13 to predict response to recanalization therapies in acute ischemic stroke. *Neurology* 2018;90:e995–e1004.

2.2. Matrix Metalloproteinase-9 Relationship with Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation in the Era of Thrombectomy.

a) Introduction

La protéine matrix metalloproteinase 9 (MMP9) est une protéine qui joue un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire et dans la protéolyse des jonctions serrées. De par ses actions, elle favorise la perméabilité de la barrière hémato encéphalique³⁰⁹. Son taux circulant est massivement augmenté dans la phase précoce de l'infarctus cérébral³¹⁰. Son association avec la croissance des lésions et la transformation hémorragique a été étudié avec des résultats similaires dans différentes études dans le cadre de la thrombolyse intraveineuse^{311,312}. En revanche, son rôle sur la croissance hémorragique et la croissance des lésions n'a pas été étudié dans le cadre de la thrombectomie mécanique. Ainsi, l'objectif de cette étude était de décrire la cinétique de libération de MMP9 et d'évaluer sa corrélation avec la croissance des lésions et la transformation hémorragique évaluées par imagerie. Le taux circulant de MMP9 atteint son pic à H6 chez les patients ayant bénéficiés d'une reperfusion par thrombectomie. Ce taux circulant à H6 est associé à la croissance des lésions et la transformation hémorragique qui restent cependant mineure dans le cadre de la thrombectomie mécanique.

Dans cette étude, j'ai réalisé les dosages des taux circulants de MMP9.



Matrix Metalloproteinase-9 Relationship With Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation in the Era of Thrombectomy

Laura Mechtouff^{1,2*}, Thomas Bochaton^{2,3}, Alexandre Paccalet², Claire Crola Da Silva², Marielle Buisson⁴, Camille Amaz⁴, Morgane Bouin⁵, Laurent Derex¹, Elodie Ong^{1,2}, Yves Berthezene^{6,7}, Omer Faruk Eker⁶, Nathalie Dufay⁸, Nathan Mewton⁴, Michel Ovize^{2,4}, Norbert Nighoghossian^{1,2} and Tae-Hee Cho^{1,2}

¹ Stroke Department, Pierre Wertheimer Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ² CarMeN, INSERM U.1060/Université Lyon1/INRA U. 1397/INSA Lyon/Hospices Civils Lyon, Université de Lyon, Lyon, France, ³ Cardiac Intensive Care Unit, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ⁴ Clinical Investigation Center, INSERM 1407, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ⁵ Cellule Recherche Imagerie, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ⁶ Neurology Department, Pierre Wertheimer Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France, ⁷ CREATIS, CNRS UMR 5220, INSERM U1044, University Lyon 1, Lyon, France, ⁸ NeuroBioTec, CRB, Pierre Wertheimer Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Laszlo Csiba,
University of Debrecen, Hungary

Reviewed by:

Amir Shaban,
University of Iowa Hospitals and
Clinics, United States
Georgios Tsvigoulis,
National and Kapodistrian University
of Athens, Greece

*Correspondence:

Laura Mechtouff
laura.mechtouff@chu-lyon.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Stroke,
a section of the journal
Frontiers in Neurology

Received: 14 February 2020

Accepted: 30 April 2020

Published: 09 June 2020

Citation:

Mechtouff L, Bochaton T, Paccalet A, Crola Da Silva C, Buisson M, Amaz C, Bouin M, Derex L, Ong E, Berthezene Y, Eker OF, Dufay N, Mewton N, Ovize M, Nighoghossian N and Cho T-H (2020) Matrix Metalloproteinase-9 Relationship With Infarct Growth and Hemorrhagic Transformation in the Era of Thrombectomy. *Front. Neurol.* 11:473. doi: 10.3389/fneur.2020.00473

Objective: To assess the relationship between matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), a proteolytic enzyme involved in the breakdown of the blood-brain barrier, and infarct growth and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke (AIS) with large vessel occlusion (LVO) in the era of mechanical thrombectomy (MT) using the kinetics of MMP-9 and sequential magnetic resonance imaging (MRI).

Methods: HIBISCUS-STROKE is a cohort study including AIS patients with LVO treated with MT following admission MRI. Patients underwent sequential assessment of MMP-9, follow-up CT at day 1, and MRI at day 6. The CT scan at day 1 classified any hemorrhagic transformation according to the European Co-operative Acute Stroke Study-II (ECASS II) classification. Infarct growth was defined as the difference between final Fluid-Attenuated Inversion Recovery volume and baseline diffusion-weighted imaging volume. Conditional logistic regression analyses were adjusted for main confounding variables including reperfusion status.

Results: One hundred and forty-eight patients represent the study population. A high MMP-9 level at 6 h from admission (H6) ($p = 0.02$), a high glucose level ($p = 0.01$), a high temperature ($p = 0.04$), and lack of reperfusion ($p = 0.02$) were associated with infarct growth. A high MMP-9 level at H6 ($p = 0.03$), a high glucose level ($p = 0.03$) and a long delay from symptom onset to groin puncture ($p = 0.01$) were associated with hemorrhagic transformation.

Conclusions: In this MT cohort study, MMP-9 level at H6 predicts infarct growth and hemorrhagic transformation.

Keywords: stroke, matrix metalloproteinase 9, MRI, thrombectomy, thrombolytic therapy

INTRODUCTION

Ischemia-reperfusion injury in stroke is defined as a biochemical cascade causing a deterioration of ischemic brain tissue that parallels and antagonizes the beneficial effect of reperfusion (1). A key feature of this process is the proteolytic breakdown of the blood-brain barrier (BBB) vasculature. The increase of BBB permeability is mediated by activation of matrix metalloproteinase (MMP), and especially MMP-9 (2, 3).

So far, the importance of MMP-9 on infarct growth and risk of hemorrhagic transformation has not been explored in relation to mechanical thrombectomy (MT). In the context of intravenous (IV) thrombolysis, early increase of MMP-9 expression may promote hemorrhagic transformation but also infarct growth with subsequent influence on neurological disability (4–12). Since restoration of the blood supply following MT might be more abrupt and potentially cause greater BBB damage despite a timely and successful reperfusion, an appropriate assessment of MMP-9 activity in this setting may provide additional insight into reperfusion injury related to MT (13). We sought to determine whether early MMP-9 level is associated with infarct growth and hemorrhagic transformation. For this purpose, a sequential assessment of MMP-9 and ischemic damage using MRI was implemented in the setting of MT.

METHODS

Study Population

HIBISCUS-STROKE is an ongoing cohort study including all patients admitted since October 2016 in the Lyon Stroke Department for an acute ischemic stroke (AIS) with large vessel occlusion (LVO) treated either within 0–6 h or 6–24 h time window with MT following brain magnetic resonance imaging (MRI) assessment. Patients with Computed-Tomography at admission, with posterior circulation stroke, without follow-up planned in our institution (secondary transfers to primary stroke center), without informed consent and without available blood samples were excluded from the HIBISCUS-STROKE cohort. Among patients included in the HIBISCUS-STROKE cohort, those with known inflammatory disease, active malignancy, vasculitis, antibiotics at admission, myocardial infarction, or major surgery in the 30 previous days were excluded in order not to skew the results of the biomarkers analysis. All patients underwent a sequential assessment of systemic MMP-9 level. Peripheral blood samples were collected from each patient: at admission (H0), 6 h (H6), 24 h (H24), and 48 h (H48) from admission. A CT scan was performed at day 1 in order to rule out any hemorrhagic transformation. Final infarct size was assessed on follow-up MRI at day 6 (Figure 1).

Baseline data on demographic characteristics, lifestyle risk factors, medical history, and use of medications were collected at hospital admission. Neurological status was assessed by board certified neurologists using National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) score at admission, and the modified rankin scale (mRS) score at 3 months during a face-to-face follow-up visit. Poor outcome was defined as 3-month mRS score > 2. Stroke

subtype was classified according to the Trial of Org 10,172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria (14).

The study was approved by the local ethics committee and all subjects or their relatives signed an informed consent form.

Neuroimaging

All MRIs were performed with 1.5-Tesla Intera or 3-Tesla Achieva scanners (Philips, Best, Netherlands). The admission MRI protocol included fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), T2-gradient echo, diffusion-weighted imaging (DWI), time-of-flight MRA, and perfusion-weighted imaging. The CT scan at day 1 classified any hemorrhagic transformation according to the European Co-operative Acute Stroke Study-II (ECASS II) classification (15). The follow-up MRI protocol at day 6 included FLAIR sequence. A stroke neurologist (T-H. C.) with expertise in neuroradiology, blinded to clinical and laboratory data, independently reviewed both admission and follow-up MRI using a dedicated post-processing work station (3D slicer software). The acute ischemic lesion was segmented from the baseline DWI with a semi-automated method (3D Slicer: <https://www.slicer.org/>) by using both a validated ADC threshold ($ADC < 620 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$) and visual assessment of b1000 images. The final infarct was identified on day-6 FLAIR images using 3D Slicer. Lesion volumes were subsequently calculated from the segmentation masks. Infarct growth was defined as the difference between final volume on the FLAIR-sequence and baseline volume on the DWI-sequence. Alberta Stroke Program Early CT score (ASPECTS) was measured on baseline DWI (16). Successful reperfusion was defined as thrombolysis in cerebral infarction score (TICI) $\geq 2b$ (17).

Blood Sampling Protocol

White blood cells (WBC) count and high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were routinely measured at admission. MMP-9 level was measured using DuoSet[®] ELISA Development Kits (R&D Systems). Sera were prepared and stored at -80°C within a 3 h delay at the NeuroBioTec biobank (CRB-HCL: BB-0033-00046, France). All samples were thawed only once for study measurements. Serum samples were diluted at 1/2,000. Sensitivity was 12.2 pg/mL.

Statistical Analysis

Continuous variables are expressed as means (standard deviation [SD]) or medians (interquartile range [IQR]), and categorical variables as percentages. Medians were compared using the Mann–Whitney or Kruskal–Wallis test for independent samples. The Wilcoxon signed rank test was performed for matched samples. Percentages were compared using the Fishers exact test. Spearman correlation coefficients (r) were calculated between variables. Analyses were focused on the early MMP-9 peak at H6. Normality of distributions was assessed graphically and with the Shapiro–Wilk test. As MMP-9, infarct growth, WBC count, and hsCRP were not normally distributed, we dichotomized them according to their median. The association between MMP-9 level at H6 and infarct growth and hemorrhagic transformation was measured by calculating crude odds ratios (ORs) and 95% CIs using conditional logistic regression analyses. A multiple logistic

regression model was performed to detect independent markers of infarct growth or any hemorrhagic transformation. Covariates with a significant univariate association with infarct growth or hemorrhagic transformation were included in each multivariate model along with other potential predictors independent of their univariate *p*-value, selected a priori. A backward selection procedure was chosen. The models were adjusted for:

- infarct growth: age, sex, glucose level, temperature, baseline volume on the DWI-sequence, stroke onset to groin puncture time, IV thrombolysis, and reperfusion status (NIHSS score and systolic blood pressure not retained by the backward selection),
- hemorrhagic transformation: sex, glucose level, stroke onset to groin puncture time, IV thrombolysis, and baseline volume on the DWI-sequence (age, NIHSS score, and systolic blood pressure not retained by the backward selection).

Two-tailed *p* < 0.05 was considered to be statistically significant. The data were analyzed with Stata Version 15™ (STATA CORP, COLLEGE STATION, TEXAS 77845 USA).

Data Availability Statement

Further anonymized data can be made available to qualified investigators on request to the corresponding author.

RESULTS

HIBISCUS-STROKE Cohort

Between October 2016 to April 2019, 148 patients met the inclusion criteria (Figure 1). Baseline and follow-up MRI were available and interpretable for 127 (77.4%) patients. The main clinical and imaging characteristics are shown in Table 1. Mean age was 69 ± 15. Sixty percent of patients were men. Median NIHSS score on admission was 15 [9–19]. Median infarct growth was 3.4 cc [–1.3 to 24.6]. Hemorrhagic transformation occurred in 40 patients (27.6%). Ninety-one (61.5%) patients had a good outcome (mRS score 0–2) at 3 months. No patient was lost at the 3-month follow-up.

In our population, MMP-9 levels peaked early at 6 h from admission (*p* = 0.04; Figure 2).

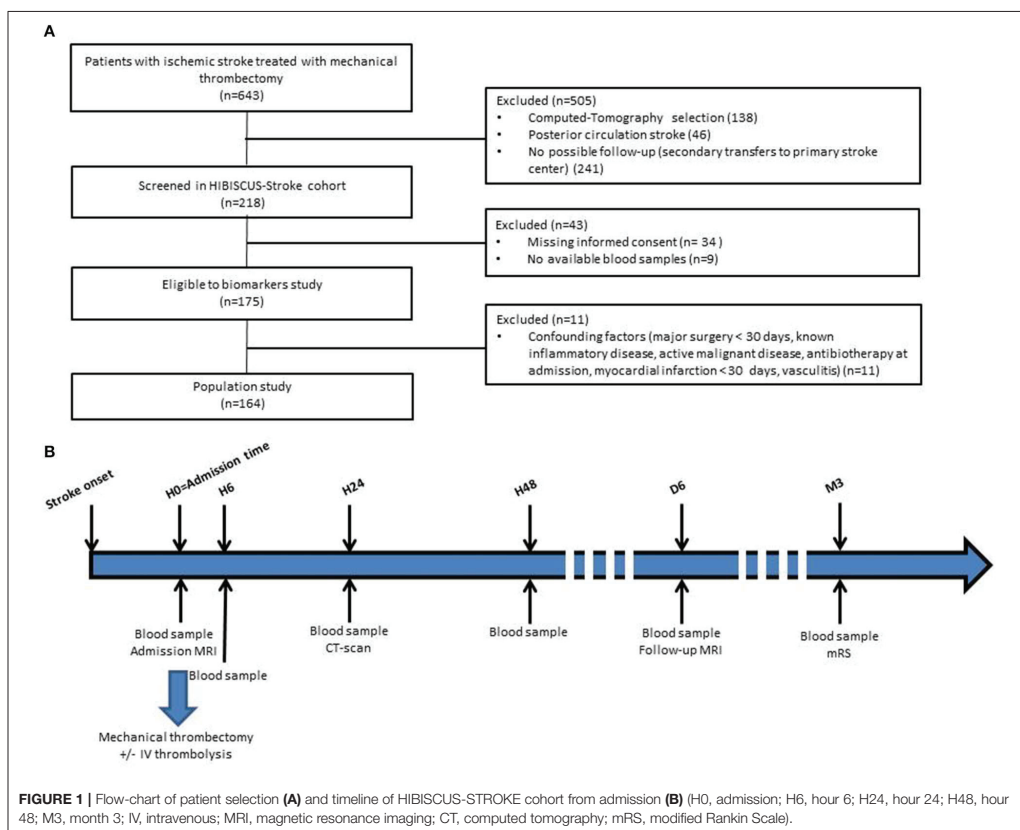


TABLE 1 | Characteristics of the study population.

	MMP-9 level at H6			p-value
	All (n = 148)	Low-level (MMP-9 H6 ≤ 775 ng/mL) (n = 74)	High-level (MMP-9 H6 > 775 ng/mL) (n = 74)	
Age, years	69 ± 15	70 ± 14	67 ± 16	0.15
Male, n (%)	89 (60.1)	46 (62.2)	43 (58.1)	0.74
Prestroke mRS score > 2	8 (5.4)	3 (4.1)	5 (6.8)	0.72
Hypertension	69 (46.6)	37 [50]	32 [43.2]	0.51
Diabetes	25 (16.9)	11 [14.9]	14 [18.9]	0.66
Hyperlipidemia	38 (25.7)	20 [27]	18 [24.3]	0.71
Current smoking	29 (19.6)	12 [16.2]	17 [23.0]	0.41
Baseline NIHSS score	15 [9–19]	13 [7–19]	16 [12–19]	0.05
SBP, mmHg	140.1 ± 22.2	141.9 ± 23.8	138.3 ± 20.6	0.39
DBP, mmHg	77.6 ± 17.4	78.0 ± 18.4	77.2 ± 16.6	0.91
Baseline temperature	36.5 ± 0.6	36.5 ± 0.5	36.5 ± 0.7	0.46
Glucose level, mmol/L	6.27 [5.61–7.59]	6.00 [5.56–6.99]	6.44 [5.78–7.92]	0.28
hsCRP at admission, mg/L	3.3 [1.6–7.8]	3 [1.3–5.9]	3.5 [1.8–11.4]	0.13
WBC count at admission, 10 ⁹ /L	8.3 [6.6–10.0]	7 [5.9–9.0]	9.2 [8.0–11.1]	<0.01
Etiology				0.25
Cardioembolism	79 (53.4)	39 (52.7)	39 (52.7)	
LAA	24 (16.2)	9 (12.2)	12 (16.2)	
Other	16 (10.8)	11 (14.9)	4 (5.4)	
Undetermined	29 (19.6)	15 (20.3)	19 (25.7)	
IV thrombolysis	78 (52.7)	37 (50)	41 (55.4)	0.62
Thrombus location				
M1 MCA segment	118 (79.7)	57 (75.7)	62 (83.8)	0.31
M2 MCA segment	28 (18.9)	17 (23.0)	11 (14.9)	0.29
Intracranial ICA	44 (29.7)	21 (28.4)	23 (31.1)	0.86
Tandem occlusion	30 (20.3)	15 (20.3)	15 (20.3)	1
ASPECTS	7 [6–8]	8 [6–9]	7 [6–8]	0.13
DWI lesion volume, cc	17.4 [5.7–44.2]	13.3 [4.9–34.8]	23.0 [8.0–46.2]	0.18
Reperfusion (TICI2b–3)	123 (83.1)	63 (85.1)	60 (81.1)	0.66
Onset to admission, min	117 [70–282]	124 [73–302]	115 [70–245]	0.72
Onset to groin puncture, min	222 [155–373]	230 [156–403]	218 [155–320]	0.57
Onset to reperfusion, min	255 [195–378]	256 [195–414]	247 [195–358]	0.67
FLAIR lesion volume, cc	26.1 [7.8–61.1]	16.7 [5.1–41.4]	38.7 [13.6–85.7]	0.01
Infarct growth, cc	3.3 [–1.3 to 22.7]	0.8 [–4.4 to 14.8]	4.9 [0.5 to 36.2]	0.02

(Continued)

TABLE 1 | Continued

	MMP-9 level at H6			p-value
	All (n = 148)	Low-level (MMP-9 H6 ≤ 775 ng/mL) (n = 74)	High-level (MMP-9 H6 > 775 ng/mL) (n = 74)	
Any hemorrhagic transformation	40 (27.6)	14 (18.9)	26 (36.6)	0.03
PH type 1 or 2	3 (2.1)	2 (2.7)	1 (1.4)	1
SAH	4 (2.8)	1 (1.4)	3 (4.2)	0.36
mRS score 0–2	91 (61.5)	46 (62.2)	45 (60.8)	1

MMP-9, matrix metalloproteinase 9; H6, hour 6; NIHSS, National Institute of Health Stroke Score; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; hsCRP, High sensitivity C-reactive protein; WBC, white blood cells; LAA, Large-artery atherosclerosis; IV, intravenous; mRS, modified rankin scale; MCA, middle-cerebral-artery segment; ICA, intracranial carotid artery; ASPECTS, Alberta Stroke Program Early CT score; DWI, diffusion-weighted sequence; TICI, thrombolysis in cerebral infarction score; FLAIR, Fluid Attenuated Inversion Recovery; PH, Parenchymal hematoma; SAH, Subarachnoid hemorrhage. Variables are displayed as absolute number (percentage of column total); mean ± SD; or median (25th–75th percentiles) as appropriate. Significant values are shown in bold.

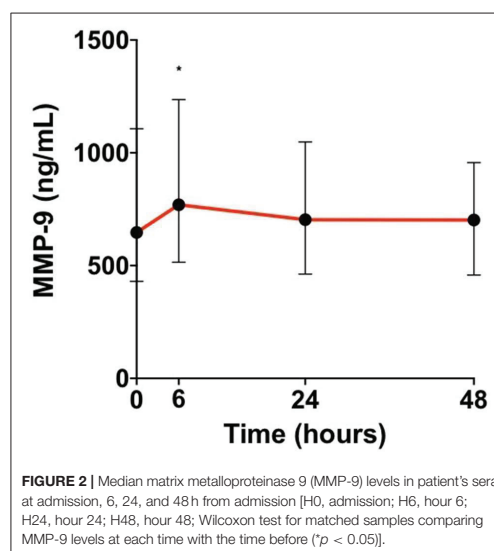


FIGURE 2 | Median matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) levels in patient's sera at admission, 6, 24, and 48 h from admission [H0, admission; H6, hour 6; H24, hour 24; H48, hour 48; Wilcoxon test for matched samples comparing MMP-9 levels at each time with the time before (**p* < 0.05)].

MMP-9 and Infarct Growth

In univariate analyses, a high glucose level [OR = 1.25 (1.02–1.54); *p* = 0.03], a long delay from symptom onset to groin puncture [OR = 1.05 (1.00–1.11) per 30 min increase; *p* = 0.04], lack of IV thrombolysis [OR = 0.42 (0.20–0.88); *p* = 0.02] and lack of reperfusion [OR = 0.27 (0.09–0.79); *p* = 0.02] were associated with infarct growth. A high WBC count [OR = 1.30 (0.53–3.17); *p* = 0.56] and a high hsCRP level [OR = 0.69

(0.28–1.69); $p = 0.42$] at admission were not associated with infarct growth. After adjustment for main confounding variables, a high MMP-9 level at H6 [3.43 (1.23–9.55); $p = 0.02$], a high glucose level [1.43 (1.08–1.90); $p = 0.01$], a high temperature [2.55 (1.03–6.29); $p = 0.04$], and lack of reperfusion [0.16 (0.03–0.77); $p = 0.02$] were independently associated with infarct growth (Table 2).

MMP-9 and Hemorrhagic Transformation

A high MMP-9 level at H6 [OR = 2.48 (1.16–5.27); $p = 0.02$] was associated with hemorrhagic transformation. A high WBC count [OR = 1.96 (0.91–4.25); $p = 0.09$] and a high hsCRP level [OR = 0.57 (0.28–1.27); $p = 0.17$] at admission were not associated with hemorrhagic transformation. After adjustment for main confounding factors, a high MMP-9 level at H6 [2.91 (1.14–7.42); $p = 0.03$], a high glucose level [1.20 (1.02–1.42); $p = 0.03$] and a long delay from symptom onset to groin puncture [OR = 1.08 (1.02–1.14) per 30 min increase; $p = 0.02$] remained significantly associated with hemorrhagic transformation.

DISCUSSION

Our study assessed the association between MMP-9 level and outcome in AIS patients with LVO treated with MT. The study design stands apart from earlier works due to a sequential assessment of both MMP-9 and ischemic damage on MRI. MMP-9 level at 6 h from admission was associated with infarct growth and hemorrhagic transformation.

We observed an early peak at 6 h from admission. Previous studies assessing kinetics of MMP-9 in AIS patients whether or not they are treated with IV thrombolysis with heterogeneous delays from the stroke onset have shown an early increase in the first 24 h (4, 10, 11, 18–22).

Pathological data show the presence of high MMP-9 levels not only in infarct tissue but also in the peri-infarct areas, suggesting MMP-9 involvement in the process of infarct growth (23, 24). A previous study conducted in 24 patients with middle cerebral artery (MCA) occlusion treated with IV thrombolysis found that MMP-9 level was associated with infarct growth at 24 h, but they did not report reperfusion status, which is a major confounding factor when interpreting their results (12). Our study confirms that MMP-9 level at H6 and infarct growth remains associated in the setting of MT after adjustment for reperfusion status.

Numerous studies have documented an increase in MMP-9 levels following AIS, associated with disruption of the BBB, thus promotion of hemorrhagic complications (2, 3, 25). This aspect has received special attention in patients treated with IV thrombolysis (4–9). Indeed, in addition to its thrombolytic action, tissue plasminogen activator (tPA), via activation of MMP-9, may also damage the basal lamina and tight junctions of the cerebral blood vessels, resulting in increased permeability of the BBB and hemorrhagic complications (26). We add to these existing data of MMP-9 activity and hemorrhage risk in AIS patients treated with tPA by examining AIS patients with LVO treated with MT, a therapy with much higher reperfusion rates and one which allows the recording of reperfusion status

TABLE 2 | Predictors of infarct growth and any hemorrhagic transformation in univariate and multivariate analyses.

	crude OR [95% CI]	p-value	adjusted OR [95% CI]	p-value
Infarct growth				
High vs. low	1.93	0.08	3.43	0.02
MMP-9 level at H6	(0.92–4.01)		(1.23–9.55)	
Glucose level ¹	1.25	0.03	1.43	0.01
	(1.02–1.54)		(1.08–1.90)	
Temperature ²	1.78	0.08	2.55	0.04
	(0.93–3.41)		(1.03–6.29)	
Reperfusion (TICI 2b–3)	0.27	0.02	0.16	0.02
	(0.09–0.79)		(0.03–0.77)	
Any hemorrhagic transformation				
High vs. low	2.48	0.02	2.91	0.03
MMP-9 level at H6	(1.16–5.27)		(1.14–7.42)	
Glucose level ¹	1.10	0.14	1.20	0.03
	(0.97–1.24)		(1.02–1.42)	
Onset to groin puncture time ³	1.04	0.06	1.08	0.01
	(1.00–1.09)		(1.02–1.14)	

OR, odds ratio; MMP-9, matrix metalloproteinase 9; H6, hour 6; IV, intravenous; TICI, thrombolysis in cerebral infarction score; ICA, internal carotid artery.

¹per 1 mmol/L increase.

²per 1°C increase.

³per 30 min increase.

Significant values are shown in bold.

after treatment. We found an association between MMP-9 level at H6 and the risk of hemorrhagic transformation, mainly minor. The clinical relevance of this minor bleeding is still debated (27).

The observed association between MMP-9 level at H6 and infarct growth and hemorrhagic transformation do not necessarily imply a cause-effect relationship. Nevertheless, the experimental data currently available on the role of MMP-9 and on the effect of MMP-9 inhibition may be consistent with a causal relationship (28–32). Preclinical animal studies suggest that MMP-9 inhibition can be of therapeutic importance in ischemic stroke although a small pilot study conducted in humans did not show efficacy of this drug on 3-months mRS score in the setting of IV thrombolysis (28–33). Insofar as we have now entered into a new era of highly effective reperfusion, a new approach investigating the potential benefit of compounds which can directly inhibit MMP-9 activity should be considered in future MT trials (34).

We recognize some limitations of our study. First, although the limited sample size and the monocentric design may be considered as a limitation, its major strength lies in sequential assessment of MMP-9 coupled with MRI data within a homogeneous cohort of stroke patients with LVO in the context of MT. Secondly, imaging was performed either on 1.5 or 3T according to MRI magnets availability. However, overall differences in the DWI and FLAIR imaging are usually subtle between both fields strengths as previously documented (35–37). Thirdly, final FLAIR-volume on day 6 may include a significant amount of edema instead of true

infarction although previous studies have reported that it likely reflects final infarct size (38–40). The edema component could be further assessed using non-linear co-registration methods (41). Edema component should be further assessed using post-processing analysis as the nonlinear registration method (41). Fourthly, susceptibility-weighted imaging (SWI) or T2*-weighted gradient echo (GRE) imaging were not performed at day 6. These sequences would have been more sensitive than CT, and might have revealed minor hemorrhagic transformation (Hemorrhage infarction type 1 and 2) consistent with delayed reperfusion damage following blood brain barrier injury. Lastly, a comprehensive imaging assessment of BBB disruption assessing subarachnoid hemorrhage, gadolinium sulcal enhancement [hyperacute injury marker (HARM)], or microvascular permeability (K2) would have been a more direct measure of MMP-9 action and deserves further investigation (42–44).

In this MT cohort study using sequential assessment of MMP-9 levels and MRI, a high MMP-9 level at H6 predicts infarct growth and hemorrhagic transformation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/supplementary material.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by the study was approved by the local ethics

committee and all subjects or their relatives signed an informed consent form. The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LM and TB: major role in the acquisition of data, analysis of the data, drafting the manuscript for intellectual content, AP, CC, MBo, LD, EO, YB, OE, and ND: major role in the acquisition of data, revised the manuscript for intellectual content, MBu: major role in the acquisition of data, analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content, CA: analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content, NM, MO: design of the study, revised the manuscript for intellectual content, TC: major role in the acquisition of data, analysis of the data, revised the manuscript for intellectual content, NN: design of the study, major role in the acquisition of data, drafting the manuscript for intellectual content.

FUNDING

This work was supported by the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) of Université de Lyon, within the program Investissements d'Avenir operated by the French National Research Agency (ANR) and the CASDEN prize from CASDEN/Fondation de l'Avenir awarded to LM.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Karen Reilly for editing assistance.

REFERENCES

- Bai J, Lyden PD. Revisiting cerebral postischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema. *Int J Stroke*. (2015) 10:143–52. doi: 10.1111/ijls.12434
- Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke*. (2003) 34:2025–30. doi: 10.1161/01.STR.0000083051.93319.28
- Barr TL, Latour LL, Lee K-Y, Schaewe TJ, Luby M, Chang GS, et al. Blood-brain barrier disruption in humans is independently associated with increased matrix metalloproteinase-9. *Stroke*. (2010) 41:e123–8. doi: 10.1161/STROKEAHA.109.570515
- Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*. (2003) 107:598–603. doi: 10.1161/01.CIR.0000046451.38849.90
- Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, et al. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. (2003) 34:40–6. doi: 10.1161/01.STR.0000046764.57344.31
- Castellanos M, Sobrino T, Millán M, García M, Arenillas J, Nombela F, et al. Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a multicenter confirmatory study. *Stroke*. (2007) 38:1855–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.106.481556
- Rodríguez JA, Sobrino T, Orbe J, Purroy A, Martínez-Vila E, Castillo J, et al. proMetalloproteinase-10 is associated with brain damage and clinical outcome in acute ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. (2013) 11:1464–73. doi: 10.1111/jth.12312
- Inzitari D, Giusti B, Nencini P, Gori AM, Nesi M, Palumbo V, et al. MMP9 variation after thrombolysis is associated with hemorrhagic transformation of lesion and death. *Stroke*. (2013) 44:2901–3. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002274
- Wang L, Wei C, Deng L, Wang Z, Song M, Xiong Y, et al. The accuracy of serum matrix metalloproteinase-9 for predicting hemorrhagic transformation after acute ischemic stroke: a systematic review and meta-analysis. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. (2018) 27:1653–65. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2018.01.023
- Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, Lee H, Barron M, Lederer M, et al. Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology*. (2006) 66:1550–5. doi: 10.1212/01.wnl.0000216133.98416.b4
- Kelly PJ, Morrow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, et al. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke: the biomarker evaluation for antioxidant therapies in stroke (BEAT-stroke) study. *Stroke*. (2008) 39:100–4. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.488189
- Rosell A, Alvarez-Sabín J, Arenillas JF, Rovira A, Delgado P, Fernández-Cadenas I, et al. A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke. *Stroke*. (2005) 36:1415–20. doi: 10.1161/01.STR.0000170641.01047.cc
- Mizuma A, You JS, Yenari MA. Targeting reperfusion injury in the age of mechanical thrombectomy. *Stroke*. (2018) 49:1796–802. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017286

14. Adams HP Jr, Bendixen BH, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke. *Stroke*. (1993) 24:35–41. doi: 10.1161/01.str.24.1.35
15. Hacke W, Kaste M, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. *JAMA*. (1995) 274:1017–25. doi: 10.1001/jama.1995.03530130023023
16. Barber PA, Demchuk AM, Zhang J, Buchan AM. Validity and reliability of a quantitative computed tomography score in predicting outcome of hyperacute stroke before thrombolytic therapy. *Lancet*. (2000) 355:1670–4. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02237-6
17. Higashida RT, Furlan AJ. Trial design and reporting standards for intra-arterial cerebral thrombolysis for acute ischemic stroke. *Stroke*. (2003) 34:e109–e37. doi: 10.1161/01.STR.0000082721.62796.09
18. Worthmann H, Tryc AB, Goldbecker A, Ma YT, Tountopoulou A, Hahn A, et al. The temporal profile of inflammatory markers and mediators in blood after acute ischemic stroke differs depending on stroke outcome. *Cerebrovasc Dis*. (2010) 30:85–92. doi: 10.1159/000314624
19. Demir R, Ulvi H, Özel L, Özdemir G, Güzelcik M, Aygül R. Relationship between plasma metalloproteinase-9 levels and volume and severity of infarct in patients with acute ischemic stroke. *Acta Neurol Belg*. (2012) 112:351–6. doi: 10.1007/s13760-012-0067-4
20. Sobrino T, Pérez-Mato M, Brea D, Rodríguez-Yáñez M, Blanco M, Castillo J. Temporal profile of molecular signatures associated with circulating endothelial progenitor cells in human ischemic stroke. *J Neurosci Res*. (2012) 90:1788–93. doi: 10.1002/jnr.23068
21. Brouns R, Wauters A, De Surgeloose D, Mariën P, De Deyn PP. Biochemical markers for blood-brain barrier dysfunction in acute ischemic stroke correlate with evolution and outcome. *Eur Neurol*. (2011) 65:23–31. doi: 10.1159/000321965
22. Montaner J, Rovira A, Molina CA, Arenillas JF, Ribó M, Chacón P, et al. Plasmatic level of neuroinflammatory markers predict the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. (2003) 23:1403–7. doi: 10.1097/01.WCB.0000100044.07481.97
23. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, Fernández-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, et al. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*. (2006) 37:1399–406. doi: 10.1161/01.STR.0000223001.06264.af
24. Amantea D, Russo R, Gliozzi M, Fratto V, Berliocchi L, Bagetta G, Bernardi G, Corasaniti MT. Early upregulation of matrix metalloproteinases following reperfusion triggers neuroinflammatory mediators in brain ischemia in rat. *Int Rev Neurobiol*. (2007) 82:149–69. doi: 10.1016/S0074-7742(07)82008-3
25. Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus*. (2007) 22:1–9. doi: 10.3171/foc.2007.22.5.5
26. Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke*. (2002) 33:831–6. doi: 10.1161/hs0302.104542
27. Kaesmacher J, Kaesmacher M, Maegerlein C, Zimmer C, Gersing AS, Wunderlich S, et al. Hemorrhagic transformations after thrombectomy: risk factors and clinical relevance. *Cerebrovasc Dis Basel Switz*. (2017) 43:294–304. doi: 10.1159/000460265
28. Jiang X-F, Namura S, Nagata I. Matrix metalloproteinase inhibitor KB-R7785 attenuates brain damage resulting from permanent focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett*. (2001) 305:41–4. doi: 10.1016/S0304-3940(01)01800-6
29. Nagel S, Su Y, Horstmann S, Heiland S, Gardner H, Koziol J, et al. Minocycline and hypothermia for reperfusion injury after focal cerebral ischemia in the rat-effects on BBB breakdown and MMP expression in the acute and subacute phase. *Brain Res*. (2008) 1188:198–206. doi: 10.1016/j.brainres.2007.10.052
30. Switzer JA, Hess DC, Ergul A, Waller JL, Machado LS, Portik-Dobos V, et al. Matrix metalloproteinase-9 in an exploratory trial of intravenous minocycline for acute ischemic stroke. *Stroke*. (2011) 42:2633–5. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.618215
31. Fan F, Yang J, Xu Y, Guan S. MiR-539 Targets MMP-9 to regulate the permeability of blood-brain barrier in ischemia/reperfusion injury of brain. *Neurochem Res*. (2018) 43:2260–7. doi: 10.1007/s11064-018-2646-0
32. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke*. (1998) 29:1020–30. doi: 10.1161/01.STR.29.5.1020
33. Kohler E, Prentice DA, Bates TR, Hankey GJ, Claxton A, van Heerden J, et al. Intravenous minocycline in acute stroke: a randomized, controlled pilot study and meta-analysis. *Stroke*. (2013) 44:2493–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.000780
34. Savitz SI, Baron J-C, Yenari MA, Sanossian N, Fisher M. Reconsidering neuroprotection in the reperfusion era. *Stroke*. (2017) 48:3413–9. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017283
35. Rosso C, Drier A, Lacroix D, Mutlu G, Pires C, Lehericy S, et al. Diffusion-weighted MRI in acute stroke within the first 6 hours: 1.5 or 3.0 Tesla? *Neurology*. (2010) 74:1946–53. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181e396d1
36. Kosior RK, Wright CJ, Kosior JC, Kenney C, Scott JN, Frayne R, Hill MD. 3-Tesla versus 1.5-Tesla magnetic resonance diffusion and perfusion imaging in hyperacute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. (2007) 24:361–8. doi: 10.1159/000106983
37. Kuhl CK, Textor J, Gieseck J, von Falkenhausen M, Gernert S, Urbach H, et al. Acute and subacute ischemic stroke at high-field-strength (3.0-T) diffusion-weighted MR imaging: intraindividual comparative study. *Radiology*. (2005) 234:509–16. doi: 10.1148/radiol.2342031323
38. Krongold M, Almekhlafi MA, Demchuk AM, Coutts SB, Frayne R, Eilaghi A. Final infarct volume estimation on 1-week follow-up MR imaging is feasible and is dependent on recanalization status. *NeuroImage Clin*. (2015) 7:1–6. doi: 10.1016/j.nicl.2014.10.010
39. Tourdias T, Renou P, Sibon I, Asselineau J, Bracoud L, Dumoulin M, et al. Final cerebral infarct volume is predictable by MR imaging at 1 week. *Am J Neuroradiol*. (2011) 32:352–8. doi: 10.3174/ajnr.A2271
40. Lu M, Mitsias PD, Ewing JR, Soltanian-Zadeh H, Bagher-Ebadian H, Zhao Q, et al. Predicting final infarct size using acute and subacute multiparametric MRI measurements in patients with ischemic stroke. *J Magn Reson Imaging*. (2005) 21:495–502. doi: 10.1002/jmri.20313
41. Harston GWJ, Carone D, Sheerin F, Jenkinson M, Kennedy J. Quantifying infarct growth and secondary injury volumes: comparing multimodal image registration measures. *Stroke*. (2018) 49:1647–55. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.020788
42. Luby M, Hsia AW, Nadareishvili Z, Cullison K, Pednekar N, Adil MM, et al. Frequency of Blood-brain barrier disruption post-endovascular therapy and multiple thrombectomy passes in acute ischemic stroke patients. *Stroke*. (2019) 50:2241–4. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.025914
43. Renú A, Laredo C, Lopez-Rueda A, Llull L, Tudela R, San-Roman L, et al. Vessel wall enhancement and blood-cerebrospinal fluid barrier disruption after mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke. *Stroke*. (2017) 48:651–7. doi: 10.1161/STROKEAHA.116.015648
44. Latour LL, Kang D-W, Ezzeddine MA, Chalela JA, Warach S. Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Ann Neurol*. (2004) 56:468–77. doi: 10.1002/ana.20199

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Mechtouff, Bochaton, Paccalet, Crola Da Silva, Buisson, Amaz, Bouin, Derex, Ong, Berthezene, Eker, Dufay, Mewton, Ovize, Nighoghossian and Cho. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

2.3. Matrix Metalloproteinase-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Are Associated With Collateral Status in Acute Ischemic Stroke With Large Vessel Occlusion.

a) Introduction


La qualité de la circulation collatérale est un élément majeur de la croissance de l'infarctus et une bonne perfusion collatérale est associée à une réduction du volume final de lésion et une meilleure réponse clinique³¹³. En revanche, la contribution de l'inflammation à ces mécanismes de perfusion collatérale n'a pas été étudié dans le cadre de la thrombectomie mécanique. MCP-1 et MMP9 jouant un rôle majeur dans l'inflammation cérébrale, l'objectif de cette étude était d'évaluer la contribution de ces deux facteurs circulants à la qualité de la circulation collatérale. Cette étude a montré que les patients présentant une circulation collatérale de bonne qualité présentaient des taux circulants de MCP-1 à l'admission plus élevés et des taux de MMP9 plus faibles que les patients avec une circulation collatérale de mauvaise qualité.

Dans cette étude, j'ai réalisé les dosages des taux circulants de MMP9 et de MCP-1.

Stroke

BRIEF REPORT

Matrix Metalloproteinase-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 Are Associated With Collateral Status in Acute Ischemic Stroke With Large Vessel Occlusion

Laura Mechtouff , MD; Thomas Bochaton, MD, PhD; Alexandre Paccalet; Claire Crola Da Silva, PhD; Marielle Buisson, PhD; Camille Amaz; Laurent Derex, MD, PhD; Elodie Ong, MD; Yves Berthezene, MD, PhD; Omer Faruk Eker, MD, PhD; Nathalie Dufay, PhD; Nathan Mewton, MD, PhD; Michel Ovize, MD, PhD; Tae-Hee Cho, MD, PhD; Norbert Nighoghossian, MD, PhD

BACKGROUND AND PURPOSE: In ischemic stroke, inflammatory status may condition the development of collateral circulation. Here we assessed the relationship between systemic inflammatory biomarkers and collateral status in large vessel occlusion before mechanical thrombectomy.

METHODS: HIBISCUS-STROKE is a cohort study including acute ischemic stroke patients with large vessel occlusion treated with mechanical thrombectomy following admission magnetic resonance imaging. MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) and MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) were measured on blood sampling collected at admission. Collateral status was assessed on pretreatment Digital subtraction angiography and categorized into poor (Higashida score, 0–2) and good (Higashida score, 3–4). A multiple logistic regression model was performed to detect independent markers of good collateral status.

RESULTS: One hundred and twenty-two patients were included, of them 71 patients (58.2%) had a good collateral status. In univariate analysis, low MMP-9 levels ($P=0.01$), high MCP-1 levels ($P<0.01$), a low National Institute of Health Stroke Score ($P=0.046$), a high diastolic blood pressure ($P=0.049$), the absence of tandem occlusion ($P=0.046$), a high Alberta Stroke Program Early CT Score ($P<0.01$) and a low volume on the diffusion-weighted imaging ($P<0.01$) were associated with good collateral status. Following multivariate analysis, low MMP-9 levels ($P=0.02$) and high MCP-1 levels ($P<0.01$) remained associated with good collateral status.

CONCLUSIONS: Low MMP-9 and high MCP-1 levels were associated with good pretreatment collateral status in patients with acute ischemic stroke with large vessel occlusion. These results might suggest a relationship between collateral status and inflammation.

Key Words: brain edema ■ collateral circulation ■ digital subtraction angiography ■ matrix metalloproteinase 9 ■ monocyte chemoattractant proteins

The functional status of collaterals may impact the timing of tissue loss and response to reperfusion therapies in acute ischemic stroke (AIS).¹

Collateral development in ischemic stroke depends on a number of factors, including genetic profile, hemodynamic, metabolic and neural mechanisms, and patency of ipsilateral posterior circle of Willis.²

The contribution of inflammation to collateral failure has been suggested through different mechanisms. Early

brain edema which is partly mediated by inflammatory pathways may increase the resistance of collateral arterioles thus contributing to collateral failure.^{3,4} In contrast, some experimental data deriving from cardiovascular research claimed for a beneficial role of inflammation in arteriogenesis that is triggered by fluid shear stress after a sudden occlusion.⁵

Considering all these factors, we assess the relationship between 2 systemic markers of inflammation,

Correspondence to: Laura Mechtouff, MD, Stroke Department, Hospices Civils de Lyon, 59 Blvd Pinel, 69677 Bron. Email laura.mechtouff@chu-lyon.fr

The Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/STROKEAHA.120.029395>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 2235

© 2020 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at www.ahajournals.org/journal/str

MMP-9 (matrix metalloproteinase-9) and MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), and collateral circulation status in the setting of AIS with large vessel occlusion from the HIBISCUS-STROKE (Cohort of Patients to Identify Biological and Imaging Markers of Cardiovascular Outcomes in Stroke) cohort data.

METHODS

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

HIBISCUS-STROKE is an ongoing cohort study including all patients admitted since October 2016 in the Lyon Stroke Center for an AIS with large vessel occlusion treated with mechanical thrombectomy following brain magnetic resonance imaging assessment. The study was approved by the local ethics committee, and all subjects or their relatives signed an informed consent form. MMP-9 and MCP-1 were measured on blood sampling collected at admission before intravenous thrombolysis administration using ELISA test. Pretreatment collateral status on digital subtraction angiography was categorized into poor (Higashida score, 0–2) and good (Higashida score, 3–4).⁶ A multiple logistic regression model was performed using a backward selection procedure. Detailed methods are available in the [Data Supplement](#).

RESULTS

Study Population

Between October 2016 to April 2019, 122 patients were included (Figure 1 in the [Data Supplement](#)). No significant imbalance was observed for the main criteria between included and excluded patients except for baseline National Institute of Health Stroke Scale score and the rate of intracranial internal carotid artery and tandem occlusion ($P < 0.05$; Table 1 in the [Data Supplement](#)).

Among included patients, 71 (58.2%) had good collateral status. The main baseline characteristics according to collateral status are shown in Table 1.

Factors Associated With Collateral Status

In univariate analysis, low MMP-9 and high MCP-1 levels at admission were significantly associated with good collateral status as well as a low National Institute of Health Stroke Scale score, a high diastolic blood pressure, the absence of tandem occlusion, a high Alberta Stroke Program Early CT Score and a lower volume on the diffusion-weighted imaging (both $P < 0.01$; Figure and Table 2).

In multivariate analysis, low MMP-9 levels, high MCP-1 levels, a high National Institute of Health Stroke Scale score, and a low diastolic blood pressure were significantly associated with good collateral status (Table 2). We did not find any interaction between diffusion-weighted

Table 1. Baseline Characteristics of the Study Population According to the Collateral Status

	Collateral Status		P Value
	Poor (n=51)	Good (n=71)	
Age, y	69±16	69±16	0.92
Male	29 (56.9)	40 (56.3)	1.00
Prestroke mRS score >2	2 (3.9)	6 (8.5)	0.47
Hypertension	22 (43.1)	32 (45.1)	0.86
Diabetes mellitus	6 (11.8)	14 (19.7)	0.32
Hyperlipidemia	7 (13.7)	20 (28.2)	0.08
Current smoking	9 (17.7)	14 (19.7)	0.82
Statin use	11 (21.6)	17 (23.9)	0.83
Baseline NIHSS score	17 [12–19]	13 [7–19]	0.03
SBP, mm Hg	138.6±19.5	139.1±23.2	0.96
DBP, mm Hg	74.1±15.7	80.3±17.9	0.08
Glucose level, mmol/L	6.1 [5.6–7.5]	6.5 [5.7–7.9]	0.50
Etiology			0.11
Cardioembolism	27 (52.9)	45 (63.4)	
LAA	6 (11.8)	9 (12.7)	
Other	7 (13.7)	1 (1.4)	
Undetermined	11 (21.6)	16 (22.5)	
IV thrombolysis	30 (58.8)	35 (49.3)	0.36
Thrombus location			
M1 MCA segment	40 (78.4)	57 (80.3)	0.82
M2 MCA segment	12 (23.5)	15 (21.1)	0.83
Intracranial ICA	14 (27.5)	10 (14.1)	0.11
Tandem occlusion	11 (21.6)	6 (8.5)	0.06
ASPECTS	6 [4–7]	8 [7–9]	<0.01
DWI lesion volume, cc	37.0 [23.0–66.2]	7.2 [2.1–15.9]	<0.01
Onset to admission, min	107 [75–233]	158 [70–275]	0.52
Onset to groin puncture, min	196 [155–313]	240 [167–378]	0.32
MMP-9, ng/mL	759.0 [508.8–1218.7]	522.4 [367.4–1001.8]	0.05
High MMP-9 level	30 (63.8)	24 (39.3)	0.02
MCP-1, pg/mL	54.4 [37.9–81.8]	76.7 [58.3–112.9]	<0.01
High MCP-1 level	16 (33.3)	39 (61.9)	<0.01

Variables are displayed as absolute number (percentage of column total), mean±SD, or median (25th–75th percentiles) as appropriate. ASPECTS indicates Alberta Stroke Program Early CT Score; DBP, diastolic blood pressure; DWI, diffusion-weighted imaging; ICA, intracranial carotid artery; IV, intravenous; LAA, Large-artery atherosclerosis; MCA, middle-cerebral-artery segment; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MMP-9, matrix metalloproteinase 9; NIHSS, National Institute of Health Stroke Score; and SBP, systolic blood pressure.

imaging lesion volume or diabetes mellitus and MMP-9 or MCP-1 levels.

DISCUSSION

The novelty of this study lies in the baseline assessment of biomarkers and collateral status in patients with AIS with large vessel occlusion. We found that low MMP-9

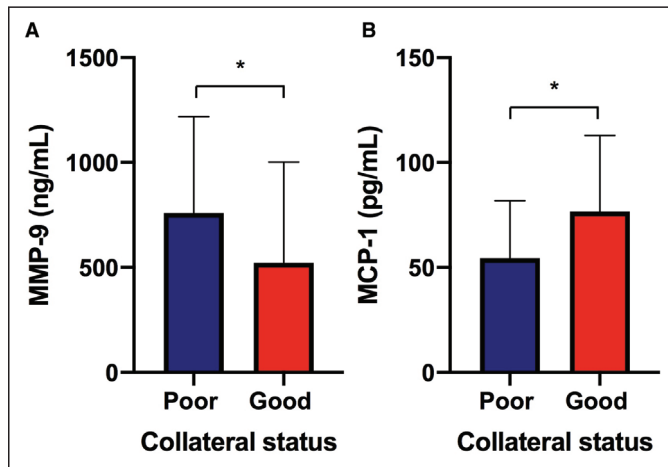


Figure. Biomarkers levels according to collateral status.

MMP-9 (matrix metalloproteinase 9; **A**), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1; **B**).

and high MCP-1 levels at admission were associated with good collateral status.

MMP-9 compromises blood-brain-barrier integrity by degrading components of the tight junctions and extracellular matrix, thereby promoting cerebral edema.⁷⁸ The resulting higher interstitial pressure may lead to increase of arterioles resistance with subsequent collateral failure.³⁴ This should deserve further explorations as our preliminary data suggest a relationship between MMP-9 levels and collateral status.

In contrast to MMP-9, MCP-1 levels, in spite of its contribution to ischemia-reperfusion injury, were associated with good collateral status. As a counterpart to the preceding mechanism, experimental data from cardiovascular research have shown that inflammatory reaction is also involved in arteriogenesis. This process is initially triggered by fluid shear stress acting on the collateral endothelium.⁵ After endothelial activation, the recruitment of circulating monocytes is an important step toward proliferation of vascular wall cells and remodeling processes. MCP-1, a chemokine expressed by endothelial cells seems to be actively involved in this process through its chemoattractant effect on monocytes. Indeed MCP-1^{-/-} mice have been

shown to have a reduced monocyte recruitment and collateral artery formation after femoral artery occlusion while local infusion of MCP-1 seems to accelerate even to promote arteriogenesis in rabbits.^{9,10} Although the arteriogenesis process is thought to require several days to be effective, data derived from in vitro study revealed immediate early gene activation in response to fluid shear stress.¹¹ However, it remains an open question as to whether these data can be applied to patients with AIS.

Although pathophysiological and experimental data call for a causal relationship between biomarkers and collateral status, these changes might also be considered as a consequence of AIS.

CONCLUSIONS

In our study conducted in patients with AIS with large vessel occlusion, low MMP-9 and high MCP-1 levels were associated with good pretreatment collateral status. These results suggest a complex intertwined relationship between collateral status and inflammatory process from ischemic-reperfusion injury to arteriogenesis. Our data call for trials assessing whether

Table 2. Factors Associated With Good Collateral Status in Univariate and Multivariate Analysis

	Crude OR (95% CI)	P Value	Adjusted OR (95% CI)	P Value
High vs low MMP-9 level	0.37 (0.17–0.81)	0.01	0.34 (0.14–0.87)	0.02
High vs low MCP-1 level	3.25 (1.48–7.14)	<0.01	4.12 (1.61–10.53)	<0.01
NIHSS score*	0.93 (0.88–0.99)	0.046	0.91 (0.84–0.98)	0.01
DBP†	1.02 (1.00–1.05)	0.049	1.03 (1.01–1.06)	0.02
Tandem occlusion	0.34 (0.12–0.98)	0.046	0.40 (0.10–1.59)	0.19

DBP indicates diastolic blood pressure; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MMP-9, matrix metalloproteinase 9; NIHSS, National Institute of Health Stroke Score; and OR, odds ratio.

*Per 1-unit increase.

†Per 1 mmHg increase.

regulation of these markers might supplement the benefit of reperfusion treatment in enhancing collateral status.

ARTICLE INFORMATION

Received February 12, 2020; accepted April 16, 2020.

Affiliations

Stroke Department (L.M., L.D., E.O., T.-H.C., N.N.), Cardiac Intensive Care Unit (T.B.), Clinical Investigation Center, INSERM 1407 (M.B., C.A., N.M., M.O.), Neuro-radiology Department (Y.B., O.F.E.), and NeuroBioTec, CRB (N.D.), Hospices Civils de Lyon, France. INSERM U1060, CarMeN laboratory (L.M., T.B., A.P., C.C.D.S., E.O., M.O., T.-H.C.) and CREATIS, CNRS UMR 5220, INSERM U1044 (Y.B.), University Lyon 1, France.

Sources of Funding

This work was supported by the RHU MARVELOUS (Recherche Hospitalo-Universitaire [RHU] New MR Imaging to Prevent Cerebral and Myocardial Reperfusion Injury; ANR-16-RHUS-0009) of Université de Lyon, within the program Investissements d'Avenir operated by the French National Research Agency and the Caisse d'aide sociale de l'Éducation nationale (CASDEN) prize from CASDEN/Fondation de l'Avenir.

Disclosures

Dr Nighoghossian reports grants from French National Research agency during the conduct of the study; personal fees from Boehringer Ingelheim and grants from French National research agency outside the submitted work. The other authors report no conflicts.

REFERENCES

1. Berkhemer OA, Jansen IG, Beumer D, Fransen PS, van den Berg LA, Yoo AJ, Lingsma HF, Sprengers MES, Jenniskens SFM, Nijeholt GJLA, et al; MR CLEAN Investigators. Collateral status on baseline computed tomographic angiography and intra-arterial treatment effect in patients

- with proximal anterior circulation stroke. *Stroke*. 2016;47:768–776. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.011788
2. Liebeskind DS. Collateral circulation. *Stroke*. 2003;34:2279–2284. doi: 10.1161/01.STR.0000086465.41263.06
3. Rocha M, Jovin TG. Fast versus slow progressors of infarct growth in large vessel occlusion stroke: clinical and research implications. *Stroke*. 2017;48:2621–2627. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017673
4. Brooks G, Kemmling A, Meyer L, Nawabi J, Schön G, Fiehler J, Kniep H, Hanning H. Computed tomography angiography collateral profile is directly linked to early edema progression rate in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2019;50:3424–3430. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.027062
5. Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res*. 2004;95:449–458. doi: 10.1161/01.RES.0000141145.78900.44
6. Higashida RT, Furlan AJ, Roberts H, Tomsick T, Connors B, Barr J, Dillon W, Warach S, Broderick J, Tilley B, et al; Technology Assessment Committee of the American Society of Interventional and Therapeutic Neuroradiology; Technology Assessment Committee of the Society of Interventional Radiology. Trial design and reporting standards for intra-arterial cerebral thrombolysis for acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:e109–e137. doi: 10.1161/01.STR.0000082721.62796.09
7. Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus*. 2007;22:E4. doi: 10.3171/foc.2007.22.55
8. Rodríguez JA, Sobrino T, Orbe J, Purroy A, Martínez-Vila E, Castillo J, Páramo JA. proMetalloproteinase-10 is associated with brain damage and clinical outcome in acute ischemic stroke. *J Thromb Haemost*. 2013;11:1464–1473. doi: 10.1111/jth.12312
9. Voskuil M, Hoefler IE, van Royen N, Hua J, de Graaf S, Bode C, Buschmann IR, Piek JJ. Abnormal monocyte recruitment and collateral artery formation in monocyte chemoattractant protein-1 deficient mice. *Vasc Med*. 2004;9:287–292. doi: 10.1191/1358863x04vm571oa
10. Hoefler IE, van Royen N, Buschmann IR, Piek JJ, Schaper W. Time course of arteriogenesis following femoral artery occlusion in the rabbit. *Cardiovasc Res*. 2001;49:609–617. doi: 10.1016/s0008-6363(00)00243-1
11. Shyy YJ, Hsieh HJ, Usami S, Chien S. Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemoattractant protein 1 gene expression in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:4678–4682. doi: 10.1073/pnas.91.11.4678

2.4. Large vessel cardioembolic stroke and embolic stroke of undetermined source share a common profile of matrix metalloproteinase-9 level and susceptibility vessel sign length

a) Introduction

L'étiologie de l'infarctus cérébral reste indéterminée chez 1/3 des patients malgré un bilan exhaustif. Il peut s'agir dans certains cas d'une cause cardioembolique méconnue. Cette situation clinique fréquente pose un problème de prise en charge, raison pour laquelle l'identification d'un « profil » associé à l'étiologie cardioembolique semble importante. L'objectif est donc de trouver une méthode permettant de prédire l'étiologie de l'AVC lorsque le bilan étiologique se révèle négatif. Afin de tenter de répondre à cet objectif, les profils de MMP-9 classiquement liés à l'athérosclérose et l'aspect du thrombus à l'IRM ont été utilisés et comparés entre les groupes de patients avec une étiologie claire : profil cardio-embolique versus profil athéromateux.

A partir des données de la cohorte HIBISCUS-STROKE, nous avons montré que le couple « MMP-9 / longueur du thrombus sur la séquence en T2* » était associé à l'étiologie de l'infarctus cérébral. Ces 2 variables sont plus élevées en cas d'infarctus cérébral lié à l'athérosclérose, et sont donc inversement associés à l'étiologie cardioembolique.

J'ai réalisé dans cette étude les dosages de MMP-9.

b) Publication

DR. HANAN ALHAZMI (Orcid ID : 0000-0002-0316-2908)

PROFESSOR OMER FARUK EKER (Orcid ID : 0000-0002-5696-5368)

DR. NORBERT NIGHOGHOSSIAN (Orcid ID : 0000-0003-0594-4409)

DR. LAURA MECHTOUFF (Orcid ID : 0000-0001-9165-5763)

Article type : Original Article

Large vessel cardioembolic stroke and embolic stroke of undetermined source share a common profile of matrix metalloproteinase-9 level and susceptibility vessel sign length

Hanan Alhazmi¹, MD, Alexandre Bani-Sadr², MD, Thomas Bochaton^{3,4}, MD, PhD, Alexandre Paccalet⁴, Claire Crola Da Silva⁴, PhD, Marielle Buisson⁵, PhD, Camille Amaz⁵, Roxana Ameli², MD, Yves Berthezene^{2,6}, MD, PhD, Omer Faruk Eker², MD, PhD, Michel Ovize^{4,5}, MD, PhD, Tae-Hee Cho^{1,4}, MD, PhD, Norbert Nighoghossian^{1,4}, MD, PhD, Laura Mechtouff^{1,4}, MD, PhD

1. Stroke Center, Pierre Wertheimer Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

2. Neuroradiology Department, Pierre Wertheimer Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

3. Cardiac Intensive Care Unit, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France 4. CarMeN, INSERM U.1060/Université Lyon1/INRA U. 1397/INSA Lyon/Hospices Civils Lyon, Université de Lyon, France

5. Clinical Investigation Center, INSERM 1407, Louis Pradel Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

6. CREATIS, CNRS UMR 5220, INSERM U1044, University Lyon 1, France

Corresponding author:

Dr. Laura Mechtouff

Stroke department, Hospices Civils de Lyon

59 Boulevard Pinel 69677 Bron

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the [Version of Record](#). Please cite this article as [doi: 10.1111/ene.14806](https://doi.org/10.1111/ene.14806)

This article is protected by copyright. All rights reserved

Fax: 33(0)472357629

Tel: 33(0)427856747

e-mail:laura.mechtouff@chu-lyon.fr

Manuscript Word count including references: 1987

Running title: MMP-9 levels and SVS length in stroke subtypes

Keywords: Stroke etiology, susceptibility vessel sign, MRI, Matrix metalloproteinase-9, blood biomarkers.

Abstract

Background: Embolic stroke of undetermined source (ESUS) account for up to 25% of ischemic strokes. Identification of biomarkers that could improve the prediction of stroke subtype and subsequently of stroke prevention still remains a major issue.

Methods: HIBISCUS-STROKE cohort includes ischemic stroke patients with large vessel occlusion treated with mechanical thrombectomy following admission magnetic resonance imaging. Presence and length of SVS were assessed on gradient recalled echo T2*-weighted imaging. MMP-9 was measured on sera collected at admission. A multiple logistic regression model was performed to detect independent markers to distinguish cardioembolic (CE) from large artery atherosclerosis (LAA) subtype.

Results: A total of 147 patients were included, of them the etiology was distributed as follows: 86 (58.5%) CE, 26 (17.7%) LAA and 35 (23.8%) ESUS. The optimal cutoff for differentiating CE from LAA subtype was 14.5 mm for SVS length (sensitivity, 79.7%; specificity, 72.7%) and 1110 ng/mL for admission MMP-9 level (sensitivity, 85.3%; specificity, 52.2%). Multivariate analysis revealed that current smoking (odds ratio (OR) 0.07, 95% confidence interval (CI) 0.01-0.93), tandem occlusion (OR 0.01, 95% CI 0.01-0.21), SVS length (OR 0.78, 95% CI 0.63-0.97) and admission MMP-9 level (OR 0.99, 95% CI 0.99-1.00) were inversely associated with CE subtype. SVS length and MMP-9 level did not differ between ESUS and CE subtypes.

This article is protected by copyright. All rights reserved

Introduction

Effective prevention of ischemic stroke requires an appropriate etiological diagnosis [1]. However the reported frequency of embolic stroke of undetermined source (ESUS) which designates patients with non-lacunar cryptogenic ischemic strokes in whom embolism is the likely stroke mechanism ranges from 9% to 25% of ischemic strokes [2]. In this context, blood and imaging biomarkers could contribute to determine the stroke subtype thereby reducing the proportion of ESUS.

The susceptibility vessel sign (SVS) is classically defined as a dark blooming artifact visible on gradient recalled echo (GRE) T2*-weighted imaging (T2*WI) [3,4]. Although the association between SVS and stroke subtype remains controversial, some studies suggest a clear relationship between SVS and cardioembolic (CE) subtype [5–9]. The characteristics of the SVS such as its diameter and length are also debated in terms of their ability to predict stroke subtype [6,8].

The addition of biomarkers would also increase the prediction of stroke subtype. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is a marker of blood-brain barrier damage and hemorrhagic transformation risk at the acute stage of ischemic stroke [10,11]. This biomarker is also associated with atherosclerosis progression and plaque vulnerability [12–15].

In light of these observations, we aimed to assess whether SVS and admission MMP-9 level may help to predict stroke subtype.

Methods

Study population

HIBISCUS-STROKE is an ongoing cohort study including all patients admitted since October 2016 in the Lyon Stroke Center for an acute ischemic stroke with large vessel occlusion (LVO) treated with mechanical thrombectomy (MT) following brain magnetic resonance imaging (MRI) assessment. We excluded patients with stroke of other determined etiology to focus our analyses on the major subtypes in patients with LVO: CE, large-artery atherosclerosis (LAA), and ESUS. Patients with known inflammatory disease, active malignancy, vasculitis, antibiotics at admission, myocardial infarction, or major surgery in the 30 previous days were also excluded in order not to skew the results of the biomarkers analysis. Baseline data on demographic characteristics, lifestyle risk factors, medical history, and use of medications were collected at hospital admission. Neurological status was assessed by a board certified neurologists using National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) score at admission. Etiological workup systematically included

routine blood tests, a 12-lead electrocardiography (ECG) and cardiac monitoring ≥ 24 hours, echocardiography, and vascular imaging in line with current guidelines [1]. In addition, a 24 to 72-h Holter ECG monitoring was performed in the absence of a clear etiology. Stroke subtype was classified according to the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) classification [16]. TOAST diagnosis was made by 2 stroke neurologists blinded to the laboratory and imaging findings, and discrepancies were settled by a third stroke neurologist. Cryptogenic strokes were considered as ESUS in this cohort of ischemic stroke with LVO [17].

Neuroimaging

All MRIs were performed with 1.5-Tesla Intera or 3-Tesla Achieva scanners (Philips, Best, Netherlands). The admission MRI protocol included fluid-attenuated inversion recovery (FLAIR), GRE T2*WI, diffusion-weighted imaging (DWI), time-of-flight MRA, contrast-enhanced MRA, and perfusion-weighted imaging. Alberta Stroke Program Early CT score (ASPECTS) was measured on baseline DWI [18]. The acute ischemic lesion was segmented from the baseline DWI with a semi-automated method (3D Slicer: <https://www.slicer.org/>) by using both a validated ADC threshold ($\text{ADC} < 620 \times 10^{-6} \text{ mm}^2/\text{s}$) and visual assessment of b1000 images. SVS was defined as the presence of hypo-intensity in the artery with a blooming artifact on GRE T2*WI imaging (figure 1). Two observers (H.A. and A.B-S.) blinded to clinical and laboratory data, independently reviewed GRE T2*WI, and rated the presence and length of SVS based on previously published methodology [19]. SVS lengths obtained from the two observers were averaged. Successful reperfusion was defined as thrombolysis in cerebral infarction score (TICI) 2b/3 [20].

Blood Sampling Protocol

White blood cells (WBC) count and high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) were routinely measured at admission. Admission MMP-9 level was measured using DuoSet® ELISA Development Kits (R&D Systems). Sera were prepared and stored at -80°C within a 3 hour delay at the NeuroBioTec biobank (CRB-HCL : BB-0033-00046, France). All samples were thawed only once for study measurements. Serum samples were diluted at 1/2000. Sensitivity was 12.2 pg/mL.

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as means (standard deviation [SD]) or medians (interquartile range [IQR]), and categorical variables as percentages. Medians were compared using the Mann-Whitney test for independent samples. Percentages were compared using the Fishers exact test. Association between quantitative covariates was assessed using the Spearman correlation coefficient. Inter-observer reliability was assessed using intraclass coefficient correlation (ICC). We compared first CE and LAA subtype patients. We used the Youden index to select the cutoff values of SVS length and admission MMP-9 level offering the best sensitivity and specificity for differentiating CE from LAA subtype. The association between each variable and CE subtype was measured by calculating crude odds ratios (ORs) and 95% CIs using conditional logistic regression analyses. A multiple logistic regression model was performed to detect independent markers of CE subtype. Covariates with a significant univariate association with CE subtype were included in the multivariate model. A backward selection procedure was chosen. Model was consequently adjusted for age, gender, current smoking, and intracranial internal carotid artery (ICA) occlusion. Receiving operating curve (ROC) for distinguishing CE from LAA subtype was performed using clinicoradiological covariates with a significant univariate association with CE subtype, with and without SVS length and admission MMP-9 level. Areas under the curve (AUC) were compared using DeLong's method. Thereafter, we compared SVS length and admission MMP-9 levels in ESUS versus 1/ LAA subtype and 2/ CE subtype using the Mann-Whitney test. Two-tailed $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

The data were analyzed with Stata Version 15™ (STATA CORP, COLLEGE STATION, TEXAS 77845 USA).

Results

Study population

From October 2016 to April 2019, 147 patients met the inclusion criteria (figure 2). Mean age was 71 +/- 15 years and 60 (40.8%) patients were male. Eighty-six (58.5%) patients were classified as CE, 26 (17.7%) as LAA and 35 (23.8%) as ESUS. Median NIHSS score on admission was 15 [9-19]. SVS occurred in 122 (83.0%) patients, in whom the median SVS length was 11.5 mm (8.0-16.0). Median admission MMP-9 level was 647.1 ng/mL [401.8-1106.6]. Inter-observer reliability

was substantial for measuring SVS length (ICC=0.886, 95% CI, 0.833–0.923). The main clinical and imaging characteristics according to stroke subtypes are shown in table 1.

MMP-9 level and SVS

Admission MMP-9 level was not significantly associated with SVS presence (647.1 ng/mL [385.8-1012.7] versus 636.4 ng/mL [441.6-1443.3]; $p=0.27$) and was not correlated with SVS length (Spearman's rho 0.15; $p=0.10$).

Factors associated with CE compared to LAA subtype

Stroke patients with CE subtype were more likely to be older and female. In contrast, current smoking, intracranial internal carotid artery (ICA), and tandem occlusion were more frequent in patients with LAA subtype (tables 1 and 2). No association was observed between stroke subtype and presence of SVS (odds ratio (OR) 1.12, CI 0.33-3.83; $p=0.86$) (table 1). In contrast, SVS length was shorter and admission MMP-9 level was lower in CE than in LAA subtype (figure 3, table 2). The ROC curves identified a cutoff value that offered the best sensitivity and specificity for differentiating CE from LAA subtype for the SVS length (14.5 mm (sensitivity, 79.7%; specificity, 72.7%)) and admission MMP-9 level (1110 ng/mL (sensitivity, 85.3%; specificity, 52.2%)). In multiple logistic regression analysis, SVS length and admission MMP-9 level as well as current smoking, and tandem occlusion were inversely associated with CE subtype (table 2).

The addition of both SVS length and admission MMP-9 level to the other covariates with a significant univariate association with CE subtype resulted in a slight increase of discriminatory accuracy for distinguishing CE from LA subtype (AUC 0.97 vs. 0.91; $p=0.45$) (figure 3).

Comparison of ESUS to CE and LAA stroke

SVS length and admission MMP-9 level differed between ESUS and LAA subtypes (11.3 mm [7.5-13.5] versus 18.3 mm [13.5-23.5]; $p<0.01$; 687.7 ng/mL [430.1-1218.7] versus 1136.8 ng/mL [602.5-1641.3]; $p=0.05$ respectively) but not between ESUS and CE subtypes (11.3 mm [7.5-13.5] versus 11.0 mm [8.0-14.0]; $p=0.82$; 687.7 ng/mL [430.1-1218.7] versus 571.0 ng/mL [378.1-965.8]; $p=0.57$ respectively) (figure 4).

Discussion

Our key finding is that SVS length and MMP-9 level may help to distinguish CE from LAA subtype whereas their profile did not differ between ESUS and CE subtypes.

Although SVS on GRE T2*WI was reported to be associated with CE subtype, it is also detected in patients with LAA [5–9]. Several studies showed that MRI characteristics of SVS, such as diameter, overestimation ratio, or the presence of two layers on 3T- GRE T2*WI are associated with CE subtype [6,8,9]. Data about SVS length are more scarce and conflicting, one study out of two showing an association between SVS length and CE subtype [6,8]. In contrast with these previous studies that differed from ours due to over-representation of intracranial atherosclerotic disease and use of susceptibility-weighted imaging, we found a strong inverse association between SVS length and CE subtype. This result is in line with a recent CT study conducted in ischemic stroke patients before MT that reported lower thrombus length in CE subtypes compared to non CE subtypes [21]. The higher rate of spontaneous thrombus lysis previously observed in CE compared to LAA subtypes may account for our finding [22]. However, it is unclear whether the thrombus length comes from a single proximal source (CE, LAA) or reflects an additional thrombus extension due to low flow effects on coagulation and thrombosis [23,24]. This latter phenomenon may also have played a role in our study as most of LAA subtype patients have an upstream occlusion of the internal carotid artery.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory process in the arterial wall involving MMPs [12,15]. MMP-9 levels are typically higher in patients with an unstable carotid plaque and localized into the plaque with histological markers of plaque instability and rupture [12–14]. However, its value in predicting stroke subtype in ischemic stroke patients is still debated [25–28]. Baek et al. study demonstrates in clots retrieved from human intracranial arteries that MMP-9 expression was significantly higher in clots with a negative SVS than in those with a positive SVS regardless of stroke subtype [29]. The discrepancy with our study is probably related to the fact that systemic assessment of MMP-9 may limit the accurate analysis of the relationship between MMP-9 and SVS presence as this marker is not only linked to the clot-bound component but also to ischemic damage.

This article is protected by copyright. All rights reserved

Accepted Article

Interestingly, ESUS did not differ from CE subtype in terms of SVS length and admission MMP-9 level. These results are in line with previous studies showing similar histological and CT thrombus features in strokes of undetermined etiology (UDE) and CE subtypes [21,30]. Thus, it may be worthwhile in further studies to investigate how the use of SVS length and MMP-9 level may help to manage etiological workup, especially optimal duration of cardiac monitoring in patients with large vessel ESUS, although atrial fibrillation is not the only potential cardioembolic source in these patients [31]. Given the burden of stroke, this issue involved not only stroke specialists but all neurologists.

Study limitations

This study faces classic limitations such as its monocentricity and its small sample size, especially in LAA subtype, and the lack of analysis of other MRI criteria. Moreover, our results apply only to centers that use MRI as first-line imaging workup in acute stroke. It can also be considered that the lack of length measurement on digital subtraction angiography limits the conclusions even though GRE provides reliable measurement [19]. Last, imaging was performed either on 1.5 T or 3 T according to MRI magnets availability. Although the diagnostic accuracy of SVS to determine thrombus composition varies significantly among MRI scanners, the interscanner agreement was moderate to good [32].

Conclusion

SVS length and admission MMP-9 level may improve the prediction of CE subtype. Moreover, our study reinforces the hypothesis that many ESUS strokes may have a CE cause. These results need to be confirmed by a validation cohort.

Compliance with Ethics Guidelines

Ethical Approval: This research was conducted according to the ethical standards issued by the Declaration of Helsinki. The study was approved by the local ethics committee (IRB number: 00009118) and all subjects or their relatives signed an informed consent form.

Acknowledgments: Human biological samples and associated data were obtained from NeuroBioTec (CRB HCL, Lyon France, Biobank BB-0033-00046)

Funding: This work has been supported by the RHU MARVELOUS (ANR-16-RHUS-0009) of Université Claude Bernard Lyon-1 (UCBL), within the program "Investissements d'Avenir" operated by the French National Research Agency (ANR) and the CASDEN prize from CASDEN/Fondation de l'Avenir.

Disclosure of conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Data availability statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request

Data availability statement

References

- 1 Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, *et al.* Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2019 Dec;50(12). DOI: 10.1161/STR.0000000000000211
- 2 Hart RG, Catanese L, Perera KS, Ntaios G, Connolly SJ. Embolic Stroke of Undetermined Source: A Systematic Review and Clinical Update. *Stroke*. 2017 Apr;48(4):867–72.
- 3 Rovira A, Orellana P, Alvarez-Sabin J, *et al.* Hyperacute Ischemic Stroke: Middle Cerebral Artery Susceptibility Sign at Echo-planar Gradient-Echo MR Imaging. *Radiology*. 2004 Aug;232(2):466–73.
- 4 Flacke S, Urbach H, Keller E, *et al.* Middle Cerebral Artery (MCA) Susceptibility Sign at Susceptibility-based Perfusion MR Imaging: Clinical Importance and Comparison with Hyperdense MCA Sign at CT ¹. *Radiology*. 2000 May;215(2):476–82.
- 5 Cho K-H, Kim JS, Kwon SU, Cho A-H, Kang D-W. Significance of Susceptibility Vessel Sign on T2*-Weighted Gradient Echo Imaging for Identification of Stroke Subtypes. *Stroke*. 2005 Nov;36(11):2379–83.
- 6 Kang D-W, Jeong H-G, Kim DY, Yang W, Lee S-H. Prediction of Stroke Subtype and Recanalization Using Susceptibility Vessel Sign on Susceptibility-Weighted Magnetic Resonance Imaging. *Stroke*. 2017 Jun;48(6):1554–9.
- 7 Horie N, Tateishi Y, Morikawa M, *et al.* Acute stroke with major intracranial vessel occlusion: Characteristics of cardioembolism and atherosclerosis-related in situ stenosis/occlusion. *J Clin Neurosci*. 2016 Oct;32:24–9.
- 8 Zhang R, Zhou Y, Liu C, *et al.* Overestimation of Susceptibility Vessel Sign: A Predictive Marker of Stroke Cause. *Stroke*. 2017 Jul;48(7):1993–6.
- 9 Yamamoto N, Satomi J, Tada Y, *et al.* Two-Layered Susceptibility Vessel Sign on 3-Tesla T2*-Weighted Imaging Is a Predictive Biomarker of Stroke Subtype. *Stroke*. 2015 Jan;46(1):269–71.
- 10 Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the Blood-Brain Barrier by Matrix Metalloproteinase Inhibition Reduces rtPA-Mediated Mortality in Cerebral Ischemia With Delayed Reperfusion. *Stroke*. 2003 Aug;34(8):2025–30.

This article is protected by copyright. All rights reserved

- 11 Montaner J, Molina CA, Monasterio J, *et al.* Matrix Metalloproteinase-9 Pretreatment Level Predicts Intracranial Hemorrhagic Complications After Thrombolysis in Human Stroke. *Circulation*. 2003 Feb;107(4):598–603.
- 12 Tan C, Liu Y, Li W, *et al.* Associations of matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 concentrations with carotid atherosclerosis, based on measurements of plaque and intima–media thickness. *Atherosclerosis*. 2014 Jan;232(1):199–203.
- 13 Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, *et al.* Increased Matrix Metalloproteinase-9 Activity in Unstable Carotid Plaques: A Potential Role in Acute Plaque Disruption. *Stroke*. 2000 Jan;31(1):40–7.
- 14 Heo SH, Cho C-H, Kim HO, *et al.* Plaque Rupture is a Determinant of Vascular Events in Carotid Artery Atherosclerotic Disease: Involvement of Matrix Metalloproteinases 2 and 9. *J Clin Neurol*. 2011;7(2):69.
- 15 Olejarz W, Łacheta D, Kubiak-Tomaszewska G. Matrix Metalloproteinases as Biomarkers of Atherosclerotic Plaque Instability. *Int J Mol Sci*. 2020 May;21(11):3946.
- 16 Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, *et al.* Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993 Jan;24(1):35–41.
- 17 Hart RG, Diener H-C, Coutts SB, *et al.* Embolic strokes of undetermined source: the case for a new clinical construct. *Lancet Neurol*. 2014 Apr;13(4):429–38.
- 18 Barber PA, Demchuk AM, Zhang J, Buchan AM. Validity and reliability of a quantitative computed tomography score in predicting outcome of hyperacute stroke before thrombolytic therapy. *The Lancet*. 2000 May;355(9216):1670–4.
- 19 Naggara O, Raymond J, Domingo Ayllon M, *et al.* T2* “susceptibility vessel sign” demonstrates clot location and length in acute ischemic stroke. *PloS One*. 2013;8(10):e76727.
- 20 Higashida RT, Furlan AJ. Trial Design and Reporting Standards for Intra-Arterial Cerebral Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke. *Stroke*. 2003 Aug;34(8). DOI: 10.1161/01.STR.0000082721.62796.09
- 21 Boodt N, Compagne KCJ, Dutra BG, *et al.* Stroke Etiology and Thrombus Computed Tomography Characteristics in Patients With Acute Ischemic Stroke: A MR CLEAN Registry Substudy. *Stroke*. 2020 Jun;51(6):1727–35.
- 22 Vanacker P, Lambrou D, Eskandari A, *et al.* Improving the Prediction of Spontaneous and Post-thrombolytic Recanalization in Ischemic Stroke Patients. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2015

Aug;24(8):1781–6.

- 23 Qazi EM, Sohn SI, Mishra S, *et al.* Thrombus Characteristics Are Related to Collaterals and Angioarchitecture in Acute Stroke. *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol.* 2015 Nov;42(6):381–8.
- 24 Hathcock JJ. Flow Effects on Coagulation and Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Aug;26(8):1729–37.
- 25 Kreisel SH, Stroick M, Griebel M, *et al.* True Effects or Bias? MMP-2 and MMP-9 Serum Concentrations after Acute Stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2016;42(5–6):352–60.
- 26 Lehmann MF, Kallaur AP, Oliveira SR, *et al.* Inflammatory and metabolic markers and short-time outcome in patients with acute ischemic stroke in relation to TOAST subtypes. *Metab Brain Dis.* 2015 Dec;30(6):1417–28.
- 27 Zhou Z, Li X, Yang B, Jiang D. Relationship between lysophosphatidic acid and matrix metalloproteinase-9 plasma concentrations and carotid atheromatous plaque stability in patients with cerebral infarction. *J Int Med Res.* 2014 Jun;42(3):669–76.
- 28 Montaner J, Perea-Gainza M, Delgado P, *et al.* Etiologic diagnosis of ischemic stroke subtypes with plasma biomarkers. *Stroke.* 2008 Aug;39(8):2280–7.
- 29 Baek BH, Kim HS, Yoon W, *et al.* Inflammatory mediator expression within retrieved clots in acute ischemic stroke. *Ann Clin Transl Neurol.* 2018 Mar;5(3):273–9.
- 30 Sporns PB, Hanning U, Schwandt W, *et al.* Ischemic Stroke: What Does the Histological Composition Tell Us About the Origin of the Thrombus? *Stroke.* 2017 Aug;48(8):2206–10.
- 31 Ntaios G, Perlepe K, Lambrou D, S *et al.* Prevalence and Overlap of Potential Embolic Sources in Patients With Embolic Stroke of Undetermined Source. *J Am Heart Assoc.* 2019 Aug;8(15). DOI: 10.1161/JAHA.119.012858
- 32 Bourcier R, Détraz L, Serfaty JM, *et al.* MRI Interscanner Agreement of the Association between the Susceptibility Vessel Sign and Histologic Composition of Thrombi: Inter-MRI Agreement of the Susceptibility Vessel Sign. *J Neuroimaging.* 2017 Nov;27(6):577–82.

This article is protected by copyright. All rights reserved

Figure legends

Figure 1: Axial gradient recalled echo (GRE) T2*-weighted imaging (T2*WI) showing the presence of susceptibility vessel sign (arrow) in the M1 segment of the right middle cerebral artery (MCA).

Figure 2: Study flow-chart.

Figure 3: Receiving operating curve (ROC) of different models for distinguishing cardioembolism from large-artery atherosclerosis subtype (AUC: area under the curve).

Figure 4: SVS length and admission MMP-9 level according to stroke subtype (* indicates p-value<0.05).

Table 1: Main clinical and imaging characteristics according to stroke subtypes

	Cardioembolism (n=86)	Large-artery atherosclerosis (n=26)	Undetermined etiology (n=35)	NIHSS : Nation al Institut e of Health Stroke Score, hsCRP : High sensitivity C- reactiv e protein , WBC: white blood cell, MMP- 9: matrix -
Age, years	74.3 ± 13.8	64.8 ± 11.3	65.8 ± 16.4	
Female	45 (52.3)	7 (26.9)	8 (22.9)	
Hypertension	43 (50.0)	18 (69.2)	16 (45.7)	
Diabetes	14 (16.3)	4 (15.4)	8 (22.9)	
Hyperlipidemia	23 (26.7)	8 (30.8)	10 (28.6)	
Current smoking	9 (10.5)	9 (34.6)	11 (31.4)	
Baseline NIHSS score	15 [10-19]	14 (11-18)	15 [8-20]	
WBC count, 10 ⁹ /L	8.2 [6.6-10.0]	8.7 [6.8-11.4]	8.0 [6.3-9.1]	
hsCRP, mg/L	4.4 [1.9-8.2]	2.6 [1.3-5.2]	2.3 [1.0-5.2]	
IV thrombolysis	44 (51.2)	14 (53.9)	21 (60.0)	
Thrombus location				
M1 MCA segment	71 (82.6)	24 (92.3)	25 (71.4)	
M2 MCA segment	18 (20.9)	1 (3.9)	8 (22.9)	
ICA terminus	13 (15.1)	8 (30.8)	3 (8.6)	
Tandem occlusion	8 (9.3)	15 (57.7)	4 (11.4)	
ASPECT score	7 [6-9]	7 [6-8]	7 [6-9]	
Baseline lesion volume, mL	15.1 [5.5-38.8]	13.7 [6.3-36.8]	23 [2.7-44.2]	
Successful reperfusion	71 (82.6)	19 (73.1)	30 (85.7)	
Onset to imaging, min	118 [79-246]	235 [108-625]	109 [74-246]	
SVS	74 (85.7)	22 (84.6)	28 (75.7)	

metalloproteinase 9, IV: intravenous, MCA: middle-cerebral-artery segment, ICA: internal carotid artery, ASPECT: Alberta Stroke Program Early CT, SVS: susceptibility vessel sign. Variables are displayed as absolute number / total number (percentage), mean ± SD, or median (25th–75th percentiles) as appropriate.

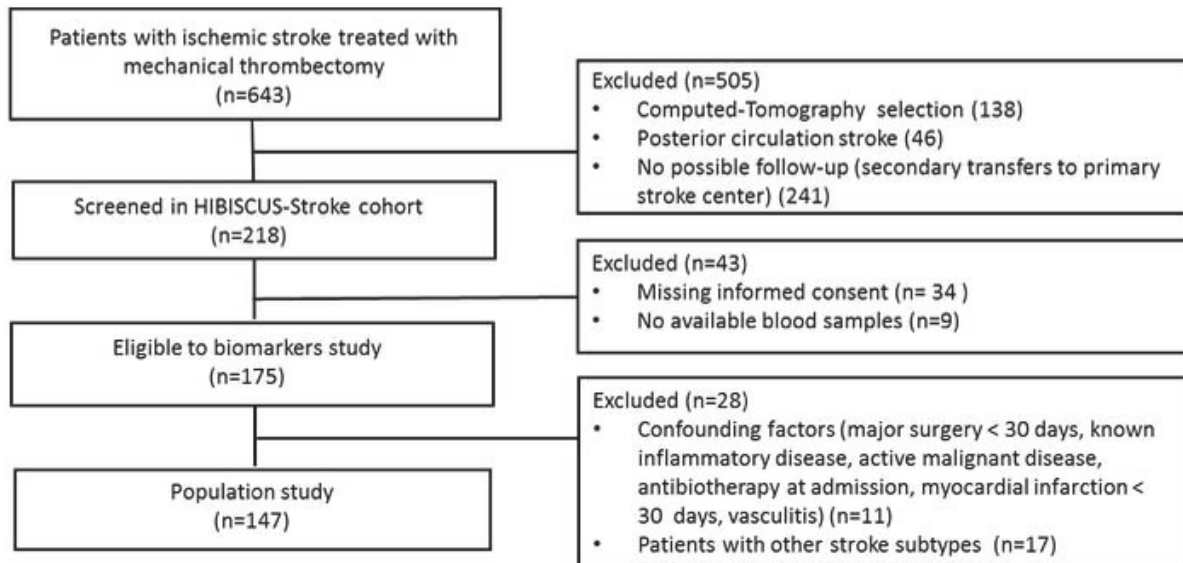
Table 2: Predictors of cardioembolism versus large-artery atherosclerosis subtype

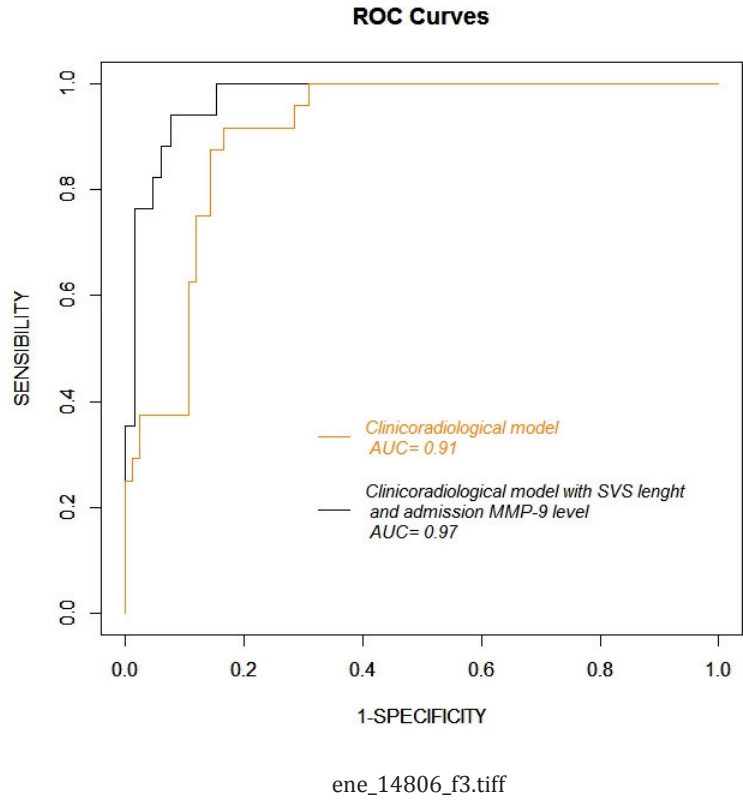
	crude OR (95% CI)	p-value	adjusted OR (95% CI)	p-value
Age †	1.64 (1.18-2.28)	<0.01	2.90 (0.98-8.65)	0.06
Female	2.98 (1.14-7.81)	0.03	-	-
Current smoking	0.22 (0.08-0.64)	<0.01	0.05 (0.01-0.76)	0.03
Onset to imaging ‡	0.92 (0.88-0.98)	<0.01	0.89 (0.78-1.02)	1.00
Tandem occlusion	0.08 (0.03-0.22)	<0.01	0.01 (0.01-0.19)	<0.01
SVS length	0.84 (0.77-0.92)	<0.01	0.78 (0.63-0.97)	0.01
Admission MMP-9 level	0.99 (0.99-1.00)	<0.01	0.99 (0.99-1.00)	0.01

OR: odds ratio, CI: confidence interval, ICA: internal carotid artery, SVS: susceptibility vessel sign, MMP-9: Matrix metalloproteinase-9. Model was adjusted for age, gender, current smoking, onset to imaging time and tandem occlusion. Bold values indicate p-value < 0.05.

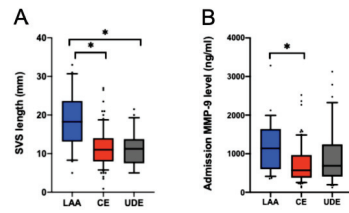
† Per 10-year increase

‡ Per 30-minute increase





This article is protected by copyright. All rights reserved



ene_14806_f4.tiff

2.5. A lower admission level of interleukin-6 is associated with first-pass effect in ischemic stroke patients

a) Introduction

L'effet du premier passage (First pass effect) lors de la thrombectomie mécanique est défini comme l'efficacité de reperfusion d'un simple passage. Cette efficacité est un marqueur prédicteur de la survenue d'évènement secondaires majeurs après un AVC ischémique³¹⁴. La composition du thrombus, son contenu en cellules immunitaires et leurs sécrétions, peuvent jouer un rôle dans la résistance du thrombus et donc l'effet d'un simple passage sur l'efficacité de reperfusion³¹⁵. Des changements rapides des marqueurs inflammatoires circulant peuvent être observés après thrombectomie mais évalué plus finement ces marqueurs et leurs corrélations avec les caractéristiques du thrombus pourrait améliorer et personnaliser la prise en charge du patient. L'objectif de cette étude était d'évaluer si les taux circulants de marqueurs inflammatoires ; IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, MMP9, Vcam1, sST2, p Selectine, sTNFR1 ; étaient associés à l'effet du premier passage lors de la thrombectomie.

Dans cette étude collaborative, j'ai réalisé les dosages des marqueurs circulants.

Cette étude démontre qu'un taux circulant d'IL-6 faible est associé avec une bonne reperfusion au premier passage.

b) Publication

En cours d'impression.

3. Publications collaboratives

3.1. Acute Induction of Translocon-Mediated Ca²⁺ Leak Protects Cardiomyocytes Against Ischemia/Reperfusion Injury.

a) Introduction

Le maintien de l'homéostasie calcique entre les différents compartiments cellulaires est un élément important pour lutter contre la surcharge calcique mitochondriale conduisant à la mort cellulaire. La mitochondrie et la régulation de son contenu calcique a donc constitué un axe majeur des stratégies de cardioprotection des dernières années. Le but de cette étude était d'étudier le potentiel du canal de fuite calcique réticulaire, Translocon, comme cible thérapeutique dans la pathologie de l'ischémie-reperfusion. La pré-activation de ce canal conduit à une diminution de la concentration calcique mitochondriale, et à une diminution de la vitesse d'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale. La pré-activation du Translocon réduit la mortalité des CMA isolés soumis à une séquence d'hypoxie-réoxygénation et un traitement *in vivo* entraîne une diminution de la taille d'infarctus. J'ai réalisé dans cette étude l'expérience d'hypoxie-réoxygénation *in vitro* et la mesure de mortalité par cytométrie en flux.



Article

Acute Induction of Translocon-Mediated Ca²⁺ Leak Protects Cardiomyocytes Against Ischemia/Reperfusion Injury

Ribal Al-Mawla ^{1,2,†}, Mallory Ducrozet ^{1,2,†}, Nolwenn Tessier ^{1,2,†}, Lucille Païta ^{1,2}, Bruno Pillot ^{1,2}, Yves Gouriou ^{1,2}, Camille Villedieu ^{1,2}, Zeina Harhous ^{1,2}, Alexandre Paccalet ^{1,2}, Claire Crola Da Silva ^{1,2}, Michel Ovize ^{1,2,3}, Gabriel Bidaux ^{1,2}, Sylvie Ducreux ^{1,2,*} and Fabien Van Coppenolle ^{1,2,‡}

- ¹ Univ Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, INRA, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 69500 Bron, France; ribal.al-mawla@hotmail.com (R.A.-M.); mallory.ducrozet@gmail.com (M.D.); nolwenn.tessier@icm-mhi.org (N.T.); lucille.paita@gmail.com (L.P.); bruno.pillot@univ-lyon1.fr (B.P.); yves.gouriou@univ-lyon1.fr (Y.G.); camille.villedieu@gmail.com (C.V.); zeina.harhous@gmail.com (Z.H.); alexandre.paccalet@univ-lyon1.fr (A.P.); claire.crola-da-silva@univ-lyon1.fr (C.C.D.S.); Michel.Ovize@chu-lyon.fr (M.O.); gabriel.bidaux@univ-lyon1.fr (G.B.); fabien.van-coppenolle@univ-lyon1.fr (F.V.C.)
- ² Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier EST, Département de Cardiologie, IHU-OPERA Bâtiment B13, 69500 Bron, France
- ³ Cardiovascular functional explorations, Louis Pradel hospital, Hospices Civils de Lyon, 69677 Lyon, France
- * Correspondence: sylvie.ducreux@univ-lyon1.fr
- † These authors equally contributed to this work.
- ‡ These authors equally supervised this work.

Received: 14 April 2020; Accepted: 21 May 2020; Published: 25 May 2020



Abstract: During myocardial infarction, dysregulation of Ca²⁺ homeostasis between the reticulum, mitochondria, and cytosol occurs in cardiomyocytes and leads to cell death. Ca²⁺ leak channels are thought to be key regulators of the reticular Ca²⁺ homeostasis and cell survival. The present study aimed to determine whether a particular reticular Ca²⁺ leak channel, the translocon, also known as translocation channel, could be a relevant target against ischemia/reperfusion-mediated heart injury. To achieve this objective, we first used an intramyocardial adenoviral strategy to express biosensors in order to assess Ca²⁺ variations in freshly isolated adult mouse cardiomyocytes to show that translocon is a functional reticular Ca²⁺ leak channel. Interestingly, translocon activation by puromycin mobilized a ryanodine receptor (RyR)-independent reticular Ca²⁺ pool and did not affect the excitation–concentration coupling. Second, puromycin pretreatment decreased mitochondrial Ca²⁺ content and slowed down the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening and the rate of cytosolic Ca²⁺ increase during hypoxia. Finally, this translocon pre-activation also protected cardiomyocytes after in vitro hypoxia reoxygenation and reduced infarct size in mice submitted to in vivo ischemia-reperfusion. Altogether, our report emphasizes the role of translocon in cardioprotection and highlights a new paradigm in cardioprotection by functionally uncoupling the RyR-dependent Ca²⁺ stores and translocon-dependent Ca²⁺ stores.

Keywords: Ca²⁺ leak channel; translocon; reticulum; cardioprotection; ischemia-reperfusion

1. Introduction

During cardiac infarction, ischemia triggers a molecular disaster comprising drop in ATP concentration [1], acidosis [2], reactive oxygen species (ROS) accumulation [3], and Ca²⁺ homeostasis

perturbations [4–6]. This leads to irreversible cellular damage [7] that can ultimately end by cardiomyocytes (CM) death [8]. In this molecular storm, Ca^{2+} ion, a preponderant second messenger, behaves as key inducer of ischemia/reperfusion (I/R)-mediated cell death. Indeed, the concomitant massive Ca^{2+} leak from internal stores overloads mitochondrial matrix and triggers the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening [9,10], driving mitochondria to its terminal fate. In resting cardiac muscle, reticular Ca^{2+} concentration is finely tuned by calcium-binding proteins [11] and by the dynamic balance between Ca^{2+} uptake and Ca^{2+} release. Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) is the only known Ca^{2+} uptake pump, whereas Ca^{2+} release channels are divided into two categories: (1) channels activated by signalization pathways such as inositol-tri-phosphate receptors (IP_3R) and ryanodine receptors (RyR), activated by IP_3 and the Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (CICR) mechanism, respectively, and (2) the Ca^{2+} leak channels, which generate reticular Ca^{2+} leak as a side effect of their own activity [12,13]. The physiological role of reticular Ca^{2+} channels from the first category is already well established, whereas the functionality of the leak channels in cardiomyocytes and their involvement in I/R-mediated mechanisms remain poorly understood. Over the last decade [14], most of the cardioprotective strategies have targeted calcium-mediated cyclophilin D activation in mitochondria [9,15] or the Ca^{2+} transfer from the sarco-endoplasmic reticulum (SR/ER) via IP_3R_2 [9,16] or RyR₂ [4] to the mitochondria. Related preclinical in vitro studies were promising. Unfortunately, they have led to disappointing results in clinical trials [17]. There is thus an urgent need to find out new targets to prevent CM cell death and deleterious consequences of myocardial infarction.

Remarkably, the translocon (TLC), a component of the translation machinery, contributes to the SR/ER Ca^{2+} leak; meanwhile, it serves as the major entry site of newly synthesized polypeptides in the reticular membrane [18]. Reticular transmembrane proteins Sec61, Sec62, and Sec63 comprise the key component of the protein translocation machinery [19], and trimers of Sec61 α , β , and γ subunits form an aqueous central pore ranging from 2.6 nm to 6 nm [20]. As it represents one of the largest pores in the reticular membrane, its aperture should be tiny controlled to maintain reticular Ca^{2+} homeostasis. To compare, RYR channel shows a narrower diameter, from 0.7 nm to 1 nm [21–23]. In absence of translation, GRP78/BiP, a luminal ATP-binding partner of the heat shock protein 70 (HSP70) family of chaperones, binds to the channel to fold neosynthesized proteins and seals the pore [24] to avoid Ca^{2+} leakage [25]. During translation, the nascent polypeptidic chain may trigger a Ca^{2+} leak. In fact, a gap between Sec61 and the ribosomes has been suggested [26,27], allowing Ca^{2+} to cross the channel. In addition, at the end of translation, the polypeptidic chain is no longer in the pore. At that time, ribosomes are still bound and a physiological Ca^{2+} leak occurs [28].

Research on the TLC complex is made difficult by its imperative requirement for life, explaining why not so long ago most of the studies to investigate the role of TLC in physiopathology have relied on a tightly adjusted pharmacological modulation [29]. Several works, including ours, have thus demonstrated that TLC is a crucial passive Ca^{2+} leak channel [25,30–37]. More recently, gene silencing experiments have clarified the relative roles of the different Sec proteins, which are described in detail elsewhere [38]. In particular, Linxweiler et al. showed that SEC62 silencing intensifies the reticular Ca^{2+} efflux [39]. Moreover, Lu et al. have observed a diminished cell viability and an extended rate of apoptosis in the human glioblastoma cells when silencing the SEC61G gene (coding for Sec61 γ) [40]. Not surprisingly, the term “Sec61 channelopathies” has newly emerged to design diseases directly affecting Sec61 subunits or components implicated in the pore gating (for a review, see [41]).

Given that TLC is ubiquitously expressed [18] and can contribute to cellular fate, we wondered whether this channel could be an effective target to minimize CM cell death during myocardial infarction. Our hypothesis was that acute pharmaceutical activation of TLC could pre-drain reticular Ca^{2+} stores before ischemia. This could prevent the massive cytoplasmic Ca^{2+} overload at reperfusion, as well as the subsequent mitochondrial Ca^{2+} overload, and consequently curtail I/R-mediated cell death.

2. Materials and Methods

All chemicals and fluorescent probes were purchased from Sigma-Aldrich and Life Technologies unless otherwise specified.

2.1. Animals

Experiments were carried out on 118 male C57BL/6J mice, aged between 8 to 12 weeks, which were obtained from Charles River laboratories. They received human care conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals in our platform (agreement number C-693880502).

All our procedures were approved by the local institutional animal research committee (N°BH2012-65 for the surgical procedure and N°BH2012-64 for heart collection; date of approval: 3 December 2012). Animals were randomly distributed towards different experiments and surgical procedures (Ca²⁺ measurements: 45; H/R: 4; flow cytometry: 15; I/R: 38; heart rate and blood pressure: 12; protein expression: 4).

2.2. CM Isolation

As described previously [9], mice were first injected intraperitoneally by 100 µL of 50 UI/kg heparin sodium and then anesthetized with 70 mg/kg pentobarbital sodium. Once pedal pinch reflexes were completely inhibited, a thoracotomy was performed, and the heart was collected and cannulated by the aorta in a Langendorff system. Blood was washed out with perfusion buffer (in mM: 113 NaCl, 4.7 KCl, 0.6 KH₂PO₄, 0.6 Na₂HPO₄, 1.2 MgSO₄·7H₂O, 0.032 phenol red, 12 NaHCO₃, 10 KHCO₃, 10 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 30 taurine, 10 mM 2,3-butanedione monoxime, 5.5 mM glucose) and pH was adjusted to 7.4. The heart was washed out with this buffer for 5 min at 37 °C.

Then, the heart was perfused at 37 °C with a digestion buffer (perfusion buffer 1×, 0.167 mg/mL Liberase Research Grade (Roche), 0.14 mg/mL trypsin 2.5% 10×, 12.5 µM CaCl₂) at a constant rate. At the end of digestion, the enzymatic activity was interrupted by a stopping buffer 1 (Perfusion Buffer 1×, 10% bovine calf serum, 12.5 µM CaCl₂) at 4 °C. The left ventricle was isolated in order to detach CM. The solution was then filtered (SEFAR Nitex 102 cm, Zurich Dutsher) in a 10 mL tube. After CM sedimentation, the medium was carefully replaced and cells were re-suspended in stopping buffer 2 (same composition of stopping buffer 1 but with only 5% bovine calf serum). This step was repeated in stopping buffer 2 containing gradually increased Ca²⁺ concentration (stopping buffer 2 + 0.05, 0.1, 0.5, and 1 mM CaCl₂ by increasing order). At the end of the final incubation, cells were suspended in a M199 medium (Gibco) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and ITS (insulin 1 µg/mL, transferrin 0.55 µg/mL, selenium 0.5 ng/mL).

CM were then seeded on 35 mm Ibidi dishes (Ibidi Biovalley; for Ca²⁺ measurements and H/R experiments) or Lab-tek chamber slides (Merck Millipore; for immunostaining), or else on glass coverslips (for Ca²⁺ transients) precoated with 10 µg/mL laminin (Corning), and then incubated for 2 h at 37 °C. Experiments were realized at the same day of the isolation with a 70–80% living CM estimated by observation.

2.3. Adenovirus Injection for Reticular and Mitochondrial Ca²⁺ Measurements

Seven- to nine-week-old C57BL/6J mice were anesthetized with isoflurane 2% and buprenorphine (IP, 0.075 mg/kg). Mice oral intubation was performed using a 22-gauge vinyl catheter and ventilated via a mice ventilator (model 687, Harvard Apparatus) with the following parameters: 0.2 mL tidal volume and 160 breaths/min breathe rate. Monitoring of body temperature was realized thanks to a rectal thermometer and maintained at 37 °C using a heating pad. A left thoracotomy was performed in the fourth left intercostal space. When the pericardium was opened, the heart was exposed to perform 4–5 intramyocardial injections of 5 × 10⁸ PFU (Plaque Formation Unit) of the adenoviruses D4ER (reticular Ca²⁺ sensor) or 4mtD3CPV (mitochondrial Ca²⁺ sensor) in a total volume of 20 µL. After surgery, animals

were allowed to recover from anesthesia, and once spontaneous breathing resumed, we removed the endotracheal tube. Seven days after recovery, mice were premedicated intraperitoneally with heparin (100 USP (United States Pharmacopeia) units per mouse). Anesthesia was induced with sodium pentobarbital (70 mg/kg). A thoracotomy was performed and the heart was collected. Adult ventricular cardiomyocytes were isolated using enzymatic digestion as described above.

2.4. Ca^{2+} Measurements

After the 2 h incubation in Ibidi dishes at 37 °C, the culture medium was replaced by a Ca^{2+} -containing buffer (CCB; in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 glucose; adjusted to pH 7.4). Cardiomyocytes were loaded in CCB containing 5 μM of fura-2-acetoxymethyl ester (fura2-AM) (for cytosolic Ca^{2+} imaging) for 30 min at room temperature.

After the fura2-AM loading, cells were washed twice for 5 min with a Ca^{2+} -free buffer (CFB) (same as CCB but without $CaCl_2$) containing 0.1 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid).

Pretreatment protocol: CM were pretreated with 200 μM puromycin for 30 min while being loaded with the probe, and in the case of double pretreatment with emetine, 20 μM of the latter was added 30 min before CM probe loading. In both cases, once the drug was added, it remained present during the whole experiment. The TLC inhibitor (emetine) was applied 5 minutes before its activator (puromycin) to ensure prior TLC inhibition and to avoid concomitant opposite effects of these compounds on TLC Ca^{2+} leakage [31,32]. After signal stabilization, CM were stimulated by either 5 μM ionomycin, 25 μM FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone), or 10 mM caffeine.

An ischemia-like hypoxia experiment was performed in a hypoxic chamber (Okolab-Bold line) where temperature and oxygen levels were monitored. Fura2-AM-loaded CM were washed with CCB, then, after fluorescence signal stabilization, we replaced the medium to hypoxic buffer (CCB without glucose) deprived from any supplementation or growth factor necessary for CM survival and normal function, and ventilated it with 99% N_2 in order to replace all oxygen traces in the medium. Oxygen level was decreased in the chamber to 1%. After 30 min of ischemia-like hypoxia, CM were stimulated by 10 mM caffeine.

Measurements were performed using a wide-field LeicaDMI6000B microscope equipped with an Orca-Flash4.0 digital camera (HAMAMATSU). Using a Lambda DG-4+ filter (Sutter instruments), fura-2 AM was excited at 340 and 380 nm and their respective emitted fluorescence lights were measured at wavelength 510 nm. D4ER and 4mtD3CPV (Förster resonance energy transfer (FRET)-based sensors) were excited at 477 nm (CFP: Cyan Fluorescent Protein) and 514 nm (YFP: Yellow Fluorescent Protein). Their emitted fluorescent lights were assessed at wavelength 540 nm. Images (2048 × 2048 pixels) were taken at 3 second intervals. Free Ca^{2+} content was estimated by the YFP to CFP fluorescence ratio, which was figured out as described in [42].

All experiments were performed at room temperature in a calcium-free buffer to prevent capacitative Ca^{2+} entry that would then add to the emptying of intracellular Ca^{2+} stocks, except for in vitro H/R and paced experiments.

2.5. Ca^{2+} Transients

For Ca^{2+} transients experiments, CM were plated on 24 mm glass coverslips. Coverslips were mounted on a Quick Change Chamber (RC-47FSLP Warner Instruments) and stimulation was delivered by a MyoPacer Field Stimulator (IonOptix). CM were loaded at 37 °C with fluo5-AM (5 μM) for 30 min. After loading, cells were washed in CCB, then the medium was replaced by a field stimulation buffer (FSB; in mM: 150 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 2 $MgCl_2$, 1 glucose, 2.5 pyruvate, 5 creatine, 5 taurine, 2 $CaCl_2$). Cytosolic Ca^{2+} transients were recorded in fluo5-AM-loaded CM, field-stimulated at 1 Hz with a current pulse delivered via 2 platinum electrodes at RT for 0.5 ms and at 40 V amplitude. To measure mitochondrial Ca^{2+} transients, we injected mice with 4mtD3cpv adenovirus, as described previously. Isolated mice CM expressing the probe were field-stimulated for 1 min successively at 0.5, 1, and 2 Hz in FSB.

were allowed to recover from anesthesia, and once spontaneous breathing resumed, we removed the endotracheal tube. Seven days after recovery, mice were premedicated intraperitoneally with heparin (100 USP (United States Pharmacopeia) units per mouse). Anesthesia was induced with sodium pentobarbital (70 mg/kg). A thoracotomy was performed and the heart was collected. Adult ventricular cardiomyocytes were isolated using enzymatic digestion as described above.

2.4. Ca^{2+} Measurements

After the 2 h incubation in Ibidi dishes at 37 °C, the culture medium was replaced by a Ca^{2+} -containing buffer (CCB; in mM: 140 NaCl, 5 KCl, 10 HEPES, 1 $MgCl_2$, 2 $CaCl_2$, 10 glucose; adjusted to pH 7.4). Cardiomyocytes were loaded in CCB containing 5 μM of fura-2-acetoxymethyl ester (fura2-AM) (for cytosolic Ca^{2+} imaging) for 30 min at room temperature.

After the fura2-AM loading, cells were washed twice for 5 min with a Ca^{2+} -free buffer (CFB) (same as CCB but without $CaCl_2$) containing 0.1 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid).

Pretreatment protocol: CM were pretreated with 200 μM puromycin for 30 min while being loaded with the probe, and in the case of double pretreatment with emetine, 20 μM of the latter was added 30 min before CM probe loading. In both cases, once the drug was added, it remained present during the whole experiment. The TLC inhibitor (emetine) was applied 5 minutes before its activator (puromycin) to ensure prior TLC inhibition and to avoid concomitant opposite effects of these compounds on TLC Ca^{2+} leakage [31,32]. After signal stabilization, CM were stimulated by either 5 μM ionomycin, 25 μM FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone), or 10 mM caffeine.

An ischemia-like hypoxia experiment was performed in a hypoxic chamber (Okolab-Bold line) where temperature and oxygen levels were monitored. Fura2-AM-loaded CM were washed with CCB, then, after fluorescence signal stabilization, we replaced the medium to hypoxic buffer (CCB without glucose) deprived from any supplementation or growth factor necessary for CM survival and normal function, and ventilated it with 99% N_2 in order to replace all oxygen traces in the medium. Oxygen level was decreased in the chamber to 1%. After 30 min of ischemia-like hypoxia, CM were stimulated by 10 mM caffeine.

Measurements were performed using a wide-field LeicaDMI6000B microscope equipped with an Orca-Flash4.0 digital camera (HAMAMATSU). Using a Lambda DG-4+ filter (Sutter instruments), fura-2 AM was excited at 340 and 380 nm and their respective emitted fluorescence lights were measured at wavelength 510 nm. D4ER and 4mtD3CPV (Förster resonance energy transfer (FRET)-based sensors) were excited at 477 nm (CFP: Cyan Fluorescent Protein) and 514 nm (YFP: Yellow Fluorescent Protein). Their emitted fluorescent lights were assessed at wavelength 540 nm. Images (2048 × 2048 pixels) were taken at 3 second intervals. Free Ca^{2+} content was estimated by the YFP to CFP fluorescence ratio, which was figured out as described in [42].

All experiments were performed at room temperature in a calcium-free buffer to prevent capacitative Ca^{2+} entry that would then add to the emptying of intracellular Ca^{2+} stocks, except for in vitro H/R and paced experiments.

2.5. Ca^{2+} Transients

For Ca^{2+} transients experiments, CM were plated on 24 mm glass coverslips. Coverslips were mounted on a Quick Change Chamber (RC-47FSLP Warner Instruments) and stimulation was delivered by a MyoPacer Field Stimulator (IonOptix). CM were loaded at 37 °C with fluo5-AM (5 μM) for 30 min. After loading, cells were washed in CCB, then the medium was replaced by a field stimulation buffer (FSB; in mM: 150 NaCl, 5.4 KCl, 10 HEPES, 2 $MgCl_2$, 1 glucose, 2.5 pyruvate, 5 creatine, 5 taurine, 2 $CaCl_2$). Cytosolic Ca^{2+} transients were recorded in fluo5-AM-loaded CM, field-stimulated at 1 Hz with a current pulse delivered via 2 platinum electrodes at RT for 0.5 ms and at 40 V amplitude. To measure mitochondrial Ca^{2+} transients, we injected mice with 4mtD3cpv adenovirus, as described previously. Isolated mice CM expressing the probe were field-stimulated for 1 min successively at 0.5, 1, and 2 Hz in FSB.

Fluo5-AM images were acquired with a Nikon A1Rplus confocal microscope equipped with a $\times 40$ oil-immersion objective (line-scan mode = 256 lines per ms). Scanning was performed along the long axis of the cell. Fluo5-AM was excited at 488 nm by argon-ion laser. The respective emitted fluorescent light was collected at wavelength 525/50 nm using one high sensitive GaAsp detector. Cytoplasmic Ca^{2+} signal analysis was performed using custom-written [43] for the amplitude and the rate of decay, and the rising slope was obtained with an exponential fit (Origin Pro 8 software). 4mtD3cpv fluorescence was acquired as above.

2.6. Calcein Cobalt Protocol

Calcein method with cobalt quenching was used in order to evaluate mitochondrial mPTP opening [44,45]. Kinetics of mPTP opening were measured in live CM. Briefly, 1 μM calcein-AM was used for cell loading in CCB for 15 min at room temperature. After two washes, cells were additionally incubated for 30 min with 2 mM cobalt chloride and 200 μM sulfinpyrazon in CCB. Using a Nikon confocal microscope, cells were imaged every 5 seconds under resting conditions for 2 min before application of 2 μM ionomycin, which triggered the mPTP opening. Calcein-AM was excited at 488 nm by argon-ion laser. The respective emitted fluorescent light was collected at wavelength 525/50 nm using one high sensitive GaAsp detector. A decrease in mitochondrial calcein-AM fluorescence reflects the opening of mPTP. For data analysis, background was subtracted and curves were normalized with the basal fluorescence.

2.7. In Vivo Model of Acute myocardial I/R Injury

As described previously, after anesthesia with 0.075 mg/kg of buprenorphine and 70 mg/kg of pentobarbital, C57BL/6J (male, 8–10 weeks old) mice were intubated and put under assisted respiration. Heart rate was monitored by an electrocardiogram. A thoracotomy was performed, allowing access to the heart after cutting the fifth rib, as well as upper and lower intercostal muscles. The pericardium was then opened in order to place a knot around the anterior interventricular artery (IVA). Ischemia was affirmed on the electrocardiogram by the shift of the ST-segment (flat isoelectric section on electrocardiography between the end of the S wave and the beginning of the T wave) and lasted 45 min. Preconditioning was performed by IV injection of puromycin in the jugular vein 10 min before ischemia, whereas control mice were injected with the same volume of saline solution at 0.9%. At the end of the ischemia, the knot was loosened to reestablish blood circulation and the wound was stitched. Animal state and recovery were monitored for 24 h.

After 24 h of reperfusion, the animal was again anesthetized following the same protocol and then intubated with the rib cage being re-opened. The knot placed around the anterior inter-ventricular artery was recovered, and was then constricted to occlude the artery again. Evans blue dye was then injected through the vena cava, thus allowing the healthy zone to be colored in blue, leaving the ischemic area in pink, the area-at-risk (AR). The diffusion of Evans blue made it possible to discriminate the healthy zone (non-ischemic) of the AR.

Slices of the left ventricle that were 1mm thick were cut from the apex and delicately covered by a glass plate to be photographed. The slices were then incubated for 15 min in triphenyltetrazolium chloride (TTC) in order to discriminate the necrosis area (AN). Slices were weighed and sizes of different areas were determined by computer in planimetry (SigmaScanPro5). Myocardial infarct size was expressed as percentage of the ratio of the necrosis area (AN) over the area-at-risk (AR). Sham mice that underwent surgery without I/R were used as controls.

2.8. CM Mortality

Adult mouse cardiomyocytes (250 μg protein) were kept in suspension according to the two experimental groups: hypoxia-reoxygenation group (HR) and preconditioning by puromycine (PreC Puro, 200 μM , 30 min prior to hypoxia reoxygenation sequence), as previously described [46]. HR cells were incubated with 1.5 mL hypoxia buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES,

2 mM CaCl_2). Hypoxia cells were transferred into a hypoxia incubator on the rocking platform at 37 °C with 0.5% O_2 . Cells were submitted to hypoxia for 1 h 30 min. In terms of reoxygenation, at the end of hypoxia, medium was changed for plating medium (MEM (Minimal Essential Medium) supplemented with 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, 10 mM butanedione monoxime, 2 mM glutamine, 200 mM ATP) and replaced into the incubator at 37 °C for 1 h. After the total sequence of hypoxia reoxygenation, a Fortessa X-20 instrument (BD Biosciences) was immediately used for flow cytometry measurements. To evaluate the cell viability, cardiomyocytes were loaded with propidium iodide (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and analyzed extemporaneously. DIVA Software (BD Biosciences) was employed for data analysis by acquisition of 1000 events, and results were expressed as percentage of propidium iodide-positive cells (dead cells).

2.9. Statistical Analysis

Data are presented as medians. For small datasets ($n < 10$), data are represented as scatter plots that also show median. For larger datasets, data are represented as box and whisker plots where the line in the middle of the box is the median, the whiskers are drawn down to the 10% quartile value and up to the 90% quartile value, and additionally a “+” appears at the mean. For comparison between two groups, the Mann–Whitney non-parametric test was used, whereas the non-parametric Kruskal–Wallis test followed by the Dunn’s multiple comparisons test was used to analyze differences between multiple groups (unless otherwise specified). For flow cytometry analysis, Wilcoxon matched-pairs signed rank tests were performed. In the two-way ANOVA, one factor was the effect of puromycin pretreatment and the other factor was the effect of the frequency stimulation; values were matched and Bonferroni post-hoc test was used. Experiments were performed at least three times or more. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 6 software (La Jolla, CA, USA). $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results and Discussion

3.1. TLC Is a Functional Reticular Ca^{2+} Leak Channel in Isolated Mouse CM: Its Activation Mobilized a RyR-Independent Ca^{2+} Reticular Pool and Did Not Affect Excitation–Contraction (E-C) Coupling

First, TLC expression in mouse CM was confirmed by Western blot (Figure S1). We then investigated the functionality of TLC as a reticular Ca^{2+} leak channel by monitoring the evolution of the reticular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_r$). To this end, we used an in vivo adenoviral delivery strategy based on an intramyocardial injection of an adenovirus encoding a FRET-based reticular Ca^{2+} sensor, D4ER (Figure 1A). One week after the injection, adult mouse CM were freshly isolated. These primary cells provided us with a powerful model for heart research at the cellular level. Unfortunately, their lifetime is not compatible with transgenic modulation of TLC component expression, as both require transfection and a significant period of expression. Therefore, our present investigation was based on the use of TLC pharmacological agents. Puromycin mimics the 3’ end of aminoacylated tRNA (transfer ribonucleic acid), releases the nascent peptidic chain, and allows Ca^{2+} to leak through the pore from the lumen to the cytoplasm [25,31,32]. On the other hand, emetine prevents ribosome binding to TLC and then avoids Ca^{2+} leak [47]. When cardiomyocytes were treated with puromycin (200 μM) for 30 min, we observed a significant and progressive $[\text{Ca}^{2+}]_r$ decrease (Figure 1B,C; fluorescent ratio: -0.4334 vs. -0.2197) showing that TLC is a functional reticular Ca^{2+} leak channel in this model. The reticular RyR-dependent Ca^{2+} pool was then determined by a treatment with caffeine and was similar in control and in puromycin-treated CM (Figure 1D). Interestingly, these findings indicate that the caffeine-sensitive Ca^{2+} stores could be independent of the puromycin-sensitive Ca^{2+} stores, that is, RyR and TLC activation would mobilize two different Ca^{2+} pools. With a comparable approach using an angiotensin II treatment, we found no impact of TLC activation on the IP_3R -dependent Ca^{2+} reticular stocks (Figure S2).

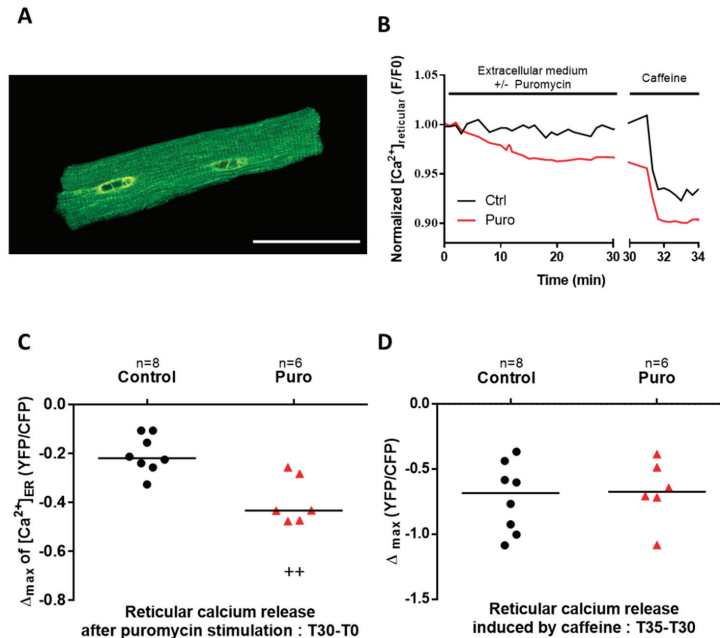


Figure 1. Translocon (TLC) activation by puromycin induces a decrease in reticular Ca^{2+} stock. (A) Illustration of the in vivo adenoviral strategy to express a reticular Ca^{2+} sensor, D4ER, in adult mouse cardiomyocytes, presenting a typical reticular pattern of the fluorescent sensor as displayed on the representative confocal image. Scale bar: 50 μm . (B) Graphical representation of the D4ER fluorescence ratio evolution with time in control condition (black line) and in response to 30 min of 200 μM puromycin treatment (red line), both stimulated with 5 mM caffeine; representative curve of reticular fluorescence evolution in control (Ctrl) condition and under puromycin treatment. (C) Scatter plots of reticular Ca^{2+} decreased at the end of 30 min perfusion with or without puromycin. (D) Scatter plots of the ryanodine receptor (RyR)-dependent reticular Ca^{2+} stock after puromycin or Ctrl treatment estimated by caffeine stimulation, calculated as difference between fluorescence level at stimulation time and final fluorescence. n = cell count. Statistics: ++ $p < 0.01$ vs. Ctrl.

Next, we analyzed whether puromycin treatment could modify the cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$) using fura-2 loaded cells. Because acute puromycin perfusion failed to trigger a significant increase in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$, we submitted CM to a 30 min puromycin pretreatment, combined or not with emetine (as a control in order to inhibit puromycin activity). Steady-state $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ was unchanged after puromycin-pretreatment (fluorescent ratio: 0.4583 vs. 0.4577 in control (Ctrl)), but was slightly decreased after a pretreatment with emetine prior to puromycin (fluorescent ratio: 0.4453; Figure 2A,B). No change in total cell Ca^{2+} content, quantified thanks to ionomycin treatment, was observed in CM pretreated with puromycin or concomitantly pretreated by puromycin and emetine (Figure 3A–C). To explain these results, one should note that the time-course of the puromycin response via TLC is slower than the caffeine time-course (Figure 1B). Moreover, one should be reminded that cytosolic Ca^{2+} elevations are counteracted by the combined action of Ca^{2+} reuptake by SERCA pumps, extrusion by the plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA) and the plasma membrane $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX), and absorption by the mitochondria [48]. Thus, Ca^{2+} leakage triggered by puromycin treatment did not change the global $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ at rest, even if TLC participated in its regulation (as shown by its inhibition by emetine prior to puromycin application).

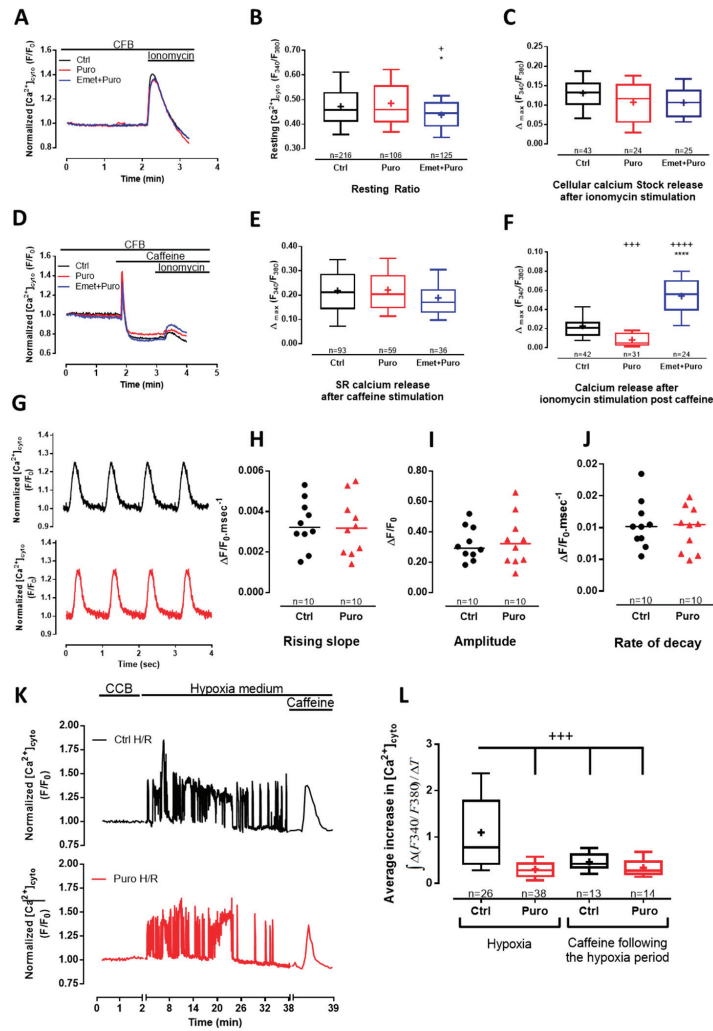


Figure 2. The reticular puromycin-mediated Ca^{2+} stock release was independent of the one stimulated by caffeine and did not affect excitation–contraction (E-C) coupling. (A,D) Time traces showing cytosolic Ca^{2+} concentration assessed by fura2-AM (acetoxymethyl ester) cytosolic probe, in Ctrl condition and after 30 min of 200 μM puromycin pretreatment or 20 μM emetine + 200 μM puromycin pretreatment. Effect of puromycin and emetine + puromycin was measured after cardiomyocyte (CM) pretreatment in Ca^{2+} -containing buffer (CCB) for 30 min (see the Materials and Methods section). Ca^{2+} content was figured out by the maximum amplitude of fura2-AM fluorescence ratio ($\Delta_{max} \text{Ratio}_{(340/380)}$) after the addition of different stimulations in a Ca^{2+} -free buffer (CFB). (B) Box blots representing the steady-state cytosolic Ca^{2+} concentration and (C) total cell Ca^{2+} content assessed by 5 μM of ionomycin stimulation. (E) RyR₂-dependent Ca^{2+} stores assessed by 10 mM of caffeine stimulation and (F) remaining cell Ca^{2+} content after caffeine stimulation assessed by ionomycin stimulation. (G–J) Cytoplasmic Ca^{2+}

transients were recorded using fluo5-AM-loaded intact CM electrically stimulated at 1 Hz. (G) Representative cytoplasmic Ca^{2+} transients in the absence or after 30 min of puromycin pretreatment; $\Delta F/F_0$ = normalized change fluorescence. (H) Scatter blots representing cytoplasmic Ca^{2+} transients amplitude, (I) Ca^{2+} transients rising slope (calculated from the relative amplitude and time to peak of the electrical induced Ca^{2+} transient), and (J) Ca^{2+} transients rate of decay. (K) Time traces displaying cytosolic Ca^{2+} concentration (measured by the fura2-AM fluorescence ratio) in a Ctrl CM and in a 200 μM puromycin preconditioned CM subjected to a 30 min ischemia-like hypoxia. At the end of the 30 min, 10 mM caffeine was added to the medium. CCB means Ca^{2+} -containing buffer. (L) Average increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ was figured out as masses of fura2-AM fluorescence signal over time in CM treated as explained in (K). Data are from at least three independent experiments. n = cell count. Statistics: $+ p < 0.05$, $+++ p < 0.001$, $++++ p < 0.0001$ vs. Ctrl, $* p < 0.05$, $**** p < 0.0001$ vs. Puro (puromycin).

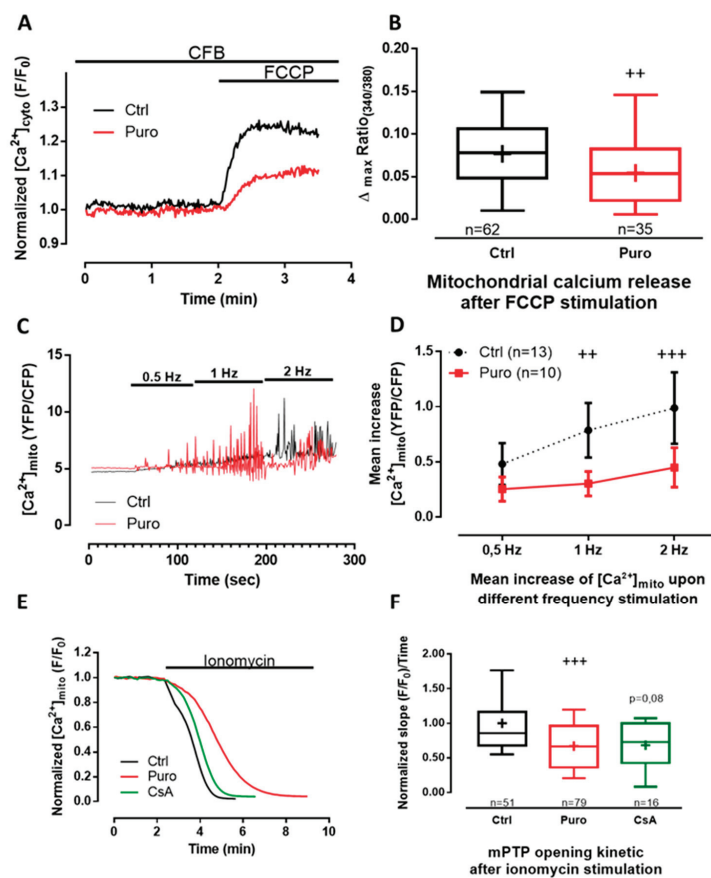


Figure 3. Puromycin pretreatment modified mitochondrial Ca^{2+} content in beating CM and delays mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. (A) Representative time traces of mitochondrial Ca^{2+} concentration (expressed as the 340/380 fluorescent ratio of fura2-AM cytosolic probe) from Ctrl and CM pretreated with 200 μM of puromycin for 30 min. (B) Boxplots represent mitochondrial calcium content assessed by 25 μM of FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) stimulation (expressed by the delta max of the 340/380

fluorescent ratio of fura2-AM cytosolic probe) in Ctrl condition and after 30 min of 200 μM puromycin pretreatment. (C,D) Mitochondrial Ca^{2+} rises recorded in 4mtD3cpv-positive CM electrically stimulated successively at 0.5, 1, and 2 Hz. (C) Representative time traces of mitochondrial Ca^{2+} concentration in Ctrl and after 30 min of puromycin pretreatment, expressed as YFP/CFP fluorescent ratio with a time binning of 4 (every 2.12 sec). (D) Corresponding averaged mean increase of mitochondrial Ca^{2+} concentrations at the same range of stimulation frequencies. (E) Representative time traces of calcein fluorescence from Ctrl, and 1 μM cyclosporin A (CsA)-pretreated and puromycin-pretreated CM. (F) Boxplots representing the slope of the mitochondrial calcein fluorescence decay induced by ionomycin stimulation. Data are represented as medians (except in E, mean \pm SEM) from at least three independent experiments. n = cell count. Statistics: ++ $p < 0.01$, +++ $p < 0.001$ vs. Ctrl.

To complete the study of the putative dichotomy between the TLC Ca^{2+} store (activated by puromycin) and the RyR-dependent Ca^{2+} store (sensitive to caffeine) and to evaluate their relative size, we first perfused caffeine to deplete the RyR-dependent stores, and consecutively we applied ionomycin to reveal the residual reticular Ca^{2+} pool (Figure 2D–F). The caffeine response was similar in each condition: control, puromycin, and puromycin + emetine (Figure 2D,E), corroborating our previous $[\text{Ca}^{2+}]_i$ results (Figure 1). The size of the remaining caffeine-insensitive stores was smaller in puromycin-treated cells (fluorescent ratio: 0.005) than in controls (fluorescent ratio: 0.021; Figure 2F), proof of a prior depletion of TLC-dependent store. Conversely, emetine pretreatment not only abolished the effect of puromycin, but also triggered a larger increase (fluorescent ratio: 0.056) in the remaining Ca^{2+} stock compared to control CM (Figure 2F). This suggests that the inhibition of the reticular Ca^{2+} leak via TLC enhanced the concentration of this Ca^{2+} pool. Interestingly, we have previously shown similar results using human cancerous prostatic cells where the chronic inhibition of TLC caused an increase in the reticular Ca^{2+} concentration [25]. In order to sustain our results, we alternatively used pactamycin, another pharmacological Ca^{2+} leak inducer via TLC, and showed comparable effects on SR Ca^{2+} content (Figure S3).

It is common knowledge that reticular Ca^{2+} content is crucial for CM contraction, and changes in internal reticular Ca^{2+} stock could impair the excitation–contraction coupling mechanism. In order to evaluate whether TLC modulation could affect this parameter, we measured cytoplasmic Ca^{2+} transient in paced control and puromycin-pretreated CM (Figure 2G). Neither the rising slope (0.0033 vs. 0.0032 $\Delta\text{F}/\text{F}_0\cdot\text{ms}^{-1}$; Figure 2H), nor the amplitude (0.2923 vs. 0.3221 $\Delta\text{F}/\text{F}_0$; Figure 2I), nor the rate of decay (0.0102 vs. 0.0105 $\Delta\text{F}/\text{F}_0\cdot\text{ms}^{-1}$; Figure 2J) of Ca^{2+} transients were modified by puromycin pretreatment compared to the control, which goes along the line of two independent Ca^{2+} stores.

In summary, our data illustrated that the well-known caffeine store cohabits with the brand new puromycin-sensitive store in primary mouse CM, which is in agreement with the work of Sleiman and colleagues [49], showing a dichotomy between cardiac endoplasmic reticulum (where protein synthesis takes place) and sarcoplasmic reticulum. Indeed, it would then be possible to have a fine $[\text{Ca}^{2+}]_i$ modulation independently of RyR pathways and by extension without modifying the excitation–contraction coupling. In future studies, it would also be interesting to look closer at the perinuclear level, a particular region enriched in both IP_3R and ribosomes, and discover how TLC activation modulates the nuclear Ca^{2+} concentration.

During ischemia, the decline of ATP synthesis impairs SERCA activity. The consequences are cytosolic Ca^{2+} oscillations due to transient release of Ca^{2+} from the reticulum. We thus investigated whether puromycin preconditioning could attenuate cytosolic Ca^{2+} overload occurring during hypoxia in non-paced cells (Figure 2K). The average increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration over hypoxia was figured out as the integrate of erratic Ca^{2+} transients above the basal cytosolic Ca^{2+} concentration. First, we visualized autonomous but erratic Ca^{2+} rises in cytosol of CM during hypoxia. Second, as reported in Figure 2L, the average increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration due to hypoxia was found to be about two times higher than the one induced by caffeine (0.7783 s^{-1} and 0.4199 s^{-1} , respectively). Third, the increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration over a 30 min hypoxia was

lowered by $\approx 64\%$ in CM pretreated with puromycin compared to control CM (0.2829 s^{-1} and 0.7783 s^{-1} , respectively). Lastly, caffeine-dependent Ca^{2+} stores after the 30 min hypoxia were similar between control and puromycin-preconditioned CM (Figure 2K,L). In addition, steady-state caffeine-dependent Ca^{2+} fluxes, estimated by the average increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration after caffeine treatment, were significantly increased after 30 min of hypoxia (Figure S4).

Taken together, our findings showed no effect of puromycin pretreatment on caffeine-dependent Ca^{2+} pool, nor, more importantly, on the excitation–contraction coupling. Furthermore, we demonstrated that the puromycin-mediated decrease in the Ca^{2+} stores was accompanied by a threefold lower increase in the cytosolic Ca^{2+} concentration during hypoxia. Finally, we found that the caffeine-sensitive Ca^{2+} store after hypoxia was similar in non-treated cells and in puromycin-treated CM, which substantiated our previous observations.

3.2. Pharmacological Modulation of TLC with Puromycin Pretreatment Affected Mitochondrial Ca^{2+} Content in Beating (But Not in Resting) CM and Slowed down the mPTP Opening

As mitochondria buffer cytoplasmic Ca^{2+} increase and as mitochondrial Ca^{2+} uptake is faster than its release [50], there is probably a progressive enhancement of Ca^{2+} into the matrix during ischemia because the threshold of mPTP opening is reached, leading to apoptosis. We then looked at whether TLC activation could modify mitochondrial Ca^{2+} homeostasis. We thus wondered whether the puromycin pretreatment could shift the steady-state Ca^{2+} content in mitochondria of CM expressing the 4mtD3cpv FRET-based sensor (Figure S5A,B). No difference could be detected when comparing the control and puromycin-pretreated CM in the resting mitochondrial Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$; fluorescent ratio: 5.185 vs. 5.087, $p = 0.1436$; Figure S5B). However, the small decrease in the ratio of fluorescence after ionomycin treatment in the absence of external Ca^{2+} (Figure S5C) revealed that the steady-state Ca^{2+} concentration was at the edge of the dynamic range of 4mtD3cpv biosensor ($K_d = 0.6 \mu\text{M}$). This could have impaired the detection of significant differences in the mitochondrial Ca^{2+} content in control and puromycin-treated CM. We therefore performed an indirect measurement of the mitochondrial Ca^{2+} content. FCCP, an ionophore used to decouple ATP synthesis from the mitochondrial respiratory chain, induced the leak of mitochondrial Ca^{2+} content, which was measured by the cytosolic fura2-AM probe ($K_d = 140\text{nM}$). Puromycin pretreatment significantly decreased mitochondrial Ca^{2+} stores by $\approx 31\%$ (fluorescent ratio: 0.0536 vs. 0.0781; Figure 3A,B), highlighting the role of TLC in the modulation of Ca^{2+} exchange between the reticulum and mitochondria.

We then measured mitochondrial Ca^{2+} fluxes in paced CM and assessed the effect of a puromycin pre-treatment (Figure 3C,D). Quantitatively, the increase of the frequency of stimulation was correlated to a steady-state mitochondrial Ca^{2+} elevation both in control and in puromycin-pretreated CM (two-way ANOVA, frequency stimulation affected the results with a p -value < 0.0001). Moreover, although $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ rose with the pacing frequency in control CM, interestingly this rise was shifted to higher frequencies of pacing in CM treated with puromycin (two-way ANOVA, $p = 0.0035$; frequency–pretreatment interaction was $F = 4.9$, $p = 0.0121$). Because no difference could be detected in cytosol (Figure 2G–J), the apparent decrease in $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$ in beating cells could be explained by a direct effect of puromycin decreasing Ca^{2+} influx from reticulum to mitochondria. To test this hypothesis, we performed a Ca^{2+} retention capacity assay (CRC is the amount of Ca^{2+} that can be sequestered by mitochondria until the permeability transition occurs) in isolated mitochondria of CM and did not find any effect of puromycin pretreatment on either the Ca^{2+} intake or mPTP opening (Figure S6). These results suggest that puromycin neither directly challenged Ca^{2+} intake by MCU nor directly opened mPTP.

We next questioned if the puromycin-mediated decrease in mitochondrial Ca^{2+} content could retard mPTP opening in living CM. We valued mPTP opening by the “calcein/cobalt” method (Figure 3E,F). Cyclosporin A (CsA), known for slowing down mPTP opening, was used as a positive control [51]. We found that mPTP opening was significantly delayed in puromycin-pretreated (0.6665 compared to control 0.8559), whereas we only observed a tendency in CsA-pretreated CM (0.7287; $p = 0.08$).

Jointly, our results point out that pharmaceutical activation of TLC enhances mitochondrial tolerance to handle Ca^{2+} by decreasing both steady-state mitochondrial Ca^{2+} content and the average Ca^{2+} level in mitochondria of beating CM. This may explain how puromycin pretreatment slowed down mPTP opening by decreasing reticular Ca^{2+} leak during ischemia and augmenting the tolerance to Ca^{2+} of mitochondria by reducing the average mitochondrial Ca^{2+} concentration. An enhanced tolerance of mitochondria to Ca^{2+} load has been revealed to be crucial to evade mPTP opening and in triggering cell death [51]. A similar proof-of-concept has been previously reported by Petrovski et al. [52], as they described the beneficial effects of thapsigargin (a SERCA pump inhibitor that induces reticular Ca^{2+} leak at low doses) in a preconditioning protocol in rats by decreasing infarct size and improving left ventricular function. However, it is obvious that SERCA inhibition will also lead to inhibition of CICR and thus prevent CM contraction [19].

3.3. Pharmacological Modulation of TLC with Puromycin Pretreatment Protected CM after In Vitro H/R, and Reduced Infarct Size in Mice Submitted to In Vivo I/R

To our knowledge, nothing is known about modulation of TLC activity during hypoxia or ischemia. First, one can assume that translation is reduced during hypoxia and it should be the same for the associated Ca^{2+} leak via TLC. Second, hypoxia triggers an increase in cytosolic Ca^{2+} concentration, partly due to a decline of ATP synthesis necessary for SERCA pumps to reuptake Ca^{2+} into the lumen. An interesting study characterized a calmoduline (CaM)-binding motif in Sec61 α [36]. Using microsomes, the authors showed that CaM closes the channel in a Ca^{2+} -dependent manner. Then, in the context of hypoxia, we may hypothesize that Ca^{2+} permeability of TLC is reduced.

In the following, we examined whether puromycin pretreatment (i.e., prior to hypoxia or ischemia) might be an effective cardioprotective strategy. CM death after hypoxia/reoxygenation (H/R) was appraised by a multilabeling flow cytometry analysis. Propidium iodide quantification was performed after 1 h 30 min hypoxia and 1 h reoxygenation with or without puromycin 200 μM pretreatment. Results highlighted a protective effect of puromycin by reducing cell mortality by $\approx 6\%$ compared to control H/R (56% vs. 62%; Figure 4A,B). Concomitantly, CM were loaded with DiI(1), MitoSOX Red, and MitoTracker Deep Red in order to respectively check the mitochondrial potential membrane, the production of ROS (reactive oxygen species), and the mitochondrial mass. No significant difference was observed between Ctrl and puromycin-treated cardiomyocytes submitted to H/R (Figure S7). This absence of effect on mitochondrial function meant that TLC activation did not worsen mitochondrial damage due to H/R but also did not improve it either, reinforcing our conclusions that TLC-conferred protection does not act directly on mitochondria but rather it is due to the modification of the reticular Ca^{2+} homeostasis.

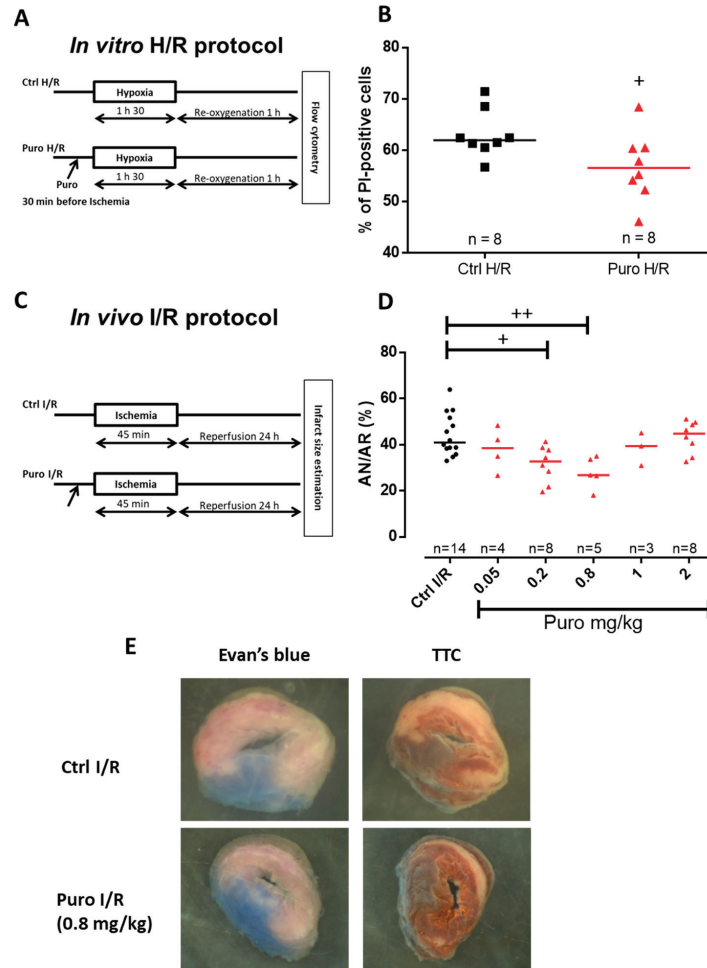


Figure 4. In vitro and in vivo CM protection by puromycin pretreatment after ischemia/reperfusion. (A) Experimental design representing ischemia-like hypoxia/reoxygenation (H/R) protocols achieved in isolated adult mouse CM. (B) Scatter plots showing mortality of CM subjected to H/R (Ctrl H/R) or CM concomitantly subjected to H/R and a 200 μ M puromycin pretreatment (puro H/R). Evaluation of CM mortality was assessed via propidium iodide (PI) staining. (C) Experimental design showing the I/R protocols performed in mice by a blind test comparing different concentration of puromycin. (D) Scatter plots representing individual I/R mouse by the percentage of necrosis area (AN) over area-at-risk (AR). *n* = number of animals. Statistics: + *p* < 0.05, ++ *p* < 0.01 vs. Ctrl H/R. (E) Representative images of Evan's blue- and triphenyltetrazolium chloride (TTC)-stained hearts from Ctrl I/R and Puro I/R mice.

Because TLC stimulation by puromycin enhanced cell survival when submitted to H/R, we assessed its putative protective action in an in vivo mouse model of myocardial I/R preconditioned or not with puromycin. In order to optimize the treatment efficiency, we performed dose-effect experiments. Infarct size estimation was figured out after 45 min ischemia and 24 h reperfusion (Figure 4C). Optimal preconditioning was obtained with a 0.8 mg/kg puromycin treatment and showed a reduction of

≈34.5% in infarct size compared to control mice (Figure 4D,E). Higher puromycin concentrations failed to protect mouse heart. It is important to notice that neither blood pressure nor heart frequency were modified at the optimal dose of 0.8 mg/kg puromycin (Figure S8).

In brief, these last results underlined the fact that CM death can be partly prevented during ischemia by a moderate reticular Ca^{2+} depletion via TLC activation, which in turn might decrease Ca^{2+} toxicity in both cytosol and mitochondria. One can easily imagine that TLC activation, prior to ischemia, increases the reticular Ca^{2+} leak. In turn, it might cause a mild ER stress, from which there is growing evidence that it contributes to protect CM from cell death [53].

4. Conclusions

Our results showed for the first time that the modulation of TLC-dependent reticular Ca^{2+} store is correlated with the modulation of several processes involved in cell fate—mitochondrial tolerance for cytoplasmic Ca^{2+} increase, mPTP opening, and tilting the cell balance on the side of cell survival. In fact, most studies on CM protection during ischemia/reperfusion relied on avoidance of mitochondria death and emphasized the concept of direct inhibition of mPTP. We believe that the multiple consequences of the decrease in reticular Ca^{2+} content could induce a robust cardioprotective effect, less prone to individual fluctuations. Even though our results rely on pre-activation of TLC, that is, I/R preconditioning, and cannot be used during myocardial infarction, this study opens new perspectives on Ca^{2+} modulation that could be useful for further investigations on postconditioning, thus broadening future therapeutic possibilities.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/5/1319/s1>, Figure S1: TLC expression in CM. Figure S2: TLC activation by puromycin did not modify the IP3R-dependant reticular Ca^{2+} stock. Figure S3: Similar effect for puromycin and pactamycin of cellular Ca^{2+} concentration. Figure S4: Cytosolic Ca^{2+} caffeine-induced release in control condition and after hypoxia. Figure S5: Mitochondrial Ca^{2+} concentration measured with 4mtD3cpv. Figure S6: CRC measurement. Figure S7: Puromycin pretreatment did not modify the mitochondrial function in CM after in vitro hypoxia/reoxygenation (H/R) protocol. Figure S8: Puromycin treatment at 0.8mg/kg had no effect on blood pressure and heart frequency.

Author Contributions: Conceptualization, R.A.-M., G.B., S.D., and F.V.C.; data curation, S.D. and F.V.C.; formal analysis, R.A.-M., M.D., N.T., B.P., Y.G., C.V., Z.H., A.P., C.C.D.S., G.B., and S.D.; funding acquisition, M.O. and F.V.C.; investigation R.A.-M., M.D., N.T., L.P., B.P., Y.G., Z.H., A.P., C.C.D.S., and S.D.; methodology, R.A.-M., M.D., N.T., S.D., and F.V.C.; project administration, S.D. and F.V.C.; resources, M.O.; supervision, M.O., G.B., S.D., and F.V.C.; validation, R.A.-M., M.D., N.T., S.D., and F.V.C.; visualization, S.D.; writing—original draft, R.A.-M., G.B., S.D., and F.V.C.; writing—review and editing, M.D., N.T., Y.G., and C.C.D.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors thank IDRS (Institut de Recherche Servier) Servier Laboratories and INSERM (Institut national de la santé et de la recherche médicale) for the financing of this project (132484/BR/VO-Réf INSERM: 131589A10). This study was supported by the IHU OPERA (ANR-10-IBHU-004) within the program “Investissements d’Avenir” of the French National Research Agency (ANR).

Acknowledgments: The authors address special thanks for Ludovic Gomez, Mélanie Paillard, Rania Harisseh, and Muhammad Rizwan Alam for their precious help and advice.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Sztark, F.; Payen, J.F.; Piriou, V.; Rigoulet, M.; Ventura-Clapier, R.; Mazat, J.P.; Leverve, X.; Janvier, G. Cellular energy metabolism: Physiologic and pathologic aspects. *Ann. Fr. D’anesthésie Reanim.* **1999**, *18*, 261–269. [[CrossRef](#)]
2. Nabel, E.G.; Braunwald, E. A tale of coronary artery disease and myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 54–63. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chouchani, E.T.; Pell, V.R.; Gaude, E.; Aksentijević, D.; Sundier, S.Y.; Robb, E.L.; Logan, A.; Nadtochiy, S.M.; Ord, E.N.J.; Smith, A.C.; et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* **2014**, *515*, 431–435. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Saini, H.K.; Dhalla, N.S. Defective calcium handling in cardiomyocytes isolated from hearts subjected to ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2005**, *288*, H2260–H2270. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Buja, L.M. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovasc. Pathol.* **2005**, *14*, 170–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Santulli, G.; Xie, W.; Reiken, S.R.; Marks, A.R. Mitochondrial calcium overload is a key determinant in heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 11389–11394. [[CrossRef](#)]
7. Jennings, R.B.; Sommers, H.M.; Smyth, G.A.; Flack, H.A.; Linn, H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch. Pathol.* **1960**, *70*, 68–78.
8. Ferdinandy, P.; Hausenloy, D.J.; Heusch, G.; Baxter, G.F.; Schulz, R. Interaction of risk factors, comorbidities, and comedications with ischemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning, and remote conditioning. *Pharmacol. Rev.* **2014**, *66*, 1142–1174. [[CrossRef](#)]
9. Paillard, M.; Tubbs, E.; Thiebaut, P.-A.; Gomez, L.; Fauconnier, J.; Da Silva, C.C.; Teixeira, G.; Mewton, N.; Belaidi, E.; Durand, A.; et al. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation* **2013**, *128*, 1555–1565. [[CrossRef](#)]
10. Gomez, L.; Thiebaut, P.-A.; Paillard, M.; Ducreux, S.; Abrial, M.; Crola Da Silva, C.; Durand, A.; Alam, M.R.; Van Coppenolle, F.; Sheu, S.-S.; et al. The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3 β during reperfusion injury. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 313–322. [[CrossRef](#)]
11. Schwaller, B. The Regulation of a Cell's Ca²⁺ Signaling Toolkit: The Ca²⁺ Homeostasome. In *Calcium Signaling*; Islam, M.d.S., Ed.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 2012; Volume 740, pp. 1–25. ISBN 978-94-007-2888-2.
12. Sammels, E.; Parys, J.B.; Missiaen, L.; De Smedt, H.; Bultynck, G. Intracellular Ca²⁺ storage in health and disease: A dynamic equilibrium. *Cell Calcium* **2010**, *47*, 297–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Fearnley, C.J.; Roderick, H.L.; Bootman, M.D. Calcium Signaling in Cardiac Myocytes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a004242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hausenloy, D.J.; Barrabes, J.A.; Botker, H.E.; Davidson, S.M.; Di Lisa, F.; Downey, J.; Engstrom, T.; Ferdinandy, P.; Carbrera-Fuentes, H.A.; Heusch, G.; et al. Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: A 30 year voyage of discovery. *Basic Res. Cardiol.* **2016**, *111*, 70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Teixeira, G.; Chiari, P.; Fauconnier, J.; Abrial, M.; Couture-Lepetit, E.; Harisseh, R.; Pillot, B.; Lacampagne, A.; Tourneur, Y.; Gharib, A.; et al. Involvement of Cyclophilin D and Calcium in Isoflurane-induced Preconditioning. *Anesthesiology* **2015**, *123*, 1374–1384. [[CrossRef](#)]
16. Hall, A.R.; Burke, N.; Dongworth, R.K.; Kalkhoran, S.B.; Dyson, A.; Vicencio, J.M.; Dorn, G.W.; Yellon, D.M.; Hausenloy, D.J. Hearts deficient in both Mfn1 and Mfn2 are protected against acute myocardial infarction. *Cell Death Dis.* **2016**, *7*, e2238. [[CrossRef](#)]
17. Cung, T.-T.; Morel, O.; Cayla, G.; Rioufol, G.; Garcia-Dorado, D.; Angoulvant, D.; Bonnefoy-Cudraz, E.; Guérin, P.; Elbaz, M.; Delarche, N.; et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1021–1031. [[CrossRef](#)]
18. Lang, S.; Erdmann, F.; Jung, M.; Wagner, R.; Cavalie, A.; Zimmermann, R. Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels* **2011**, *5*, 228–235. [[CrossRef](#)]
19. Tyedmers, J.; Lerner, M.; Bies, C.; Dudek, J.; Skowronek, M.H.; Haas, I.G.; Heim, N.; Nastainczyk, W.; Volkmer, J.; Zimmermann, R. Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 7214–7219. [[CrossRef](#)]
20. Hamman, B.D.; Chen, J.C.; Johnson, E.E.; Johnson, A.E. The aqueous pore through the translocon has a diameter of 40–60 Å during cotranslational protein translocation at the ER membrane. *Cell* **1997**, *89*, 535–544. [[CrossRef](#)]
21. Tinker, A.; Williams, A.J. Probing the structure of the conduction pathway of the sheep cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-release channel with permeant and impermeant organic cations. *J. Gen. Physiol.* **1993**, *102*, 1107–1129. [[CrossRef](#)]
22. Mead, F.; Williams, A.J. Block of the ryanodine receptor channel by neomycin is relieved at high holding potentials. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1953–1963. [[CrossRef](#)]
23. Lindsay, A.R.; Manning, S.D.; Williams, A.J. Monovalent cation conductance in the ryanodine receptor-channel of sheep cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *J. Physiol.* **1991**, *439*, 463–480. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Alder, N.N.; Shen, Y.; Brodsky, J.L.; Hendershot, L.M.; Johnson, A.E. The molecular mechanisms underlying BiP-mediated gating of the Sec61 translocon of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **2005**, *168*, 389–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Hammadi, M.; Oulidi, A.; Gackière, F.; Katsogiannou, M.; Slomianny, C.; Roudbaraki, M.; Dewailly, E.; Delcourt, P.; Lepage, G.; Lotteau, S.; et al. Modulation of ER stress and apoptosis by endoplasmic reticulum calcium leak via translocon during unfolded protein response: Involvement of GRP78. *FASEB J.* **2013**, *27*, 1600–1609. [[CrossRef](#)]
26. Ménétret, J.-F.; Hegde, R.S.; Aguiar, M.; Gygi, S.P.; Park, E.; Rapoport, T.A.; Akey, C.W. Single copies of Sec61 and TRAP associate with a non-translating mammalian ribosome. *Structure* **2008**, *16*, 1126–1137. [[CrossRef](#)]
27. Becker, T.; Bhushan, S.; Jarasch, A.; Armache, J.-P.; Funes, S.; Jossinet, F.; Gumbart, J.; Mielke, T.; Berninghausen, O.; Schulten, K.; et al. Structure of Monomeric Yeast and Mammalian Sec61 Complexes Interacting with the Translating Ribosome. *Science* **2009**, *326*, 1369–1373. [[CrossRef](#)]
28. Roy, A.; Wonderlin, W.F. The Permeability of the Endoplasmic Reticulum Is Dynamically Coupled to Protein Synthesis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4397–4403. [[CrossRef](#)]
29. Lang, S.; Benedix, J.; Fedeles, S.V.; Schorr, S.; Schirra, C.; Schäuble, N.; Jalal, C.; Greiner, M.; Haßdenteufel, S.; Tatzelt, J.; et al. Different effects of Sec61 α , Sec62 and Sec63 depletion on transport of polypeptides into the endoplasmic reticulum of mammalian cells. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 1958–1969. [[CrossRef](#)]
30. Lomax, R.B.; Camello, C.; Van Coppenolle, F.; Petersen, O.H.; Tepikin, A.V. Basal and physiological Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum of pancreatic acinar cells. Second messenger-activated channels and translocons. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 26479–26485. [[CrossRef](#)]
31. Coppenolle, F.V.; Abeele, F.V.; Slomianny, C.; Flourakis, M.; Hesketh, J.; Dewailly, E.; Prevarskaya, N. Ribosome-translocon complex mediates calcium leakage from endoplasmic reticulum stores. *J. Cell Sci.* **2004**, *117*, 4135–4142. [[CrossRef](#)]
32. Flourakis, M.; Van Coppenolle, F.; Lehen'kyi, V.; Beck, B.; Skryma, R.; Prevarskaya, N. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation. *FASEB J.* **2006**, *20*, 1215–1217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Paredes, R.M.; Bollo, M.; Holstein, D.; Lechleiter, J.D. Luminal Ca²⁺ depletion during the unfolded protein response in *Xenopus* oocytes: Cause and consequence. *Cell Calcium* **2013**, *53*, 286–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Layhadi, J.A.; Fountain, S.J. Influence of ER leak on resting cytoplasmic Ca²⁺ and receptor-mediated Ca²⁺ signalling in human macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *487*, 633–639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Giunti, R.; Gamberucci, A.; Fulceri, R.; Bánhegyi, G.; Benedetti, A. Both translocon and a cation channel are involved in the passive Ca²⁺ leak from the endoplasmic reticulum: A mechanistic study on rat liver microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, *462*, 115–121. [[CrossRef](#)]
36. Erdmann, F.; Schäuble, N.; Lang, S.; Jung, M.; Honigmann, A.; Ahmad, M.; Dudek, J.; Benedix, J.; Harsman, A.; Kopp, A.; et al. Interaction of calmodulin with Sec61 α limits Ca²⁺ leakage from the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* **2011**, *30*, 17–31. [[CrossRef](#)]
37. Cassel, R.; Ducreux, S.; Alam, M.R.; Dingreville, F.; Berlé, C.; Burda-Jacob, K.; Chauvin, M.A.; Chikh, K.; Païta, L.; Al-Mawla, R.; et al. Protection of Human Pancreatic Islets from Lipotoxicity by Modulation of the Translocon. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0148686. [[CrossRef](#)]
38. Linxweiler, M.; Schick, B.; Zimmermann, R. Let's talk about Secs: Sec61, Sec62 and Sec63 in signal transduction, oncology and personalized medicine. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2017**, *2*, 17002. [[CrossRef](#)]
39. Linxweiler, M.; Schorr, S.; Schäuble, N.; Jung, M.; Linxweiler, J.; Langer, F.; Schäfers, H.-J.; Cavalié, A.; Zimmermann, R.; Greiner, M. Targeting cell migration and the endoplasmic reticulum stress response with calmodulin antagonists: A clinically tested small molecule phenocopy of SEC62 gene silencing in human tumor cells. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 574. [[CrossRef](#)]
40. Lu, Z.; Zhou, L.; Killela, P.; Rasheed, A.B.; Di, C.; Poe, W.E.; McLendon, R.E.; Bigner, D.D.; Nicchitta, C.; Yan, H. Glioblastoma Proto-Oncogene SEC61y Is Required for Tumor Cell Survival and Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 9105–9111. [[CrossRef](#)]
41. Lang, S.; Pfeffer, S.; Lee, P.-H.; Cavalié, A.; Helms, V.; Förster, F.; Zimmermann, R. An Update on Sec61 Channel Functions, Mechanisms, and Related Diseases. *Front. Physiol.* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)]
42. Palmer, A.E.; Tsien, R.Y. Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 1057–1065. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

43. Greensmith, D.J. Ca analysis: An Excel based program for the analysis of intracellular calcium transients including multiple, simultaneous regression analysis. *Comput. Methods Programs Biomed.* **2014**, *113*, 241–250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hom, J.R.; Quintanilla, R.A.; Hoffman, D.L.; de Mesy Bentley, K.L.; Molkenin, J.D.; Sheu, S.-S.; Porter, G.A. The permeability transition pore controls cardiac mitochondrial maturation and myocyte differentiation. *Dev. Cell* **2011**, *21*, 469–478. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Petronilli, V.; Miotto, G.; Canton, M.; Brini, M.; Colonna, R.; Bernardi, P.; Di Lisa, F. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys. J.* **1999**, *76*, 725–734. [[CrossRef](#)]
46. Paccalet, A.; Tessier, N.; Paillard, M.; Païta, L.; Gomez, L.; Gallo-Bona, N.; Chouabe, C.; Léon, C.; Badawi, S.; Harhous, Z.; et al. An innovative sequence of hypoxia-reoxygenation on adult mouse cardiomyocytes in suspension to perform multilabeling analysis by flow cytometry. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2019**, *318*, C439–C447. [[CrossRef](#)]
47. Amer, M.S.; Li, J.; O'Regan, D.J.; Steele, D.S.; Porter, K.E.; Sivaprasadarao, A.; Beech, D.J. Translocon closure to Ca²⁺ leak in proliferating vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2009**, *296*, H910–H916. [[CrossRef](#)]
48. Eisner, D.A.; Caldwell, J.L.; Kistamas, K.; Trafford, A.W. Calcium and Excitation–Contraction Coupling in the Heart. *Circ. Res.* **2017**, *121*, 181–195. [[CrossRef](#)]
49. Sleiman, N.H.; McFarland, T.P.; Jones, L.R.; Cala, S.E. Transitions of protein traffic from cardiac ER to junctional SR. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *81*, 34–45. [[CrossRef](#)]
50. Hajnóczky, G.; Csordás, G.; Madesh, M.; Pacher, P. The machinery of local Ca²⁺ signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. *J. Physiol.* **2000**, *529*, 69–81. [[CrossRef](#)]
51. Bochaton, T.; Crola-Da-Silva, C.; Pillot, B.; Villedieu, C.; Ferreras, L.; Alam, M.R.; Thibault, H.; Strina, M.; Gharib, A.; Ovize, M.; et al. Inhibition of myocardial reperfusion injury by ischemic postconditioning requires sirtuin 3-mediated deacetylation of cyclophilin D. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **2015**, *84*, 61–69. [[CrossRef](#)]
52. Petrovski, G.; Das, S.; Juhasz, B.; Kertesz, A.; Tosaki, A.; Das, D.K. Cardioprotection by endoplasmic reticulum stress-induced autophagy. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 2191–2200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Liu, M.; Chen, Z.; Chen, L. Endoplasmic reticulum stress: A novel mechanism and therapeutic target for cardiovascular diseases. *Acta Pharmacol. Sin.* **2016**, *37*, 425–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.2. Simultaneous assessment of microcalcifications and morphological criteria of vulnerability in carotid artery plaque using hybrid ^{18}F -NaF PET/MRI.

a) *Introduction*

Le but de cette étude était l'apport potentiel d'une analyse de la micro-calcification et de la vulnérabilité de la plaque d'athérosclérose par tomographie par émission de positrons couplée à l'imagerie par résonance magnétique en utilisant le marqueur ^{18}F -sodium fluoride. Cette étude incluant 12 patients a montré que cette technique était un bon adjuvant aux techniques actuelles afin de mieux définir et prédire la vulnérabilité de la plaque. Dans cette étude j'ai réalisé le dosage de PPA1 par la méthode d'ELISA.



Simultaneous assessment of microcalcifications and morphological criteria of vulnerability in carotid artery plaque using hybrid ^{18}F -NaF PET/MRI

Laura Mechtouff,^{a,b} Monica Sigovan,^{c,d} Philippe Douek,^{c,d,e} Nicolas Costes,^f Didier Le Bars,^{f,g} Adeline Mansuy,^h Julie Haesebaert,ⁱ Alexandre Bani-Sadr,^j Jérémie Tordo,^j Patrick Feugier,^k Antoine Millon,^k Stéphane Luong,^e Salim Si-Mohamed,^e Diane Collet-Benzaquen,^l Emmanuelle Canet-Soulas,^b Thomas Bochaton,^b Claire Crola Da Silva,^b Alexandre Paccalet,^b David Magne,^m Yves Berthezene,^{c,n} and Norbert Nighoghossian^{a,b}

^a Stroke Department, Pierre Wertheimer Hospital, Hospices Civils de Lyon, Bron, France

^b INSERM U1060, CarMeN Laboratory, University Lyon 1, Lyon, France

^c CNRS, UMR 5220, CREATIS, University of Lyon, Lyon, France

^d INSA-Lyon UCBL, Inserm U1206, UJM-Saint Etienne, Lyon, France

^e Department of Radiology, Louis Pradel University Hospital, Bron, France

^f CERMEP - Imagerie du vivant, Lyon, France

^g ICBMS, University C. Bernard Lyon 1 & Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

^h Cellule Recherche Imagerie, Louis Pradel University Hospital, Bron, France

ⁱ Clinical Research and Epidemiology Unit, Public Health Department Hospices Civils de Lyon & Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Université Saint-Étienne, HESPER EA 7425, F-69008 Lyon, Saint-Etienne, France

^j Department of Nuclear Medicine, Lyon Sud Hospital, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

^k Vascular Surgery Department, Edouard Herriot University Hospital & Claude Bernard Lyon 1 University, Lyon, France

^l Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie pathologiques Technipath, Limonest, France

^m ICBMS, CNRS, UMR 5246, University Lyon 1, Lyon, France

ⁿ Neuroradiology Department, Pierre Wertheimer Hospital, Bron, France

Received Apr 13, 2020; accepted Aug 28, 2020

doi:10.1007/s12350-020-02400-0

Background. Previous studies have suggested the role of microcalcifications in plaque vulnerability. This exploratory study sought to assess the potential of hybrid positron-emission tomography (PET)/magnetic resonance imaging (MRI) using ^{18}F -sodium fluoride (^{18}F -NaF) to check simultaneously ^{18}F -NaF uptake, a marker of microcalcifications, and morphological criteria of vulnerability.

Methods and results. We included 12 patients with either recently symptomatic or asymptomatic carotid stenosis. All patients underwent ^{18}F -NaF PET/MRI. ^{18}F -NaF target-to-

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12350-020-02400-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

The authors of this article have provided a PowerPoint file, available for download at SpringerLink, which summarises the contents of the paper and is free for re-use at meetings and presentations. Search for the article DOI on SpringerLink.com.

The authors have also provided an audio summary of the article, which is available to download as ESM, or to listen to via the JNC/ASNC Podcast.

Reprint requests: Laura Mechtouff, Stroke Department, Pierre Wertheimer Hospital, Hospices Civils de Lyon, 59 Boulevard Pinel, 69677 Bron, France; laura.mechtouff@chu-lyon.fr 1071-3581/\$34.00

Copyright © 2020 American Society of Nuclear Cardiology.

background ratio (TBR) was measured in culprit and nonculprit (including contralateral plaques of symptomatic patients) plaques as well as in other arterial walls. Morphological criteria of vulnerability were assessed on MRI. Mineral metabolism markers were also collected. ^{18}F -NaF uptake was higher in culprit compared to nonculprit plaques (median TBR 2.6 [2.2-2.8] vs 1.7 [1.3-2.2]; $P = 0.03$) but was not associated with morphological criteria of vulnerability on MRI. We found a positive correlation between ^{18}F -NaF uptake and calcium plaque volume and ratio but not with circulating tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) activity and inorganic pyrophosphate (PPi) levels. ^{18}F -NaF uptake in the other arterial walls did not differ between symptomatic and asymptomatic patients.

Conclusions. ^{18}F -NaF PET/MRI may be a promising tool for providing additional insights into the plaque vulnerability. (J Nucl Cardiol 2020)

Key Words: Carotid stenosis • Positron-Emission Tomography-Computed Tomography • Hybrid MR/PET • Sodium Fluoride • Stroke

Abbreviations	
^{18}F -NaF	^{18}F -sodium fluoride
AP	Alkaline phosphatase
BMI	Body mass index
BW	Bandwidth
CE-MRA	Contrast-enhanced
CRP	C-reactive protein
CT	Computed tomography
DUS	Doppler ultrasound
FC	Fibrous cap
FLASH	Fast-low angle shot
FOV	Field of view
IPH	Intraplaque hemorrhage
IQR	Interquartile range
LDL	Low-density lipoprotein
LRNC	Lipid-rich necrotic core
MR	Angiography
MRI	Magnetic resonance imaging
NA	Number of averages
NASCET	North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial
NIHSS	National institutes of health stroke scale
PET	Positron-emission tomography
PPi	Inorganic pyrophosphate
ROI	Region of interest
SD	Standard Deviation
SPAIR	Spectral attenuated inversion recovery
SUVmax	Maximum standard uptake value
TE	Echo time
TBR	Target-to-background ratio
TIA	Transient ischemic attack
TNAP	Tissue-nonspecific alkaline phosphatase
TOF	Time-of-flight angiography
TR	Repetition time
VSMC	Vascular smooth muscle cell

INTRODUCTION

Atherosclerotic stenosis of the extracranial carotid artery accounts for 15 to 20% of ischemic strokes.¹ Beyond the degree of stenosis, plaque vulnerability and subsequent thromboembolic events are related to a combination of factors that include a large lipid-rich necrotic core (LRNC), a thinning/ruptured fibrous cap (FC), an intraplaque hemorrhage (IPH), and inflammatory processes.^{2,3} Identifying high-risk plaques is therefore critical for improving both risk prediction and prevention of ischemic stroke.

The formation and progression of atherosclerotic plaques are a dynamic process that includes macrophage-driven inflammation and calcifications, two related but distinct processes. Until now, in vivo exploration of plaque inflammatory processes has been mostly explored by the use of ^{18}F -fluorodesoxyglucose (^{18}F -FDG), a known marker of vascular macrophage burden.⁴⁻⁹ ^{18}F -sodium fluoride (^{18}F -NaF) positron-emission tomography (PET) has recently been proposed as a technique to detect microcalcifications, a key component of the inflammatory process within plaques.¹⁰ The use of this latter radiotracer adds additional information as evidenced by the fact that arterial ^{18}F -FDG retention is not correlated with arterial ^{18}F -NaF uptake.¹¹⁻¹³ Studies on coronary arteries have shown that ^{18}F -NaF uptake was higher in culprit lesions of acute myocardial infarction than in nonculprit lesions.^{14,15} Other studies found that ^{18}F -NaF uptake localized high-risk plaques in asymptomatic patients using optical coherence tomography, intravascular ultrasound, and coronary computed tomography angiography.^{16,17} In carotid arteries, results of preliminary studies using ^{18}F -NaF-PET/computed tomography (CT) have suggested an association between ^{18}F -NaF uptake and the symptomatic nature of carotid plaques.^{11,14,15,18-21}

Among the noninvasive imaging techniques available today, carotid plaque MRI is able to detect

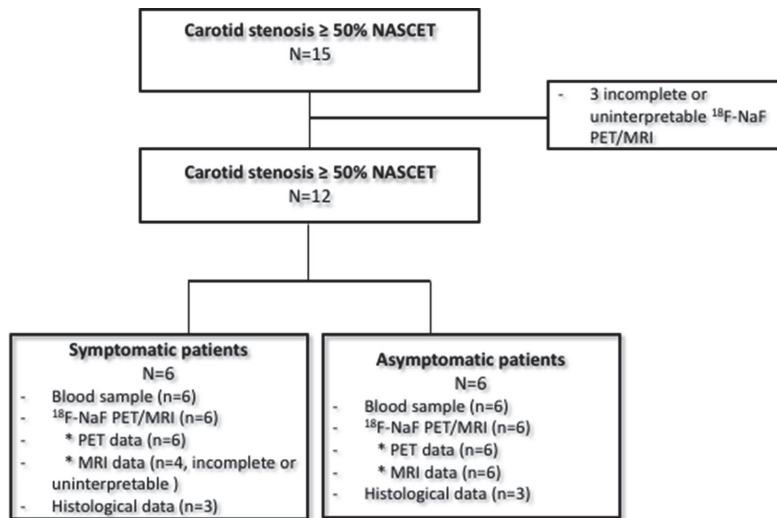


Figure 1. Study flow diagram (NASCET: North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial, ^{18}F -NaF PET/MRI PET: ^{18}F -sodium fluoride positron-emission tomography/magnetic resonance).

morphological changes underlying plaque vulnerability with moderate-to-good sensitivity and specificity compared to histological findings.^{22,23} Thus, hybrid ^{18}F -NaF PET/MRI is able to simultaneously assess ^{18}F -NaF uptake, a marker of microcalcifications, and morphological criteria of vulnerability and may therefore provide additional insights into plaque vulnerability.

Experimental studies have demonstrated that tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) is a key determinant of tissue calcification.²⁴ In hydrolyzing inorganic pyrophosphate (PPi), one of the main inhibitors of calcification, it contributes to the formation of hydroxyapatite crystals. Higher levels of serum alkaline phosphatase (AP) are associated with the increased risk of all-cause and cardiovascular mortality among survivors of myocardial infarction or stroke and in a general population sample.^{25,26}

The aim of this study was to investigate if ^{18}F -NaF uptake—assessed using hybrid ^{18}F -NaF PET/MRI—differed between culprit and nonculprit carotid plaques. Secondary aim ignored the symptomatic nature of the plaque and compared TBR and morphological criteria of vulnerability on MRI or mineral metabolism markers (TNAP and PPi). We also compared ^{18}F -NaF uptake in other arterial walls in symptomatic and asymptomatic patients.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

Patients were prospectively recruited between January 2016 and December 2017 from the stroke department and the department of vascular surgery in Lyon, France. Patients with carotid stenosis ($\geq 50\%$ according to the North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial (NASCET) criteria) were included and classified as symptomatic (transient ischemic attack (TIA) or minor stroke ≤ 15 days) or asymptomatic.²⁷ Culprit plaques were plaques recently responsible for ipsilateral transient ischemic attack or minor stroke ≤ 15 days. Nonculprit plaques were contralateral plaques of symptomatic patients and plaques of asymptomatic patients. Indication for carotid endarterectomy was decided by a surgeon expert panel according to current guidelines.²⁸ Exclusion criteria were ongoing pregnancy, severe renal failure (estimated glomerular filtration rate by the Cockcroft-Gault formula < 50 ml/min), metallic implants, and severe claustrophobia.

Clinical history, common risk factors, Doppler ultrasound (US), CT angiography data including calcium volume and ratio into the plaque, and routine biological markers drawn the same day including calcemia, phosphoremia, and C-reactive protein (CRP)

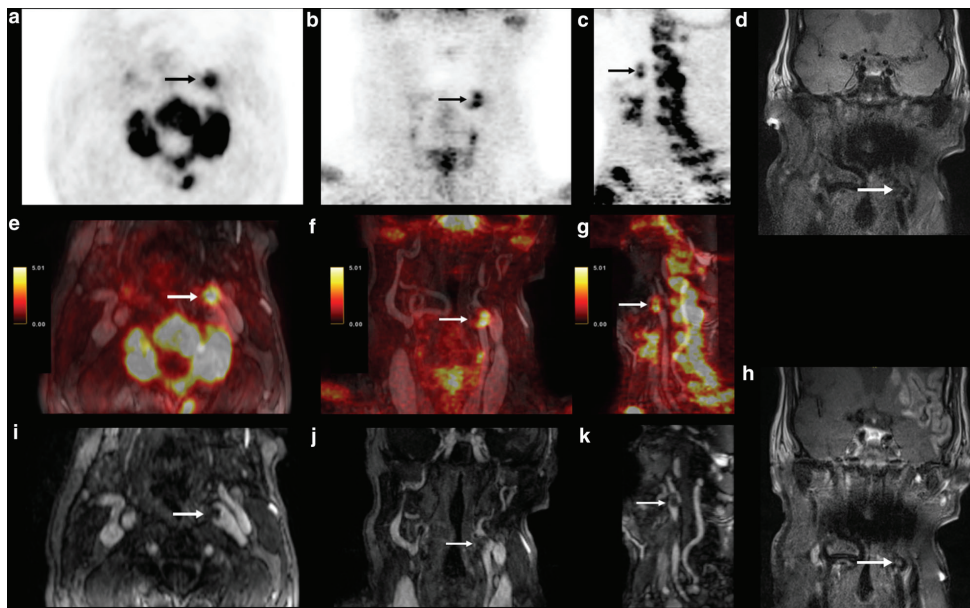


Figure 2. ^{18}F -sodium fluoride positron-emission tomography/magnetic resonance (^{18}F -NaF PET/MRI) PET/MRI from a 59-year-old patient (No. 11) who experienced right hemiparesis and aphasia related to left middle cerebral artery territory infarct. Axial, coronal, and sagittal views of PET (A–C) showing ^{18}F -NaF uptake into the left carotid plaque (black arrow). Axial, coronal, and sagittal views of merged PET/MRI (E–G) images showing ^{18}F -NaF uptake overlaid on the T1-w images (black arrow); Axial, coronal, and sagittal views of contrast-enhanced angiography (I–K) showing an eccentric plaque of the left carotid artery causing a luminal stenosis; Coronal T1-weighted MR images pre- and post-gadolinium showing a macrocalcification and a focal enhancement of the plaque (D, H).

were collected. When carotid endarterectomy was indicated, histological analyses of the plaques were performed.

The study protocol was registered at the ClinicalTrials.gov online database (NCT02726984), with the approval of the local research ethics committee in accordance with the declaration of Helsinki. All patients provided written informed consent before enrollment.

^{18}F -NaF PET-MRI

PET/MRI Protocol All patients underwent PET/MRI. The 15 min PET acquisition was centered on the carotid arteries and was performed 60 min after injection of 3 MBq/kg of ^{18}F -NaF.

The 3T MR multi-contrast protocol consisted of a 3D time-of-flight angiography (TOF), a 3D T1-weighted

variable flip angle turbo spin echo (SPACE) sequence, and a 3D contrast-enhanced angiography (CE-MRA) performed during the first passage of 30 cm³ of a Gadolinium-based contrast agent (DOTAREM©, Guerbet, France), administered at 2 cm³/s, followed by a 10 cm³ saline flush.

The following TOF sequence was performed: repetition time/echo time (TR/TE) 21.0/3.60 ms, flip angle 25°, field of view (FOV) 200 × 150 × 30 mm, slice thickness 0.7 mm, in-plane resolution 0.7 × 0.6 mm, number of averages (NA) 1, acquisition bandwidth (BW) 252 Hz/pixel, parallel imaging (GRAPPA) acceleration factor in the phase-encoding direction: 2, and scan time: approximately 3 min.

The 3D SPACE sequence was performed in the coronal orientation using a spectral attenuated inversion recovery (SPAIR) fat suppression pulse with the following parameters: TR/TE 800/22 ms, voxel 0.7 mm

Table 1. Patient baseline characteristics

	Symptomatic patients (n = 6)	Asymptomatic patients (n = 6)	P value
Age, y	72 [59-78]	72 [63-75]	0.94
Male	5 (83.3)	4 (66.7)	1.00
Qualifying event			
TIA	2 (33.3)	-	-
Ischemic stroke	4 (66.7)	-	-
Baseline NIHSS	2 [0-4]	-	-
Hypertension	5 (83.3)	3 (50)	0.55
Diabetes	1 (16.7)	1 (16.7)	0.77
Hyperlipidemia	4 (66.7)	2 (33.3)	0.57
Current smoking	1 (16.7)	1 (16.7)	1.00
BMI, kg/m ²	28.2 [25.0-29.4]	25.1 [23.0-26.9]	0.11
Coronary artery disease	1.0 (0.7)	2 (33.3)	1.00
Atrial fibrillation	2 (33.3)	0	0.45
LDL-cholesterol, g/L	1.2 [0.8-1.2]	1.3 [0.4-1.5]	0.87
CRP, mg/L	3.8 [1.2-15.0]	1.7 [0.8-3.1]	0.17
Calcemia, mmol/L	2.3 [2.1-2.3]	2.4 [2.3-2.4]	0.03
Phosphoremia, mmol/L	1.1 [0.9-1.1]	1 [1.0-1.1]	0.75
TNAP activity, nmol/min/ mg	0.08 [0.06-0.15]	0.08 [0.07-0.12]	0.75
PPI, μM	9.1 [6.8-12.2]	10.6 [7.2-14.7]	0.42

TIA transient ischemic attack; NIHSS National Institutes of Health Stroke Scale; BMI body mass index; LDL low-density lipoprotein; CRP C-reactive protein; TNAP tissue-nonspecific alkaline phosphatase; PPI inorganic pyrophosphate
Variables are displayed as absolute number (percentage of column total), mean ± SD, or median (25th-75th percentiles) as appropriate

isotropic, turbo factor 55, TSE echo spacing/shot duration 4.32/238 ms, BW 630 Hz/pixel, NA 1.4, GRAPPA acceleration factor in the phase-encoding direction: 2, and scan time of 6.16 min.

CE-MRA coronal images were acquired in the coronal orientation using a 3D T1-weighted fast low-angle shot (FLASH) sequence with the following parameters: TR/TE 3.13/1.16 ms, Field of view (FOV) 480 × 427 mm, fractional anisotropy (FA) 25°, 88 slices of 1 mm, in-plane resolution: 1.1 × 0.9 mm, GRAPPA acceleration factor in the phase-encoding direction: 2, BW 650 Hz/pixel, 3D- centric reordering with time to center of k-space: 1 s, NA 1, and scan time of 31 s. The 3D T1-weighted SPACE acquisition was repeated after contrast injection to evaluate contrast uptake in the plaque.

Image Analysis MRI was assessed for morphological criteria of vulnerability, only for plaque with stenosis ≥ 50%. The maximum standard uptake value (SUV_{max}) (the decay-corrected tissue concentration of the tracer divided by the injected dose per body weight) was measured using 3 regions of interest (ROI) centered

on the area of highest uptake in the plaque identified on coregistered PET/MRI fusion images. If there was no plaque, on the contralateral carotid, the ¹⁸F-NaF uptake in the proximal 1 cm of internal carotid artery, just distal to the bifurcation was quantified. ¹⁸F-NaF uptake was also quantified in other artery walls as aortic arch, ostium of brachiocephalic trunk, left subclavian artery, and left common carotid artery using MRI data. Blood-pool SUV was estimated as the mean of five ROIs in the mid lumen of the superior vena cava. The target-to-background ratio (TBR) was calculated by dividing SUV_{max} by the blood-pool SUV. Two experienced raters reviewed PET/MRI and estimated the ¹⁸F-NaF TBR blinded to clinical data (J. T. and A. B-S.).

Blood Sampling Protocol

A peripheral blood sample was collected from each patient the same day as the ¹⁸F-NaF PET/MRI. Sera were prepared and stored at - 80°C within a 3-h delay at the NeuroBioTec biobank (CRB-HCL: BB-0033-00046, France). All samples were thawed only once for

Table 2. Plaque imaging and histological characteristics in culprit and nonculprit plaques

	Culprit plaques (n = 6)	Non culprit plaques (n = 18)	P value
CT angiography			
Calcium volume, mm ³	462 [88-843]	105 [0-474]	0.19
Calcium volume, %	35.6 [5.3-78.9]	21.9 [0-59]	0.51
MRI			
Intraplaque hemorrhage	2 (50)	2 (11.1)	0.14
Lipid-rich necrotic core	2 (50)	3 (16.7)	0.21
Thinning and/or ruptured fibrous cap	1 (25)	5 (27.8)	1.00
¹⁸F-NaF uptake			
SUV max, g/mL	4.2 [1.8-5.9]	2.3 [1.8-3.1]	0.18
TBR	2.6 [2.2-2.8]	1.7 [1.3-2.2]	0.03
Histological exam			
Intraplaque hemorrhage	3 (100)	2 (66.7)	1.00
Lipid-rich necrotic core	3 (100)	3 (100)	-
Thinning and/or ruptured fibrous cap	3 (100)	3 (100)	-
Microcalcifications	3 (100)	3 (100)	-
Inflammatory cells	2 (66.7)	3 (100)	1.00
Neoangiogenesis	1 (33.3)	3 (100)	0.4

¹⁸F-NaF ¹⁸F-sodium fluoride; SUV standard uptake value; TBR target-to-background ratio
Variables are displayed as absolute number (percentage of column total), mean ± SD, or median (25th-75th percentiles) as appropriate

study measurements. Serum samples were diluted at 1/25. TNAP activity (nmol/min/mg) was quantified by the absorbance of para-nitrophenol generated by TNAP hydrolysis of para-nitrophenylphosphate. PP_i levels (μM) were determined by luminescence using the PP_i

light inorganic pyrophosphate assay kit from Lonza. Sensitivity was 0.02 μM.

Histological Analyses

Vessels were fixed in buffered formalin and embedded in paraffin after decalcification. Transverse sections of 3 μm were cut using a rotary microtome (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and stained with hematoxylin, phloxine, and saffron in order to analyze the following elements: lipid core, plaque hemorrhage, cap fibroatheroma (thin or thick), microcalcifications, inflammation, thrombi, and neoangiogenesis.

Statistical Analysis

This study was designed as a pilot transversal investigation. The primary analysis was the comparison of ¹⁸F-NaF TBR in carotid culprit plaques and nonculprit plaques. Secondary analysis ignored the symptomatic nature of the plaque and compared ¹⁸F-NaF TBR and morphological criteria of vulnerability on MRI as well as mineral metabolism markers. We also compared ¹⁸F-NaF TBR in the other artery walls in symptomatic and asymptomatic patients. Categorical

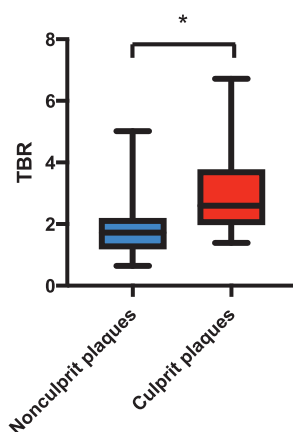


Figure 3. ¹⁸F-sodium fluoride (¹⁸F-NaF) uptake in culprit (N = 6) vs nonculprit (N = 18) plaques. Box and Whisker Plot.

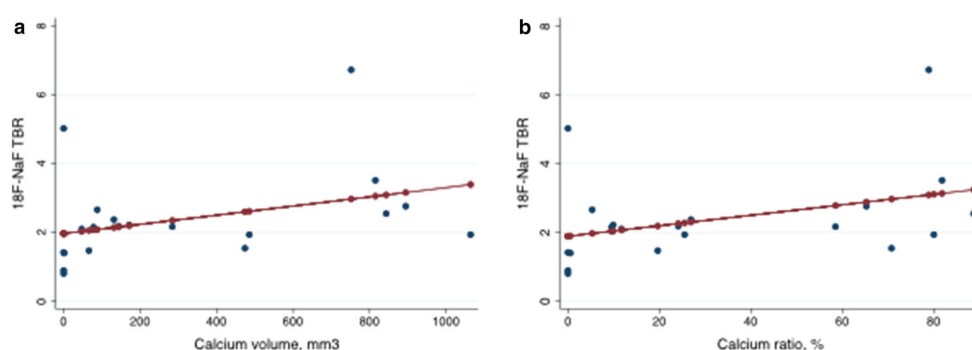


Figure 4. ^{18}F -sodium fluoride uptake with respect to calcium volume (A) and calcium ratio (B) (^{18}F -NaF, ^{18}F -sodium fluoride; TBR, target-to-background ratio). Scatter Plot.

Table 3. ^{18}F -sodium fluoride (^{18}F -NaF) uptake in other arterial walls in symptomatic and asymptomatic patients

	Symptomatic patients (n = 6)	Asymptomatic patients (n = 6)	P value
Aorta	1.0 [0.5-1.4]	1.0 [0.7-1.2]	0.81
Brachiocephalic trunk	1.4 [1.1-1.8]	1.3 [1.1-1.4]	0.52
Left subclavian artery	1.2 [1.2-1.5]	1.2 [1.0-1.3]	0.75
Left common carotid artery	1.1 [0.7-1.2]	1.0 [0.7-1.2]	0.75

Variables are displayed as median (25th–75th percentiles) Target-to-background ratio

variables are presented as numbers and relative frequencies (percentages), and continuous variables as medians with interquartile ranges (IQR). Normality of distributions was assessed graphically and with the Shapiro–Wilk test. All probability values were 2 sided, and values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. Fisher’s test was used to analyze categorical variables and the Mann–Whitney U test for continuous variables. Correlation was undertaken with Spearman’s ρ . Inter-observer reproducibility of ^{18}F -NaF uptake measurements was determined using intraclass correlation coefficient. All analyses were performed using Stata/IC (ACADEMIC/L, SCIC, L1Wi0H,E).

RESULTS

Baseline Characteristics of Patients and Plaques

Fifteen patients were included between 15/01/2016 and 11/12/2017. Three patients were excluded because

of incomplete or uninterpretable PET/MRI (Figure 1). Two others had PET imaging but incomplete or uninterpretable MRI. The final sample included 6 symptomatic and 6 asymptomatic patients. Their mean age was 68 years (± 10), and seventy-five percent of the patients were men. Among the six symptomatic patients, 4 had minor ischemic stroke and 2 had TIA. The main characteristics of the symptomatic and asymptomatic patients and the main characteristics of culprit and nonculprit plaques are presented in Tables 1 and 2 and Online Resource 1. Calcemia was slightly higher in asymptomatic patients compared to symptomatic patients (median calcemia 2.4 mmol/L [2.3-2.4] vs 2.3 mmol/L [2.1-2.3]; $P = 0.03$). Six patients, 3 symptomatic and 3 asymptomatic, underwent carotid endarterectomy through the eversion procedure. All retrieved plaques contained microcalcifications and their histological results are detailed in Table 2.

¹⁸F-NaF UPTAKE IN CULPRIT AND NONCULPRIT PLAQUES

The mean delay between symptoms and PET-MRI was 9.2 days (\pm 6.2). ¹⁸F-NaF uptake was higher in culprit plaques compared to nonculprit plaques (median TBR 2.6 [2.2-2.8] vs 1.7 [1.3-2.2]; $P = 0.03$) (Figs. 2, 3 and Table 2). Intraclass correlation coefficient was 0.98.

¹⁸F-NaF UPTAKE COMPARED WITH MORPHOLOGICAL CRITERIA OF PLAQUE VULNERABILITY ON MRI AND MINERAL METABOLISM MARKERS

¹⁸F-NaF uptake was not associated with morphological criteria of plaque vulnerability on MRI (TBR 1.80 [1.42-2.18] in plaques with IPH vs 1.93 [1.32-2.37] in plaques without IPH; $P = 1.00$; TBR 1.46 [1.45-2.14] in plaques with LRNC vs 1.93 [1.32-2.37] in plaques without LRNC; $P = 0.78$; TBR 1.45 [1.39-1.53] in plaques with thinning and/or ruptured FC vs 2.12 [1.37-2.45] in plaques without thinning and/or ruptured FC; $P = 0.18$). ¹⁸NaF uptake was correlated with calcium plaque volume ($\rho = 0.82$; $P < 0.01$) and ratio ($\rho = 0.66$; $P = 0.04$) but was not correlated with circulating TNAP activity or PPI levels (Figure 4).

¹⁸F-NaF UPTAKE IN OTHER ARTERY WALLS IN SYMPTOMATIC AND ASYMPTOMATIC PATIENTS

There was no increase of ¹⁸F-NaF uptake in the other arterial walls in symptomatic patients compared to asymptomatic patients (Table 3).

BRAIN ¹⁸F-NaF UPTAKE

In the 4 patients with stroke, intense ¹⁸F-NaF uptake was observed (median TBR = 6.2 [3.8-12.2] vs median TBR = 0.2 [0.1-0.2] for contralateral not infarcted brain; $P = 0.02$).

DISCUSSION

This pilot study was designed to evaluate for the first time the added value of ¹⁸F-NaF PET/MRI in the carotid plaques assessment, in checking simultaneously ¹⁸F-NaF uptake, a marker of microcalcifications, and morphological criteria of vulnerability on MRI. ¹⁸F-NaF uptake was higher in culprit plaques compared to nonculprit plaques in a decoupled way from morphological MRI criteria of vulnerability.

Our results confirm previous results from PET/CT studies in showing a higher ¹⁸F-NaF uptake in culprit

plaques compared to nonculprit plaques.^{11,19} Recent studies also suggested an association between ¹⁸F-NaF uptake in carotid plaque and the severity of white matter lesions on brain MRI.^{29,30} In contrast, other studies reported different results likely linked to delayed acquisition (180 min after ¹⁸F-NaF injection) or delay between symptoms and imaging longer than one month.^{18,20,21}

It is increasingly recognized that the type and location, rather than the extent, of calcifications are important in determining atherosclerotic plaque stability. Microcalcification represents the early stages of intimal calcium formation and greatly amplifies mechanical stresses on the surface of the fibrous plaque that may directly contribute to its rupture.^{31,32} Simultaneous carotid plaque MRI acquisition appears to be an effective method for assessing their particular impact on plaque vulnerability. In our study, ¹⁸F-NaF uptake was decoupled from morphological MRI criteria of vulnerability. That could be linked to the fact that microcalcifications occurred earlier in human plaque development.^{2,33} Conversely studies performed with PET/CT for carotid and coronary arteries showed that ¹⁸F-NaF uptake was higher in ruptured and high-risk atherosclerotic plaques.^{11,16,17} This discrepancy could be explained by the use of different methodological options to define vulnerable plaque.

Histological studies documented that ¹⁸F-NaF can detect vascular microcalcification activity and binds only at the surface of large macrocalcifications while CT is able to detect advanced macrocalcification deposits with a diameter of approximately 200-500 μ m.^{10,11,21} As other authors, we found that ¹⁸F-NaF uptake was associated with CT calcium volume and ratio.^{10,11,34} By contrast, TNAP activity in the serum was not associated with ¹⁸F-NaF uptake, suggesting that circulating TNAP was not involved in the deposition of microcalcifications. This conclusion is strengthened by the fact that circulating TNAP activity was not inversely correlated with PPI levels. We hypothesize that TNAP expressed locally in plaque vascular smooth muscle cells rather than circulating TNAP that participates in plaque calcification. Experiments in mice showed that whereas TNAP overexpression in vascular smooth muscle cells (VSMCs) induced lethal vascular calcification, liver-targeted TNAP overexpression that resulted in strong circulating TNAP activity had no effect.^{35,36}

PET-MRI has the added benefit of checking simultaneously neck and thorax arteries. As atherosclerosis is considered as a global inflammatory disease and generalized vulnerability may be more important overall than characterizing the individual sites of vulnerability in the individual patient, we assessed whether ¹⁸F-NaF uptake in other arteries may reflect global atherosclerotic activity and if this latter was higher in symptomatic

than in asymptomatic patients.^{37,38} This preliminary analysis failed to show any difference between symptomatic and asymptomatic patients but may be biased by the absence of coronary artery tree assessment.

As a previous study using PET/CT, we observed a ¹⁸F-NaF uptake within the cerebral infarction.¹¹ Mechanisms are not completely understood. A recent study has identified an overlap between the pathophysiology of atherosclerosis and liquefactive necrosis related to ischemia in the brain, a lipid-rich organ.³⁹ Another hypothesis is the passive transfer across the blood–brain barrier.

We recognize some limitations of our study. First, the small sample size in this exploratory study would have prevented us from drawing any statistically significant conclusions regarding the relationship between ¹⁸F-NaF uptake and morphological MRI criteria of vulnerability or circulating TNAP and PPI levels, as well as for histological data. Whether ¹⁸F-NaF PET/MRI provide additional insights on plaque vulnerability from morphological MRI criteria needs further explorations. Second, the ¹⁸F-NaF signal in the plaque may be contaminated by spillover from the spine. To limit this phenomenon, we performed a reconstruction including a point spread function model in the iterative process, which is known to enhance resolution and reduce spillover effects.⁴⁰ Furthermore, the attenuation correction with the MRI images is potentially suboptimal since the spine is not present in the computed attenuation maps.⁴¹

In our preliminary study using hybrid ¹⁸F-NaF PET/MRI, ¹⁸F-NaF uptake was higher in culprit compared to nonculprit plaques, in a decoupled way from morphological MRI criteria of vulnerability. Thus, ¹⁸F-NaF uptake may provide additional insights into the plaque vulnerability and should be considered as a potential surrogate marker of early atherosclerosis.^{2,33} The relevance of a risk score combining stenosis and plaque ¹⁸F-NaF uptake in predicting clinical events as proposed with ¹⁸F-FDG needs further explorations.⁴² This study further outlined the complex relationship between plaque activity and circulating biomarkers, confirming the importance of molecular imaging at the lesion site. It could be a relevant tool if new drugs that target microcalcifications process become available, for example, TNAP inhibitors.⁴³

NEW KNOWLEDGE GAINED

In this pilot transversal study conducted in symptomatic and asymptomatic patients with carotid stenosis, ¹⁸F-NaF uptake was higher in culprit compared to nonculprit plaques, in a decoupled way from morphological MRI criteria of vulnerability, suggesting that

hybrid ¹⁸F-NaF PET/MRI approach may be a promising tool for providing additional insights into the atherosclerotic plaque vulnerability.

Acknowledgements

We thank Thomas Troalen, application engineer Siemens Healthcare France, for his assistance in the development of the sequences used in this study, Curium for providing ¹⁸F-NaF (CISNAF 100 MBq/mL solution for injection, Cis bio international), Karen Reilly for proofreading the English, Morgane Bouin (Cellule Recherche Imagerie) for data collection and the French National ‘invest for the future’ programs: LILI – Lyon Integrated Life Imaging: hybrid MR-PET ANR-11-EQPX-0026 and CESAME - Brain and Mental Health ANR-10-IBHU-0003. Human biological samples and associated data were obtained from NeuroBioTec (CRB-HCL, Lyon France, Biobank BB-0033-00046).

Disclosure

The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding

CREATIS CNRS Lab grant.

References

- Petty GW, Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O’Fallon WM, Wiebers DO. Ischemic stroke subtypes: A population-based study of incidence and risk factors. *Stroke*. 1999;30:2513–6.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: A report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis. *Am Heart Assoc. Circ*. 1995;92:1355–74.
- Nighoghossian N, Derex L, Douek P. The vulnerable carotid artery plaque: Current imaging methods and new perspectives. *Stroke*. 2005;36:2764–72.
- Rudd JHF, Warburton EA, Fryer TD, Jones HA, Clark JC, Antoun N, et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [¹⁸F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Circulation*. 2002;105:2708–11.
- Davies JR, Rudd JHF, Fryer TD, Graves MJ, Clark JC, Kirkpatrick PJ, et al. Identification of culprit lesions after transient ischemic attack by combined ¹⁸F fluorodeoxyglucose positron-emission tomography and high-resolution magnetic resonance imaging. *Stroke*. 2005;36:2642–7.
- Tawakol A, Migrino RQ, Bashian GG, Bedri S, Vermeylen D, Cury RC, et al. In vivo ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography imaging provides a noninvasive measure of carotid plaque inflammation in patients. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1818–24.
- Marnane M, Merwick A, Sheehan OC, Hannon N, Foran P, Grant T, et al. Carotid plaque inflammation on ¹⁸F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts early stroke recurrence. *Ann Neurol*. 2012;71:709–18.
- Taqueti VR, Di Carli MF, Jerosch-Herold M, Sukhova GK, Murthy VL, Folco EJ, et al. Increased microvascularization and

- vessel permeability associate with active inflammation in human atheromata. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2014;7:920–9.
9. Chowdhury MM, Tarkin JM, Evans NR, Le E, Warburton EA, Hayes PD, et al. 18 F-FDG uptake on PET/CT in symptomatic versus asymptomatic carotid disease: A meta-analysis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2018;56:172–9.
 10. Irkle A, Vesey AT, Lewis DY, Skepper JN, Bird JLE, Dweck MR, et al. Identifying active vascular microcalcification by 18F-sodium fluoride positron emission tomography. *Nat Commun*. 2015;6:7495.
 11. Vesey AT, Jenkins WSA, Irkle A, Moss A, Sng G, Forsythe RO, et al. 18 F-Fluoride and 18 F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography after transient ischemic attack or minor ischemic stroke: Case-control study. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10:e004976.
 12. Derlin T, Toth Z, Papp L, Wisotzki C, Apostolova I, Habermann CR, et al. Correlation of inflammation assessed by 18F-FDG PET, active mineral deposition assessed by 18F-fluoride PET, and vascular calcification in atherosclerotic plaque: A dual-tracer PET/CT study. *J Nucl Med*. 2011;52:1020–7.
 13. Li X, Heber D, Gonzalez JC, Karanikas G, Mayerhoefer ME, Rasul S, et al. Association between osteogenesis and inflammation during the progression of calcified plaque evaluated by 18 F-fluoride and 18 F-FDG. *J Nucl Med*. 2017;58:968–74.
 14. Joshi NV, Vesey AT, Williams MC, Shah ASV, Calvert PA, Craighhead FHM, et al. 18F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: A prospective clinical trial. *The Lancet*. 2014;383:705–13.
 15. Adamson PD, Vesey AT, Joshi NV, Newby DE, Dweck MR. Salt in the wound: (18)F-fluoride positron emission tomography for identification of vulnerable coronary plaques. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2015;5:150–5.
 16. Lee JM, Bang J-I, Koo B-K, Hwang D, Park J, Zhang J, et al. Clinical relevance of 18 F-sodium fluoride positron-emission tomography in noninvasive identification of high-risk plaque in patients with coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Imaging*. 2017;10:e006704.
 17. Li L, Li X, Jia Y, Fan J, Wang H, Fan C, et al. Sodium-fluoride PET-CT for the non-invasive evaluation of coronary plaques in symptomatic patients with coronary artery disease: a cross-correlation study with intravascular ultrasound. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2018;45:2181–9.
 18. Quirce R, Martínez-Rodríguez I, De Arcocha Torres M, Jiménez-Bonilla JF, Banzo I, Rebollo M, et al. Contribution of 18F-sodium fluoride PET/CT to the study of the carotid atheroma calcification. *Rev Esp Med Nucl E Imagen Mol*. 2013;32:22–5.
 19. Cocker MS, Spence JD, Hammond R, Wells G, deKemp RA, Lum C, et al. [18 F]-NaF PET/CT identifies active calcification in carotid plaque. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2017;10:486–8.
 20. Zhang Y, Li H, Jia Y, Yang P, Zhao F, Wang W, et al. Noninvasive assessment of carotid plaques calcification by 18 F-sodium fluoride accumulation: Correlation with pathology. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2018;27:1796–801.
 21. Hop H, de Boer SA, Reijrink M, Kamphuisen PW, de Borst MH, Pol RA, et al. 18F-sodium fluoride positron emission tomography assessed microcalcifications in culprit and non-culprit human carotid plaques. *J Nucl Cardiol*. 2019;26:1064–75.
 22. den Hartog AG, Bovens SM, Koning W, Hendrikse J, Luijten PR, Moll FL, et al. Current status of clinical magnetic resonance imaging for plaque characterisation in patients with carotid artery stenosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2013;45:7–21.
 23. Saba L, Saam T, Jäger HR, Yuan C, Hatsukami TS, Saloner D, et al. Imaging biomarkers of vulnerable carotid plaques for stroke risk prediction and their potential clinical implications. *Lancet Neurol*. 2019;18:559–72.
 24. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch Nippon Ika Daigaku Zasshi*. 2010;77:4–12.
 25. Ryu W-S, Lee S-H, Kim CK, Kim BJ, Yoon B-W. Increased serum alkaline phosphatase as a predictor of long-term mortality after stroke. *Neurology*. 2010;75:1995–2002.
 26. Tonelli M, Curhan G, Pfeffer M, Sacks F, Thadhani R, Melamed ML, et al. Relation between alkaline phosphatase, serum phosphate, and all-cause or cardiovascular mortality. *Circulation*. 2009;120:1784–92.
 27. Barnett HJM. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. *N Engl J Med*. 1991;325:445–53.
 28. Kernan WN, Ovbiagele B, Black HR, Bravata DM, Chimowitz MI, Ezekowitz MD, et al. Guidelines for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attack: A guideline for healthcare professionals from the American heart association/american stroke Association. *Stroke*. 2014;45:2160–236.
 29. Fujimoto K, Norikane T, Yamamoto Y, Takami Y, Mitamura K, Okada M, et al. Association between carotid 18F-NaF and 18F-FDG uptake on PET/CT with ischemic vascular brain disease on MRI in patients with carotid artery disease. *Ann Nucl Med*. 2019;33:907–15.
 30. Norikane T, Yamamoto Y, Maeda Y, Okada M, Nishiyama Y. Correlation of noninvasive imaging of vulnerable carotid artery plaque using NaF and FDG PET/CT and black-blood MRI with cerebral ischemia on brain MRI. *J Nucl Med*. 2018;59:40–40.
 31. Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S, Cardoso L, Ganatos P, Virmani R, et al. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103:14678–83.
 32. Kelly-Arnold A, Maldonado N, Laudier D, Aikawa E, Cardoso L, Weinbaum S. Revised microcalcification hypothesis for fibrous cap rupture in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110:10741–6.
 33. Roijers RB, Debernardi N, Cleutjens JPM, Schurgers LJ, Mutsaers PHA, van der Vusse GJ. Microcalcifications in early intimal lesions of atherosclerotic human coronary arteries. *Am J Pathol*. 2011;178:2879–87.
 34. den Harder AM, Wolterink JM, Bartstra JW, Spiering W, Zwakenberg SR, Beulens JW, et al. Vascular uptake on 18F-sodium fluoride positron emission tomography: Precursor of vascular calcification? *J Nucl Cardiol*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s12350-020-02031-5>.
 35. Murshed M, Harmey D, Millán JL, McKee MD, Karsenty G. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev*. 2005;19:1093–104.
 36. Sheen CR, Kuss P, Narisawa S, Yadav MC, Nigro J, Wang W, et al. Pathophysiological role of vascular smooth muscle alkaline phosphatase in medial artery calcification: Role of TNAP in medial vascular calcification. *J Bone Miner Res*. 2015;30:824–36.
 37. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:2045–51.
 38. Arbab-Zadeh A, Fuster V. The Myth of the “Vulnerable Plaque”. *J Am Coll Cardiol*. 2015;65:846–55.
 39. Chung AG, Frye JB, Zbesko JC, Constantopoulos E, Hayes M, Figueroa AG, et al. Liquefaction of the brain following stroke shares a similar molecular and morphological profile with atherosclerosis and mediates secondary neurodegeneration in an osteopontin-dependent mechanism. *Eneuro*. 2018;5:ENEURO.0076.

40. Lee YS, Kim JS, Kim KM, Kang JH, Lim SM, Kim H-J. Performance measurement of PSF modeling reconstruction (True X) on siemens biograph TruePoint TrueV PET/CT. *Ann Nucl Med.* 2014;28:340–8.
41. Schramm G, Maus J, Hofheinz F, Petr J, Lougovski A, Beuthien-Baumann B, et al. Correction of quantification errors in pelvic and spinal lesions caused by ignoring higher photon attenuation of bone in [18 F]NaF PET/MR. *Med Phys.* 2015;42:6468–76.
42. Kelly PJ, Camps-Renom P, Giannotti N, Martí-Fàbregas J, McNulty JP, Baron J-C, et al. A risk score including carotid plaque inflammation and stenosis severity improves identification of recurrent stroke. *Stroke.* 2020;51:838–45.
43. Debray J, Chang L, Marquès S, Pellet-Rostaing S, Le Duy D, Mebarek S, et al. Inhibitors of tissue-nonspecific alkaline phosphatase: Design, synthesis, kinetics, biomineralization and cellular tests. *Bioorg Med Chem.* 2013;21:7981–7.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Bibliographie

1. Timmis, A. *et al.* European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur. Heart J.* **39**, 508–579 (2018).
2. Townsend, N. *et al.* Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J* **37**, 3232–3245 (2016).
3. Schaftenaar, F., Frodermann, V., Kuiper, J. & Lutgens, E. Atherosclerosis: the interplay between lipids and immune cells. *Curr. Opin. Lipidol.* **27**, 209–215 (2016).
4. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868–874 (2002).
5. Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R. & Falk, E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ. Res.* **114**, 1852–1866 (2014).
6. Thygesen, K. *et al.* Third universal definition of myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **33**, 2551–2567 (2012).
7. Timmis, A. *et al.* European Society of Cardiology: Cardiovascular Disease Statistics 2019. *Eur. Heart J.* **41**, 12–85 (2020).
8. Ibanez, B. *et al.* 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* **39**, 119–177 (2018).
9. Hamm, C. W. *et al.* [ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC)]. *G Ital Cardiol (Rome)* **13**, 171–228 (2012).
10. Jennings R. B. & Ganote C. E. Structural Changes in Myocardium During Acute Ischemia. *Circulation Research* **35**, III–156 (1974).
11. Ovize, M. *et al.* Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc. Res.* **87**, 406–423 (2010).
12. Ferrier, G. R., Moffat, M. P. & Lukas, A. Possible mechanisms of ventricular arrhythmias elicited by ischemia followed by reperfusion. Studies on isolated canine ventricular tissues. *Circ. Res.* **56**, 184–194 (1985).
13. Verma Subodh *et al.* Fundamentals of Reperfusion Injury for the Clinical Cardiologist. *Circulation* **105**, 2332–2336 (2002).
14. Yellon, D. M. & Hausenloy, D. J. Myocardial Reperfusion Injury. *New England Journal of Medicine* **357**, 1121–1135 (2007).
15. Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M. & Korthuis, R. J. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol* **7**, 113–170 (2016).
16. Kalogeris, T., Baines, C. P., Krenz, M. & Korthuis, R. J. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol* **298**, 229–317 (2012).
17. Golstein, P. & Kroemer, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 37–43 (2007).
18. Chiong, M. *et al.* Cardiomyocyte death: mechanisms and translational implications. *Cell Death & Disease* **2**, e244–e244 (2011).
19. Couzinet, A., Hérincs, Z. & Hueber, A.-O. Régulation de la mort cellulaire

- programmée : vers une conception plus dynamique. *Med Sci (Paris)* **18**, 841–852 (2002).
20. Orogo, A. M. & Gustafsson, Å. B. Cell Death in the Myocardium: My Heart Won't Go On. *IUBMB Life* **65**, 651–656 (2013).
 21. Linkermann, A. & Green, D. R. Necroptosis. *N Engl J Med* **370**, 455–465 (2014).
 22. Cabon, L., Martinez-Torres, A.-C. & Susin, S. A. La mort cellulaire programmée ne manque pas de vocabulaire. *Med Sci (Paris)* **29**, 1117–1124 (2013).
 23. Gustafsson Åsa B. & Gottlieb Roberta A. Autophagy in Ischemic Heart Disease. *Circulation Research* **104**, 150–158 (2009).
 24. Lindsey, M. L. *et al.* Guidelines for experimental models of myocardial ischemia and infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **314**, H812–H838 (2018).
 25. Ackers-Johnson, M. *et al.* A Simplified, Langendorff-Free Method for Concomitant Isolation of Viable Cardiac Myocytes and Nonmyocytes From the Adult Mouse Heart. *Circ. Res.* **119**, 909–920 (2016).
 26. Louch, W. E., Sheehan, K. A. & Wolska, B. M. Methods in cardiomyocyte isolation, culture, and gene transfer. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 288–298 (2011).
 27. Pitoulis, F. G., Watson, S. A., Perbellini, F. & Terracciano, C. M. Myocardial slices come to age: an intermediate complexity in vitro cardiac model for translational research. *Cardiovasc Res* **116**, 1275–1287 (2020).
 28. Langendorff, O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. *Pflügers Arch.* **61**, 291–332 (1895).
 29. Badawi, S. *et al.* A Dynamic Transcriptional Analysis Reveals IL-6 Axis as a Prominent Mediator of Surgical Acute Response in Non-ischemic Mouse Heart. *Front Physiol* **10**, 1370 (2019).
 30. Bøtker, H. E. *et al.* Practical guidelines for rigor and reproducibility in preclinical and clinical studies on cardioprotection. *Basic Res Cardiol* **113**, (2018).
 31. Kübler, W. & Haass, M. Cardioprotection: definition, classification, and fundamental principles. *Heart* **75**, 330–333 (1996).
 32. Gross, L., Blum, L. & Silverman, G. EXPERIMENTAL ATTEMPTS TO INCREASE THE BLOOD SUPPLY TO THE DOG'S HEART BY MEANS OF CORONARY SINUS OCCLUSION. *J Exp Med* **65**, 91–108 (1937).
 33. Keeley, E. C., Boura, J. A. & Grines, C. L. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* **361**, 13–20 (2003).
 34. Heusch, G., Bøtker, H. E., Przyklenk, K., Redington, A. & Yellon, D. Remote ischemic conditioning. *J. Am. Coll. Cardiol.* **65**, 177–195 (2015).
 35. Schmidt, M. R. *et al.* Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **292**, H1883-1890 (2007).
 36. Schultz, J. E., Rose, E., Yao, Z. & Gross, G. J. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am. J. Physiol.* **268**, H2157-2161 (1995).
 37. Schulz, R., Post, H., Vahlhaus, C. & Heusch, G. Ischemic preconditioning in pigs: a graded phenomenon: its relation to adenosine and bradykinin. *Circulation* **98**, 1022–1029 (1998).
 38. Ytrehus, K., Liu, Y. & Downey, J. M. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am. J. Physiol.* **266**, H1145-1152 (1994).
 39. Miller, D. L. & Van Winkle, D. M. Ischemic preconditioning limits infarct size following regional ischemia-reperfusion in in situ mouse hearts. *Cardiovasc. Res.* **42**, 680–684 (1999).

40. Ovize, M. *et al.* Preconditioning reduces infarct size but accelerates time to ventricular fibrillation in ischemic pig heart. *Am. J. Physiol.* **269**, H72-79 (1995).
41. Tomai Fabrizio, Crea Filippo, Chiariello Luigi, & Giofrè Pier A. Ischemic Preconditioning in Humans. *Circulation* **100**, 559–563 (1999).
42. Yellon, D. M., Alkhulaifi, A. M. & Pugsley, W. B. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* **342**, 276–277 (1993).
43. Steiger, H.-J. & Hänggi, D. Ischaemic preconditioning of the brain, mechanisms and applications. *Acta Neurochir (Wien)* **149**, 1–10 (2007).
44. Menting, T. P. *et al.* Ischaemic preconditioning for the reduction of renal ischaemia reperfusion injury. *Cochrane Database Syst Rev* **3**, CD010777 (2017).
45. Kin, H. *et al.* Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc. Res.* **62**, 74–85 (2004).
46. Yang, X.-M. *et al.* Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J. Am. Coll. Cardiol.* **44**, 1103–1110 (2004).
47. Skyschally Andreas *et al.* Ischemic Postconditioning in Pigs. *Circulation Research* **104**, 15–18 (2009).
48. Kaljusto, M.-L. *et al.* Postconditioning in rats and mice. *Scand. Cardiovasc. J.* **40**, 334–341 (2006).
49. Zhao, Z.-Q. *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **285**, H579-588 (2003).
50. Staat, P. *et al.* Postconditioning the human heart. *Circulation* **112**, 2143–2148 (2005).
51. Verouhis, D. *et al.* Effect of remote ischemic conditioning on infarct size in patients with anterior ST-elevation myocardial infarction. *Am. Heart J.* **181**, 66–73 (2016).
52. Hausenloy, D. J. *et al.* Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind randomised controlled trial. *The Lancet* **394**, 1415–1424 (2019).
53. Schulman, D., Latchman, D. S. & Yellon, D. M. Urocortin protects the heart from reperfusion injury via upregulation of p42/p44 MAPK signaling pathway. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* **283**, H1481–H1488 (2002).
54. Bell, R. M. & Yellon, D. M. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of PI3K, Akt and eNOS. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 185–193 (2003).
55. Bell, R. M. & Yellon, D. M. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 508–515 (2003).
56. Hausenloy, D. J., Tsang, A. & Yellon, D. M. The reperfusion injury salvage kinase pathway: a common target for both ischemic preconditioning and postconditioning. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 69–75 (2005).
57. Hausenloy, D. J. & Yellon, D. M. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc. Res.* **61**, 448–460 (2004).
58. Yellon, D. M. & Baxter, G. F. Reperfusion injury revisited: is there a role for growth factor signaling in limiting lethal reperfusion injury? *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 245–249 (1999).
59. Juhaszova, M. *et al.* Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest* **113**, 1535–

1549 (2004).

60. Lecour, S. *et al.* Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor- α activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation* **112**, 3911–3918 (2005).
61. Lacerda, L., Somers, S., Opie, L. H. & Lecour, S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc. Res.* **84**, 201–208 (2009).
62. Heusch, G., Musiolik, J., Gedik, N. & Skyschally, A. Mitochondrial STAT3 activation and cardioprotection by ischemic postconditioning in pigs with regional myocardial ischemia/reperfusion. *Circ. Res.* **109**, 1302–1308 (2011).
63. Tian, Y. *et al.* Postconditioning inhibits myocardial apoptosis during prolonged reperfusion via a JAK2-STAT3-Bcl-2 pathway. *Journal of Biomedical Science* **18**, 53 (2011).
64. Oshima, Y. *et al.* STAT3 mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury through metallothionein induction in the heart. *Cardiovasc. Res.* **65**, 428–435 (2005).
65. Wu, J. *et al.* Sevoflurane postconditioning protects the myocardium against ischemia/reperfusion injury via activation of the JAK2-STAT3 pathway. *PeerJ* **5**, e3196 (2017).
66. Harhous, Z., Booz, G. W., Ovize, M., Bidoux, G. & Kurdi, M. An Update on the Multifaceted Roles of STAT3 in the Heart. *Front Cardiovasc Med* **6**, (2019).
67. Lecour, S. & James, R. W. When are pro-inflammatory cytokines SAFE in heart failure? *Eur Heart J* **32**, 680–685 (2011).
68. Lincoff, A. M. *et al.* Inhibition of delta-protein kinase C by delcasertib as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute anterior ST-segment elevation myocardial infarction: results of the PROTECTION AMI Randomized Controlled Trial. *Eur. Heart J.* **35**, 2516–2523 (2014).
69. Siddiqi, N. *et al.* Intravenous sodium nitrite in acute ST-elevation myocardial infarction: a randomized controlled trial (NIAMI). *Eur. Heart J.* **35**, 1255–1262 (2014).
70. Sodium Nitrite Fails to Limit Myocardial Infarct Size: Results from the CAESAR Cardioprotection Consortium (LB645) - Lefer - 2014 - The FASEB Journal - Wiley Online Library.
https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1096/fasebj.28.1_supplement.lb645.
71. Schaller, S. *et al.* TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther* **333**, 696–706 (2010).
72. Skyschally, A., Schulz, R. & Heusch, G. Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther* **24**, 85–87 (2010).
73. Atar, D. *et al.* Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: MITOCARE study results. *Eur. Heart J.* **36**, 112–119 (2015).
74. Cung, T.-T. *et al.* Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1021–1031 (2015).
75. Hausenloy, D. J. *et al.* Targeting reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: trials and tribulations. *Eur Heart J* **38**, 935–941 (2017).
76. Davidson, S. M. *et al.* Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week. *J. Am. Coll. Cardiol.* **73**, 89–99 (2019).
77. Albuquerque-Béjar, J. J. *et al.* Combination therapy with remote ischaemic conditioning and insulin or exenatide enhances infarct size limitation in pigs. *Cardiovasc. Res.* **107**, 246–254 (2015).

78. Sun, J. *et al.* Additive cardioprotection by pharmacological postconditioning with hydrogen sulfide and nitric oxide donors in mouse heart: S-sulfhydration vs. S-nitrosylation. *Cardiovasc. Res.* **110**, 96–106 (2016).
79. Zhou, P. & Pu, W. T. Recounting cardiac cellular composition. *Circ Res* **118**, 368–370 (2016).
80. Pinto, A. R. *et al.* Revisiting cardiac cellular composition. *Circulation research* **118**, 400–409 (2016).
81. Gray, G., Toor, I., Castellan, R., Crisan, M. & Meloni, M. Resident cells of the myocardium: more than spectators in cardiac injury, repair and regeneration. *Current Opinion in Physiology* **1**, 46–51 (2018).
82. Audia, J. P. *et al.* Caspase-1 inhibition by VX-765 administered at reperfusion in P2Y₁₂ receptor antagonist-treated rats provides long-term reduction in myocardial infarct size and preservation of ventricular function. *Basic Res. Cardiol.* **113**, 32 (2018).
83. Alexopoulos, P. *et al.* Combined Treatment With Exenatide and Cyclosporine A or Parstatin 1-26 Results in Enhanced Reduction of Infarct Size in a Rabbit Model. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **70**, 34–41 (2017).
84. Ruparelia, N., Chai, J. T., Fisher, E. A. & Choudhury, R. P. Inflammatory processes in cardiovascular disease: a route to targeted therapies. *Nat Rev Cardiol* **14**, 314 (2017).
85. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology E-Book*. (Elsevier Health Sciences, 2017).
86. Jebali, J. J. *et al.* Les sélectines: acteurs de l'adhérence cellulaire et potentiel cible thérapeutique. **17** (2011).
87. Takagi, J. & Springer, T. A. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol. Rev.* **186**, 141–163 (2002).
88. Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D. & Castillo Ferrer, C. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology* **148**, 125–139 (2016).
89. Gouveia, B. C., Calil, I. P., Machado, J. P. B., Santos, A. A. & Fontes, E. P. B. Immune Receptors and Co-receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants. *Front Microbiol* **7**, (2017).
90. Gack, M. U. & Diamond, M. S. Innate immune escape by Dengue and West Nile viruses. *Curr Opin Virol* **20**, 119–128 (2016).
91. Domingo-Calap, P., Segredo-Otero, E., Durán-Moreno, M. & Sanjuán, R. Social evolution of innate immunity evasion in a virus. *Nat Microbiol* **4**, 1006–1013 (2019).
92. Epelman, S., Liu, P. P. & Mann, D. L. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 117–129 (2015).
93. Medzhitov, R. & Janeway, C. Innate Immunity. *New England Journal of Medicine* **343**, 338–344 (2000).
94. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295–298 (1997).
95. Schaefer, L. Complexity of Danger: The Diverse Nature of Damage-associated Molecular Patterns. *J. Biol. Chem.* **289**, 35237–35245 (2014).
96. Shen, H., Kreisel, D. & Goldstein, D. R. Processes of sterile inflammation. *J. Immunol.* **191**, 2857–2863 (2013).
97. Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191–195 (2002).
98. Zhang, Q. *et al.* Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* **464**, 104–107 (2010).
99. Shi, Y., Evans, J. E. & Rock, K. L. Molecular identification of a danger signal that alerts

- the immune system to dying cells. *Nature* **425**, 516–521 (2003).
100. Rammes, A. *et al.* Myeloid-related Protein (MRP) 8 and MRP14, Calcium-binding Proteins of the S100 Family, Are Secreted by Activated Monocytes via a Novel, Tubulin-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* **272**, 9496–9502 (1997).
 101. Quintana, F. J. & Cohen, I. R. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J. Immunol.* **175**, 2777–2782 (2005).
 102. Scheibner, K. A. *et al.* Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR2. *The Journal of Immunology* **177**, 1272–1281 (2006).
 103. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. & Hoffmann, J. A. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**, 973–983 (1996).
 104. Kanneganti, T.-D., Lamkanfi, M. & Núñez, G. Intracellular NOD-like Receptors in Host Defense and Disease. *Immunity* **27**, 549–559 (2007).
 105. Kowalinski, E., Louber, J., Gerlier, D. & Cusack, S. RIG-I - Un commutateur moléculaire détecteur d'ARN viral. *Med Sci (Paris)* **28**, 136–138 (2012).
 106. Chanut, R. & Pétrilli, V. Détection de l'ADN cytosolique par la voie cGAS-STING. *médecine/sciences* **35**, 527–534 (2019).
 107. Kolev, M., Le Friec, G. & Kemper, C. Complement--tapping into new sites and effector systems. *Nat. Rev. Immunol.* **14**, 811–820 (2014).
 108. Merle, N. S., Church, S. E., Fremeaux-Bacchi, V. & Roumenina, L. T. Complement System Part I – Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol* **6**, (2015).
 109. Choi, J.-H. *et al.* Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J Exp Med* **206**, 497–505 (2009).
 110. Dzik, J. M. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim. Pol.* **57**, 443–466 (2010).
 111. Pelvig, D. P., Pakkenberg, H., Stark, A. K. & Pakkenberg, B. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiol. Aging* **29**, 1754–1762 (2008).
 112. Epelman, S., Lavine, K. J. & Randolph, G. J. Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* **41**, 21–35 (2014).
 113. Gautier, E. L. *et al.* Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity. *Nat Immunol* **13**, 1118–1128 (2012).
 114. Sieweke, M. H. & Allen, J. E. Beyond stem cells: self-renewal of differentiated macrophages. *Science* **342**, 1242974 (2013).
 115. Bain, C. C. *et al.* Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors. *Mucosal Immunol* **6**, 498–510 (2013).
 116. Rivollier, A., He, J., Kole, A., Valatas, V. & Kelsall, B. L. Inflammation switches the differentiation program of Ly6Chi monocytes from antiinflammatory macrophages to inflammatory dendritic cells in the colon. *J Exp Med* **209**, 139–155 (2012).
 117. Epelman, S. *et al.* Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* **40**, 91–104 (2014).
 118. Ensan, S. *et al.* Self-renewing resident arterial macrophages arise from embryonic CX3CR1(+) precursors and circulating monocytes immediately after birth. *Nat. Immunol.* **17**, 159–168 (2016).

119. Williams, M. *et al.* Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J Exp Med* **210**, 1977–1992 (2013).
120. Ginhoux, F. *et al.* Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* **330**, 841–845 (2010).
121. Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W. & Rossi, F. M. V. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat. Neurosci.* **10**, 1538–1543 (2007).
122. Leid Jamison *et al.* Primitive Embryonic Macrophages are Required for Coronary Development and Maturation. *Circulation Research* **118**, 1498–1511 (2016).
123. Aurora, A. B. *et al.* Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest* **124**, 1382–1392 (2014).
124. Pinto, A. R. *et al.* Age-related changes in tissue macrophages precede cardiac functional impairment. *aging* **6**, 399–413 (2014).
125. Hulsmans, M. *et al.* Cardiac macrophages promote diastolic dysfunction. *J. Exp. Med.* **215**, 423–440 (2018).
126. Pinto, A. R. *et al.* An Abundant Tissue Macrophage Population in the Adult Murine Heart with a Distinct Alternatively-Activated Macrophage Profile. *PLoS ONE* **7**, e36814 (2012).
127. Heidt, T. *et al.* Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circ. Res.* **115**, 284–295 (2014).
128. King, K. R. *et al.* IRF3 and type I interferons fuel a fatal response to myocardial infarction. *Nature Medicine* **23**, 1481–1487 (2017).
129. Chakraborti, T., Mandal, A., Mandal, M., Das, S. & Chakraborti, S. Complement activation in heart diseases: Role of oxidants. *Cellular Signalling* **12**, 607–617 (2000).
130. Foreman, K. E., Glosky, M. M., Warner, R. L., Horvath, S. J. & Ward, P. A. Comparative effect of C3a and C5a on adhesion molecule expression on neutrophils and endothelial cells. *Inflammation* **20**, 1–9 (1996).
131. Swirski, F. K. & Nahrendorf, M. Cardioimmunology: the immune system in cardiac homeostasis and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **18**, 733–744 (2018).
132. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D. & Zychlinsky, A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 459–489 (2012).
133. Silvestre-Roig, C., Fridlender, Z. G., Glogauer, M. & Scapini, P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends in Immunology* **40**, 565–583 (2019).
134. Manfredi, A. A., Ramirez, G. A., Rovere-Querini, P. & Maugeri, N. The Neutrophil's Choice: Phagocytose vs Make Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol* **9**, 288 (2018).
135. Tecchio, C., Micheletti, A. & Cassatella, M. A. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol* **5**, 508 (2014).
136. Yost, C. C. *et al.* Activated polymorphonuclear leukocytes rapidly synthesize retinoic acid receptor- α : a mechanism for translational control of transcriptional events. *J. Exp. Med.* **200**, 671–680 (2004).
137. Cartwright, G. E., Athens, J. W. & Wintrobe, M. M. THE KINETICS OF GRANULOPOIESIS IN NORMAL MAN. *Blood* **24**, 780–803 (1964).
138. Oka, T. *et al.* Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. *Nature* **485**, 251–255 (2012).
139. Vinten-Johansen, J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **61**, 481–497 (2004).

140. Sheridan Frank M., Cole Paul G., & Ramage David. Leukocyte Adhesion to the Coronary Microvasculature During Ischemia and Reperfusion in an In Vivo Canine Model. *Circulation* **93**, 1784–1787 (1996).
141. W, L. *et al.* Heart-resident CCR2+ macrophages promote neutrophil extravasation through TLR9/MyD88/CXCL5 signaling. *JCI Insight* **1**, (2016).
142. Tanaka, T., Narazaki, M. & Kishimoto, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a016295 (2014).
143. Gwechenberger, M. *et al.* Cardiac myocytes produce interleukin-6 in culture and in viable border zone of reperfused infarctions. *Circulation* **99**, 546–551 (1999).
144. Youker, K. *et al.* Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *J Clin Invest* **89**, 602–609 (1992).
145. Thompson, A. A. R. *et al.* Hypoxia-inducible factor 2 α regulates key neutrophil functions in humans, mice, and zebrafish. *Blood* **123**, 366–376 (2014).
146. Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* **14**, 392–404 (2014).
147. On the Present State of the Question of Immunity in Infectious Diseases - METCHNIKOFF - 1989 - Scandinavian Journal of Immunology - Wiley Online Library. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3083.1989.tb02442.x>.
148. Gordon, S. The macrophage: Past, present and future. *European Journal of Immunology* **37**, S9–S17 (2007).
149. Jung, Y.-J., LaCourse, R., Ryan, L. & North, R. J. Virulent but not avirulent Mycobacterium tuberculosis can evade the growth inhibitory action of a T helper 1-dependent, nitric oxide Synthase 2-independent defense in mice. *J. Exp. Med.* **196**, 991–998 (2002).
150. Jetten, N. *et al.* Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* **17**, 109–118 (2014).
151. Murray, P. J. *et al.* Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
152. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* **176**, 287–292 (1992).
153. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* **158**, 670–689 (1983).
154. Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J. & Hill, A. M. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J. Immunol.* **164**, 6166–6173 (2000).
155. Billiau, A. & Matthys, P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 97–113 (2009).
156. Guha, M. & Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* **13**, 85–94 (2001).
157. Chávez-Galán, L., Olleros, M. L., Vesin, D. & Garcia, I. Much More than M1 and M2 Macrophages, There are also CD169+ and TCR+ Macrophages. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
158. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. & Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* **2**, 1 (2014).
159. Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* **11**, 750–761 (2011).

160. Gleissner, C. A. Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Front Physiol* **3**, 1 (2012).
161. Nahrendorf, M. *et al.* The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med* **204**, 3037–3047 (2007).
162. van der Laan, A. M. *et al.* Monocyte subset accumulation in the human heart following acute myocardial infarction and the role of the spleen as monocyte reservoir. *Eur. Heart J.* **35**, 376–385 (2014).
163. Walter, W. *et al.* Deciphering the Dynamic Transcriptional and Post-transcriptional Networks of Macrophages in the Healthy Heart and after Myocardial Injury. *Cell Rep* **23**, 622–636 (2018).
164. van Amerongen, M. J., Harmsen, M. C., van Rooijen, N., Petersen, A. H. & van Luyn, M. J. A. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am. J. Pathol.* **170**, 818–829 (2007).
165. Panizzi, P. *et al.* Impaired infarct healing in atherosclerotic mice with Ly-6C(hi) monocytosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **55**, 1629–1638 (2010).
166. Maekawa, Y. *et al.* Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**, 241–246 (2002).
167. Gordon, S. & Martinez, F. O. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* **32**, 593–604 (2010).
168. Obeid, E., Nanda, R., Fu, Y.-X. & Olopade, O. I. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). *Int. J. Oncol.* **43**, 5–12 (2013).
169. da Silva, M. D. *et al.* IL-10 Cytokine Released from M2 Macrophages Is Crucial for Analgesic and Anti-inflammatory Effects of Acupuncture in a Model of Inflammatory Muscle Pain. *Mol Neurobiol* **51**, 19–31 (2015).
170. Wynn, T. A. & Vannella, K. M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity* **44**, 450–462 (2016).
171. Murray, P. J. & Wynn, T. A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**, 723–737 (2011).
172. Martinez-Pomares, L. The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 1177–1186 (2012).
173. Geijtenbeek, T. B. H. & Gringhuis, S. I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 465–479 (2009).
174. Raes, G. *et al.* Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 597–602 (2002).
175. Pauleau, A.-L. *et al.* Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J. Immunol.* **172**, 7565–7573 (2004).
176. Raes, G. *et al.* Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J. Leukoc. Biol.* **77**, 321–327 (2005).
177. Porta, C. *et al.* Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 14978–14983 (2009).
178. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* **13**, 453–461 (2008).
179. Hilgendorf, I. *et al.* Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium. *Circ. Res.* **114**, 1611–1622 (2014).

180. Hanna, R. N. *et al.* The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C – monocytes. *Nature Immunology* **12**, 778–785 (2011).
181. Sager, H. B. *et al.* Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circ. Res.* **119**, 853–864 (2016).
182. Frangogiannis, N. G. Matricellular proteins in cardiac adaptation and disease. *Physiol. Rev.* **92**, 635–688 (2012).
183. Jung, M. *et al.* IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res. Cardiol.* **112**, 33 (2017).
184. Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J Exp Med* **204**, 1057–1069 (2007).
185. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958–969 (2008).
186. Romson J L *et al.* Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* **67**, 1016–1023 (1983).
187. Jolly, S. R. *et al.* Reduction of myocardial infarct size by neutrophil depletion: Effect of duration of occlusion. *American Heart Journal* **112**, 682–690 (1986).
188. Kohtani, T., Abe, Y., Sato, M., Miyauchi, K. & Kawachi, K. Protective effects of anti-neutrophil antibody against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur Surg Res* **34**, 313–320 (2002).
189. Curaj, A. *et al.* Blockade of CCR3 retains the neutrophils, preserving their survival during healing after myocardial infarction. *Discoveries* **3**, e45 (2015).
190. Oral, H. *et al.* CXC chemokine KC fails to induce neutrophil infiltration and neoangiogenesis in a mouse model of myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **60**, 1–7 (2013).
191. Baran, K. W. *et al.* Double-blind, randomized trial of an anti-CD18 antibody in conjunction with recombinant tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction: limitation of myocardial infarction following thrombolysis in acute myocardial infarction (LIMIT AMI) study. *Circulation* **104**, 2778–2783 (2001).
192. Faxon, D. P. *et al.* The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 1199–1204 (2002).
193. Xu, M. *et al.* Functional human NAIP promoter transcription regulatory elements for the NAIP and PsiNAIP genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1574**, 35–50 (2002).
194. Zhao, G. *et al.* CXCR6 deficiency ameliorated myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting infiltration of monocytes and IFN- γ -dependent autophagy. *Int. J. Cardiol.* **168**, 853–862 (2013).
195. Tian, Y., Piras, B. A., Kron, I. L., French, B. A. & Yang, Z. Adenosine 2B Receptor Activation Reduces Myocardial Reperfusion Injury by Promoting Anti-Inflammatory Macrophages Differentiation via PI3K/Akt Pathway. *Oxid Med Cell Longev* **2015**, 585297 (2015).
196. Majmudar, M. D. *et al.* Monocyte-directed RNAi targeting CCR2 improves infarct healing in atherosclerosis-prone mice. *Circulation* **127**, 2038–2046 (2013).
197. Ben-Mordechai, T. *et al.* Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 1890–1901 (2013).

198. Courties, G. *et al.* In vivo silencing of the transcription factor IRF5 reprograms the macrophage phenotype and improves infarct healing. *J. Am. Coll. Cardiol.* **63**, 1556–1566 (2014).
199. Ma Yonggang *et al.* Matrix Metalloproteinase-28 Deletion Exacerbates Cardiac Dysfunction and Rupture After Myocardial Infarction in Mice by Inhibiting M2 Macrophage Activation. *Circulation Research* **112**, 675–688 (2013).
200. Shiraishi, M. *et al.* Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. *J Clin Invest* **126**, 2151–2166 (2016).
201. Yang, M. *et al.* Deficiency of GATA3-Positive Macrophages Improves Cardiac Function Following Myocardial Infarction or Pressure Overload Hypertrophy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 885–904 (2018).
202. de Zwaan, C. *et al.* Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* **23**, 1670–1677 (2002).
203. Mahaffey, K. W. *et al.* Effect of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction: the COMPLEMENT inhibition in myocardial infarction treated with thrombolytics (COMPLY) trial. *Circulation* **108**, 1176–1183 (2003).
204. Granger, C. B. *et al.* Pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: the COMPLEMENT inhibition in Myocardial infarction treated with Angioplasty (COMMA) trial. *Circulation* **108**, 1184–1190 (2003).
205. APEX AMI Investigators *et al.* Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* **297**, 43–51 (2007).
206. Ridker, P. M. *et al.* Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* **377**, 1119–1131 (2017).
207. Toldo, S. *et al.* Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist provides cardioprotection during myocardial ischemia reperfusion in the mouse. *Cardiovasc Drugs Ther* **26**, 273–276 (2012).
208. Abbate, A. *et al.* Alterations in the Interleukin-1/Interleukin-1 Receptor Antagonist Balance Modulate Cardiac Remodeling following Myocardial Infarction in the Mouse. *PLOS ONE* **6**, e27923 (2011).
209. Morton, A. C. *et al.* The effect of interleukin-1 receptor antagonist therapy on markers of inflammation in non-ST elevation acute coronary syndromes: the MRC-ILA Heart Study. *Eur. Heart J.* **36**, 377–384 (2015).
210. Abbate Antonio *et al.* Interleukin-1 Blockade Inhibits the Acute Inflammatory Response in Patients With ST-Segment–Elevation Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association* **9**, e014941 (2020).
211. Kobara, M. *et al.* Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* **87**, 424–430 (2010).
212. Matsushita, K. *et al.* Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Laboratory Investigation* **85**, 1210–1223 (2005).
213. Kleveland, O. *et al.* Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur Heart J* **37**, 2406–2413 (2016).

214. Carroll, M. B., Haller, C. & Smith, C. Short-term application of tocilizumab during myocardial infarction (STAT-MI). *Rheumatol Int* **38**, 59–66 (2018).
215. Ridker, P. M. *et al.* Modulation of the interleukin-6 signalling pathway and incidence rates of atherosclerotic events and all-cause mortality: analyses from the Canakinumab Anti-Inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Eur Heart J* **39**, 3499–3507 (2018).
216. Morimoto, H. & Takahashi, M. Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Myocardial Infarction. *Int J Biomed Sci* **3**, 159–167 (2007).
217. Hayashidani, S. *et al.* Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* **108**, 2134–2140 (2003).
218. Martire, A. *et al.* Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice mimics ischemic preconditioning through SAPK/JNK1/2 activation. *Cardiovasc. Res.* **57**, 523–534 (2003).
219. de Lemos, J. A. *et al.* Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* **50**, 2117–2124 (2007).
220. de Lemos, J. A. *et al.* Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **107**, 690–695 (2003).
221. Lubowicka, E. *et al.* Plasma Chemokine CCL2 and Its Receptor CCR2 Concentrations as Diagnostic Biomarkers for Breast Cancer Patients. *Biomed Res Int* **2018**, 2124390 (2018).
222. Hartman, M. H. T., Groot, H. E., Leach, I. M., Karper, J. C. & van der Harst, P. Translational overview of cytokine inhibition in acute myocardial infarction and chronic heart failure. *Trends in Cardiovascular Medicine* **28**, 369–379 (2018).
223. O’Donoghue, M. L. *et al.* Effect of Losmapimod on Cardiovascular Outcomes in Patients Hospitalized With Acute Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* **315**, 1591–1599 (2016).
224. STABILITY Investigators *et al.* Darapladib for preventing ischemic events in stable coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **370**, 1702–1711 (2014).
225. Tardif, J.-C. *et al.* Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine* **381**, 2497–2505 (2019).
226. Bouabdallaoui, N. *et al.* Time-to-treatment initiation of colchicine and cardiovascular outcomes after myocardial infarction in the Colchicine Cardiovascular Outcomes Trial (COLCOT). *Eur Heart J* **41**, 4092–4099 (2020).
227. Nidorf, S. M. *et al.* Colchicine in Patients with Chronic Coronary Disease. *N Engl J Med* **383**, 1838–1847 (2020).
228. Tong, D. C. *et al.* Colchicine in Patients With Acute Coronary Syndrome: The Australian COPS Randomized Clinical Trial. *Circulation* **142**, 1890–1900 (2020).
229. O’Connell, T. D., Rodrigo, M. C. & Simpson, P. C. Isolation and culture of adult mouse cardiac myocytes. *Methods Mol. Biol.* **357**, 271–296 (2007).
230. Richardson, D. S. & Lichtman, J. W. Clarifying Tissue Clearing. *Cell* **162**, 246–257 (2015).
231. Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang: Über Knochenfärbung. (Livre, 1914) [WorldCat.org]. <https://www.worldcat.org/title/uber-das-durchsichtigmachen-von-menschlichen-und-tierischen-preparaten-und-seine-theoretischen-bedingungen-nebst-anhang-uber-knochenfarbung/oclc/11138774>.

232. Dodt, H.-U. *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature Methods* **4**, 331–336 (2007).
233. Ertürk, A. *et al.* Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* **7**, 1983–1995 (2012).
234. Becker, K. *et al.* Reduction of Photo Bleaching and Long Term Archiving of Chemically Cleared GFP-Expressing Mouse Brains. *PLOS ONE* **9**, e114149 (2014).
235. Sylwestrak, E. L., Rajasethupathy, P., Wright, M. A., Jaffe, A. & Deisseroth, K. Multiplexed Intact-Tissue Transcriptional Analysis at Cellular Resolution. *Cell* **164**, 792–804 (2016).
236. Tomer, R., Ye, L., Hsueh, B. & Deisseroth, K. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nature Protocols* **9**, 1682–1697 (2014).
237. Boutin, M. E. & Hoffman-Kim, D. Application and assessment of optical clearing methods for imaging of tissue-engineered neural stem cell spheres. *Tissue Eng Part C Methods* **21**, 292–302 (2015).
238. Ke, M.-T. *et al.* Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. *Cell Rep* **14**, 2718–2732 (2016).
239. Susaki, E. A. *et al.* Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. *Cell* **157**, 726–739 (2014).
240. Stefaniuk, M. *et al.* Light-sheet microscopy imaging of a whole cleared rat brain with Thy1-GFP transgene. *Scientific Reports* **6**, 1–9 (2016).
241. Chung, K. *et al.* Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature* **497**, 332–337 (2013).
242. Richardson, D. S. & Lichtman, J. W. Clarifying Tissue Clearing. *Cell* **162**, 246–257 (2015).
243. Ertürk, A. *et al.* Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* **7**, 1983–1995 (2012).
244. Wimmer, V. C. & Möller, A. High-resolution confocal imaging in tissue. *Methods Mol. Biol.* **611**, 183–191 (2010).
245. Greger, K., Swoger, J. & Stelzer, E. H. K. Basic building units and properties of a fluorescence single plane illumination microscope. *Rev Sci Instrum* **78**, 023705 (2007).
246. Bochaton, T. *et al.* Heat Shock Protein 70 as a Biomarker of Clinical Outcomes After STEMI. *J. Am. Coll. Cardiol.* **75**, 122–124 (2020).
247. Hayek, A. *et al.* Kinetics and prognostic value of soluble VCAM-1 in ST-segment elevation myocardial infarction patients. *Immun Inflamm Dis* (2021) doi:10.1002/iid3.409.
248. Bochaton, T. *et al.* Association of myocardial hemorrhage and persistent microvascular obstruction with circulating inflammatory biomarkers in STEMI patients. *PLoS One* **16**, e0245684 (2021).
249. Kok, S.-H. *et al.* Oncostatin M-induced CCL2 transcription in osteoblastic cells is mediated by multiple levels of STAT-1 and STAT-3 signaling: An implication for the pathogenesis of arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **60**, 1451–1462 (2009).
250. Bournazou, E. & Bromberg, J. Targeting the tumor microenvironment. *JAKSTAT* **2**, (2013).
251. Tian, D.-S. *et al.* Chemokine CCL2–CCR2 Signaling Induces Neuronal Cell Death via STAT3 Activation and IL-1 β Production after Status Epilepticus. *J Neurosci* **37**, 7878–7892 (2017).
252. Schust, J., Sperl, B., Hollis, A., Mayer, T. U. & Berg, T. Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization. *Chemistry & Biology* **13**, 1235–1242 (2006).

253. Shetelig Christian *et al.* Association of IL-8 With Infarct Size and Clinical Outcomes in Patients With STEMI. *Journal of the American College of Cardiology* **72**, 187–198 (2018).
254. Pietilä, K. *et al.* Serum C-reactive protein and infarct size in myocardial infarct patients with a closed versus an open infarct-related coronary artery after thrombolytic therapy. *Eur Heart J* **14**, 915–919 (1993).
255. Ziakas, A. *et al.* In-hospital and long-term prognostic value of fibrinogen, CRP, and IL-6 levels in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolysis. *Angiology* **57**, 283–293 (2006).
256. Park, J. J. *et al.* Prognostic value of neutrophil to lymphocyte ratio in patients presenting with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* **111**, 636–642 (2013).
257. Valgimigli Marco *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Receptor 1 Is a Major Predictor of Mortality and New-Onset Heart Failure in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* **111**, 863–870 (2005).
258. Ong, S.-B. *et al.* Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther* **186**, 73–87 (2018).
259. Boyle, A. J. *et al.* Myocardial production and release of MCP-1 and SDF-1 following myocardial infarction: differences between mice and man. *J Transl Med* **9**, 150 (2011).
260. Fanola, C. L. *et al.* Interleukin-6 and the Risk of Adverse Outcomes in Patients After an Acute Coronary Syndrome: Observations From the SOLID-TIMI 52 (Stabilization of Plaque Using Darapladib-Thrombolysis in Myocardial Infarction 52) Trial. *J Am Heart Assoc* **6**, (2017).
261. Anstensrud, A. K. *et al.* Rationale for the ASSAIL-MI-trial: a randomised controlled trial designed to assess the effect of tocilizumab on myocardial salvage in patients with acute ST-elevation myocardial infarction (STEMI). *Open Heart* **6**, e001108 (2019).
262. Ancey, C. *et al.* Secretion of IL-6, IL-11 and LIF by human cardiomyocytes in primary culture. *Cytokine* **18**, 199–205 (2002).
263. Fredj, S. *et al.* Role of interleukin-6 in cardiomyocyte/cardiac fibroblast interactions during myocyte hypertrophy and fibroblast proliferation. *J Cell Physiol* **204**, 428–436 (2005).
264. Krohn-Grimberghe, M. *et al.* Nanoparticle-encapsulated siRNAs for gene silencing in the haematopoietic stem-cell niche. *Nat Biomed Eng* **4**, 1076–1089 (2020).
265. Merz, S. F. *et al.* Contemporaneous 3D characterization of acute and chronic myocardial I/R injury and response. *Nat Commun* **10**, 2312 (2019).
266. Fielding, C. A. *et al.* IL-6 regulates neutrophil trafficking during acute inflammation via STAT3. *J Immunol* **181**, 2189–2195 (2008).
267. Lörchner, H. *et al.* Myocardial healing requires Reg3 β -dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nat Med* **21**, 353–362 (2015).
268. Shirakawa, K. *et al.* IL (Interleukin)-10-STAT3-Galectin-3 Axis Is Essential for Osteopontin-Producing Reparative Macrophage Polarization After Myocardial Infarction. *Circulation* **138**, 2021–2035 (2018).
269. Lee, T.-M. *et al.* Preconditioned adipose-derived stem cells ameliorate cardiac fibrosis by regulating macrophage polarization in infarcted rat hearts through the PI3K/STAT3 pathway. *Lab Invest* **99**, 634–647 (2019).
270. Ma, Y., Mouton, A. J. & Lindsey, M. L. Cardiac macrophage biology in the steady-state heart, the aging heart, and following myocardial infarction. *Transl Res* **191**, 15–28 (2018).
271. Goodman, M. D., Koch, S. E., Fuller-Bicer, G. A. & Butler, K. L. Regulating RISK: a role for JAK-STAT signaling in postconditioning? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, H1649-1656 (2008).

272. Das, A., Salloum, F. N., Durrant, D., Ockaili, R. & Kukreja, R. C. Rapamycin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through JAK2-STAT3 signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* **53**, 858–869 (2012).
273. O’Sullivan, K. E., Breen, E. P., Gallagher, H. C., Buggy, D. J. & Hurley, J. P. Understanding STAT3 signaling in cardiac ischemia. *Basic Res Cardiol* **111**, 27 (2016).
274. Hilfiker-Kleiner, D. *et al.* Continuous glycoprotein-130-mediated signal transducer and activator of transcription-3 activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction. *Circulation* **122**, 145–155 (2010).
275. Bolli, R. *et al.* A murine model of inducible, cardiac-specific deletion of STAT3: its use to determine the role of STAT3 in the upregulation of cardioprotective proteins by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* **50**, 589–597 (2011).
276. Enomoto, D. *et al.* Cardiac-specific ablation of the STAT3 gene in the subacute phase of myocardial infarction exacerbated cardiac remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **309**, H471-480 (2015).
277. Boengler, K. *et al.* Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in aged and STAT3-deficient mice. *Circ Res* **102**, 131–135 (2008).
278. Daseke, M. J. *et al.* Exogenous IL-4 shuts off pro-inflammation in neutrophils while stimulating anti-inflammation in macrophages to induce neutrophil phagocytosis following myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **145**, 112–121 (2020).
279. Leblond, A.-L. *et al.* Systemic and Cardiac Depletion of M2 Macrophage through CSF-1R Signaling Inhibition Alters Cardiac Function Post Myocardial Infarction. *PLoS One* **10**, e0137515 (2015).
280. Mia, M. M. *et al.* YAP/TAZ deficiency reprograms macrophage phenotype and improves infarct healing and cardiac function after myocardial infarction. *PLoS Biology* **18**, e3000941 (2020).
281. Bochaton, T. *et al.* Importance of infarct size versus other variables for clinical outcomes after PPCI in STEMI patients. *Basic Res. Cardiol.* **115**, 4 (2019).
282. Dutta, P. *et al.* Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature* **487**, 325–329 (2012).
283. Engström, G., Melander, O. & Hedblad, B. Leukocyte count and incidence of hospitalizations due to heart failure. *Circ Heart Fail* **2**, 217–222 (2009).
284. Tsujioka, H. *et al.* Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 130–138 (2009).
285. Hoyer, F. F. *et al.* Tissue-Specific Macrophage Responses to Remote Injury Impact the Outcome of Subsequent Local Immune Challenge. *Immunity* **51**, 899-914.e7 (2019).
286. Ruiz-Meana, M. *et al.* Ageing, sex, and cardioprotection. *Br. J. Pharmacol.* (2019) doi:10.1111/bph.14951.
287. Dia, M. *et al.* Myocardial Ischemia-Reperfusion and Diabetes: lessons learned from bedside to bench. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, (2021).
288. Smith, A. J. *et al.* Isolation and characterization of resident endogenous c-Kit⁺ cardiac stem cells from the adult mouse and rat heart. *Nat Protoc* **9**, 1662–1681 (2014).
289. López, J. E., Jaradeh, K., Silva, E., Aminololama-Shakeri, S. & Simpson, P. C. A method to increase reproducibility in adult ventricular myocyte sizing and flow cytometry: Avoiding cell size bias in single cell preparations. *PLoS ONE* **12**, e0186792 (2017).
290. Tanimoto, T. *et al.* Cardioprotective Effects of HSP72 Administration on Ischemia-Reperfusion Injury. *J Am Coll Cardiol* **70**, 1479–1492 (2017).

291. Song, Y.-J., Zhong, C.-B. & Wang, X.-B. Heat shock protein 70: A promising therapeutic target for myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Cell Physiol* **234**, 1190–1207 (2019).
292. Mathur, S., Walley, K. R., Wang, Y., Indrambarya, T. & Boyd, J. H. Extracellular heat shock protein 70 induces cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction via TLR2. *Circ J* **75**, 2445–2452 (2011).
293. Frodermann, V. & Nahrendorf, M. Macrophages and Cardiovascular Health. *Physiological Reviews* **98**, 2523–2569 (2018).
294. O'Brien, K. D. *et al.* Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* **92**, 945–951 (1993).
295. Singh, R. J. R. *et al.* Cytokine stimulated vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ectodomain release is regulated by TIMP-3. *Cardiovasc Res* **67**, 39–49 (2005).
296. Mulvihill, N. T. *et al.* Risk stratification in unstable angina and non-Q wave myocardial infarction using soluble cell adhesion molecules. *Heart* **85**, 623–627 (2001).
297. Cubbon, R. M. *et al.* Temporal trends in mortality of patients with diabetes mellitus suffering acute myocardial infarction: a comparison of over 3000 patients between 1995 and 2003. *Eur Heart J* **28**, 540–545 (2007).
298. Kannel, W. B., Hjortland, M. & Castelli, W. P. Role of diabetes in congestive heart failure: The Framingham study. *The American Journal of Cardiology* **34**, 29–34 (1974).
299. Alegria, J. R. *et al.* Infarct size, ejection fraction, and mortality in diabetic patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *Am Heart J* **154**, 743–750 (2007).
300. Marso, S. P. *et al.* Comparison of myocardial reperfusion in patients undergoing percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation acute myocardial infarction with versus without diabetes mellitus (from the EMERALD Trial). *Am J Cardiol* **100**, 206–210 (2007).
301. De Luca, G. *et al.* Effect of diabetes on scintigraphic infarct size in STEMI patients undergoing primary angioplasty. *Diabetes Metab Res Rev* **31**, 322–328 (2015).
302. Miki, T., Itoh, T., Sunaga, D. & Miura, T. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Diabetol* **11**, 67 (2012).
303. Apaijai, N., Chinda, K., Palee, S., Chattipakorn, S. & Chattipakorn, N. Combined vildagliptin and metformin exert better cardioprotection than monotherapy against ischemia-reperfusion injury in obese-insulin resistant rats. *PLoS One* **9**, e102374 (2014).
304. Dia, M. *et al.* Reduced reticulum-mitochondria Ca²⁺ transfer is an early and reversible trigger of mitochondrial dysfunctions in diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* **115**, 74 (2020).
305. Furge, K. A., Zhang, Y. W. & Vande Woude, G. F. Met receptor tyrosine kinase: Enhanced signaling through adapter proteins. *Oncogene* vol. 19 5582–5589 (2000).
306. Trusolino, L., Bertotti, A. & Comoglio, P. M. MET signalling: Principles and functions in development, organ regeneration and cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 11 834–848 (2010).
307. Ono, K., Matsumori, A., Shioi, T., Furakawa, Y. & Sasayama, S. Enhanced expression of hepatocyte growth factor/c-Met by myocardial ischemia and reperfusion in a rat model. *Circulation* **95**, 2552–2558 (1997).
308. Barisione, G. *et al.* Potential Role of Soluble c-Met as a New Candidate Biomarker of Metastatic Uveal Melanoma. *JAMA Ophthalmology* **133**, 1013 (2015).

309. Woessner, J. F. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal* **5**, 2145–2154 (1991).
310. Cojocarui, I. M. *et al.* Changes in plasma matrix metalloproteinase-9 levels in patients with acute ischemic stroke. *Rom J Intern Med* **50**, 155–158 (2012).
311. Montaner, J. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* **107**, 598–603 (2003).
312. Inzitari Domenico *et al.* MMP9 Variation After Thrombolysis Is Associated With Hemorrhagic Transformation of Lesion and Death. *Stroke* **44**, 2901–2903 (2013).
313. Gerber, J. C. *et al.* Collateral state and the effect of endovascular reperfusion therapy on clinical outcome in ischemic stroke patients. *Brain Behav* **6**, (2016).
314. Nikoubashman, O. *et al.* True First-Pass Effect. *Stroke* **50**, 2140–2146 (2019).
315. Bacigaluppi, M., Semerano, A., Gullotta, G. S. & Strambo, D. Insights from thrombi retrieved in stroke due to large vessel occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **39**, 1433–1451 (2019).