



HAL
open science

Rôle de l'isoforme CXCL12 γ dans la fonction et le remodelage cardiaque post-ischémique

Vincent Duval

► **To cite this version:**

Vincent Duval. Rôle de l'isoforme CXCL12 γ dans la fonction et le remodelage cardiaque post-ischémique. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris Cité, 2021. Français. NNT : 2021UNIP5162 . tel-04586999

HAL Id: tel-04586999

<https://theses.hal.science/tel-04586999>

Submitted on 24 May 2024

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

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

UNIVERSITÉ DE PARIS

École Doctorale Bio Sorbonne Paris Cité (BioSPC, ED 562)

PARCC, Paris Cardiovascular Research Center, INSERM U970

Rôle de l'isoforme CXCL12 γ dans la fonction et le remodelage cardiaque post-ischémique

Par Vincent DUVAL

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie et
Physiopathologie

Dirigée par Angélique LEVOYE

Présentée et soutenue publiquement le 21 septembre 2021

Devant un jury composé de :

Rapportrice :	Dr Marie-Ange RENAULT (CR-HDR)	Université de Bordeaux, FR
Rapporteur :	Dr Mathias MERICKSAY (DR)	Université Paris-Saclay, FR
Examinatrice :	Dr Françoise BACHELERIE (DR)	Université Paris-Saclay, FR
Examinatrice :	Dr Giuseppina CALIGIURI (DR)	Université de Paris, FR
Examinateur :	Dr Jean-Sébastien SILVESTRE (DR)	Université de Paris, FR
Directrice :	Dr Angélique LEVOYE (MCU-HDR)	Université de Paris, FR



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<https://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/fr/>

Résumé

Après un infarctus du myocarde (IM), un remodelage cardiaque défavorable et la progression vers l'insuffisance cardiaque peuvent être favorisés par des altérations macroscopiques de la géométrie et de la fonction du ventricule gauche, ainsi que par des altérations microscopiques des composants cellulaires du cœur ischémié. Des études préalables ont étayé le rôle crucial des chimiokines (CK) dans la coordination des événements moléculaires et cellulaires sous-tendant les processus de remodelage et de réparation du cœur ischémié. Au-delà de leur interaction avec leurs récepteurs spécifiques, la liaison avec les protéoglycanes à héparane sulfate (HS) de la matrice extracellulaire conditionne l'amplitude des effets biologiques des CK. Cependant, l'impact des interactions CK/HS dans la réponse post-IM reste inconnu. Dans notre étude, nous avons révélé le rôle essentiel des interactions entre CXCL12, une CK majeure pour l'homéostasie cardiaque, et les HS dans le remodelage cardiaque post-ischémique. En effet, nous avons montré que l'inactivation des interactions CXCL12-HS chez des souris *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* entraîne une diminution de la fonction cardiaque associée à une fibrose et à une vascularisation post-ischémique réduite. Ces effets ont été retrouvés dans des souris déficientes pour CXCL12 γ (*Cxcl12 γ ^{$\Delta\Delta$}*), une isoforme fortement exprimée dans le cœur et possédant une affinité accrue pour les HS. A l'inverse, l'administration d'adénovirus exprimant CXCL12 γ dans le myocarde infarci améliore la fonction cardiaque et promeut l'angiogenèse. De manière intéressante, la surexpression de CXCL12 γ corrige également le phénotype cardiaque délétère post-IM observé chez les souris *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* et *Cxcl12 γ ^{$\Delta\Delta$}* , confirmant le rôle majeur des interactions CXCL12/HS et de CXCL12 γ dans la régulation de la fonction et du remodelage cardiaque post-ischémique. Après l'événement ischémié, l'expression augmentée, simultanée et précoce de CXCL12 γ et de son récepteur de type ACKR3 suggère un rôle important de cet axe dans la réponse à l'IM. D'ailleurs, l'activation *in vivo* d'ACKR3, contrairement à celle de CXCR4 (le second récepteur classique de CXCL12), améliore la fonction cardiaque et promeut la vascularisation post-ischémique. L'absence de modulation de la réponse inflammatoire, après induction de l'IM chez les souris mutantes, nous a amené à étudier la contribution des cellules cardiaques résidentes dans les effets médiés par CXCL12 γ . Nous avons identifié, dans le myocarde infarci, une sous-population de fibroblastes exprimant ACKR3 et présentant une signature pro-angiogénique. Nous avons donc émis l'hypothèse que CXCL12 γ pourrait exercer ses effets pro-angiogéniques au travers de son action sur les fibroblastes cardiaques exprimant ACKR3. L'analyse des milieux conditionnés issus de fibroblastes cardiaques stimulés avec CXCL12 α ou CXCL12 γ , nous a permis de montrer que seul le sécrétome provenant des

fibroblastes stimulés par CXCL12 γ est capable d'induire *in vitro* la prolifération de cellules endothéliales murines ainsi que la formation de tubes vasculaires. De manière intéressante, l'inhibition d'ACKR3, mais pas celle de CXCR4, abolit les effets induits par le sécrétome des fibroblastes stimulés par CXCL12 γ démontrant le rôle de l'axe CXCL12 γ /ACKR3 dans les effets pro-angiogéniques médiés par ces fibroblastes. Enfin, l'analyse des milieux conditionnés indique que la stimulation par CXCL12 γ entraîne la modulation de l'expression de plusieurs facteurs pro-angiogéniques. Ainsi, ces travaux révèlent, pour la première fois, un rôle protecteur des interactions CXCL12/HS dans l'IM et suggèrent que l'axe CXCL12 γ /ACKR3 pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires.

Mots-Clés : Infarctus du myocarde, chimiokine, CXCL12, cardiovasculaire, angiogénèse

Summary

After myocardial infarction (MI), adverse cardiac remodeling and progression to heart failure may be promoted by macroscopic alterations in left ventricular geometry and function, as well as microscopic alterations in the cellular and molecular landscapes of the ischemic heart. Previous studies have supported the crucial role of chemokines (CK) in the coordination of molecular and cellular events underlying post-ischemic cardiac remodeling and repair. Beyond CK interaction with their specific receptors, CK binding to heparan sulfate (HS) proteoglycans determines the magnitude of their biological effects. However, the impact of CK/HS interactions in the infarcted cardiac tissue remains unknown. In our study, we unraveled the essential role of the specific interactions between CXCL12, a major CK for cardiac homeostasis, and HS in post-ischemic cardiac remodeling. Indeed, we evidenced that disruption of these interactions in *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* mice resulted in decreased cardiac function associated with fibrosis and reduced post-ischemic vascularization. These effects were also observed in mice deficient for CXCL12 γ (*Cxcl12 γ ^{$\Delta\Delta/\Delta\Delta$}*), an isoform highly expressed in the heart and possessing unchallenged affinity for HS. Conversely, administration of adenovirus expressing CXCL12 γ into infarcted myocardium improved cardiac function and promoted angiogenesis. Interestingly, CXCL12 γ overexpression also rescued the deleterious cardiac phenotype observed in *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* and *Cxcl12 γ ^{$\Delta\Delta/\Delta\Delta$}* mice, confirming the major role of CXCL12/HS interactions and CXCL12 γ in the regulation of post-ischemic cardiac function and remodeling. After the ischemic event, the coordinated increase of CXCL12 mRNA levels and that of ACKR3 (a cognate CXCL12 receptor) suggested an important role of this axis during MI. In this line of reasoning, *in vivo* activation of ACKR3, unlike that of CXCR4 (the second classical CXCL12 receptor), improved cardiac function and promoted post-ischemic vascularization. The lack of modulation of the inflammatory response in mutant mice led us to investigate the contribution of resident cardiac cells to the CXCL12-related effects. We identified a subpopulation of ACKR3-expressing fibroblasts with a pro-angiogenic signature in the infarcted myocardium. We therefore hypothesized that CXCL12 could exert its angiogenic effects through activation of ACKR3-expressing fibroblasts. Using conditioned media from cardiac fibroblasts stimulated with CXCL12 α or CXCL12 γ , we showed that only the secretome from CXCL12 γ -stimulated fibroblasts was able to induce *in vitro* endothelial cell proliferation as well as vascular tube formation. Interestingly, these effects were blunted after inhibition of ACKR3, but not after that of CXCR4, highlighting the pro-angiogenic role of CXCL12 γ /ACKR3 axis in our experimental conditions. Finally, analysis of conditioned media

Summary

indicated that stimulation by CXCL12 γ enhanced protein levels of several angiogenic factors. Thus, this work reveals, for the first time, a protective role of CXCL12/HS interactions after MI and suggests that the CXCL12 γ /ACKR3 axis may be a novel therapeutic target in cardiovascular diseases.

Keywords: Myocardial infarction, chemokine, CXCL12, cardiovascular, angiogenesis

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer ces travaux de thèse. Je remercie le Docteur **Marie-Ange Renault** et le Docteur **Mathias Mericks kay** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer ce manuscrit. Je remercie également le Docteur **Françoise Bachelerie**, le Docteur **Giuseppina Caligiuri** ainsi que le Docteur **Jean-Sébastien Silvestre** d'avoir accepté de participer à mon jury en qualité d'examineurs.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse, le docteur **Angélique Levoye**. Merci d'avoir eu confiance en moi durant ces 4 années.

Je remercie également le docteur **Jean-Sébastien Silvestre**, examinateur et chef d'équipe. C'était vraiment génial d'avoir pu bosser sur tous ces projets passionnants au cours de ces années. Merci aussi pour tes conseils, ton accompagnement et ta sympathie! Merci d'avoir cru en moi malgré mon « échec scolaire en mathématique », merci Jean-Sé !

Un grand merci à **José Vilar** pour ton temps, tes conseils, ton point de vue... Merci pour toutes ces fois où n'ayant pas suivi tes conseils la manip ne se passe pas vraiment comme prévu, mais jamais tu n'as dit « je t'avais prévenu ». Tu m'as aussi appris d'un apéro sans cacahuète, ce n'est pas vraiment un apéro !

Merci **Mathilde**, c'est toujours un plaisir de travailler avec toi. Merci pour ta bonne humeur permanente ; c'est vraiment toi notre experte en Echo, en Histo et en Mojito !

A **Paul** et **Stéphane**, merci pour tout ! Merci la bonne ambiance, les vendredi soir en terrasse (et les après-midis aussi « oui oui mais rapidement je dois rentrer tôt ». Mensonge !) Merci pour votre aide. Essayez quand même de ne pas mettre le feu au labo après mon départ, je ne serai plus là pour vous surveiller...

Après avoir été surnommés « Tic et Tac », puis « Riri, Fifi et Loulou », il faut maintenant recruter quelqu'un pour faire « les 4 fantastiques » ! **Alexandra** peut-être ? Merci également pour ta bonne humeur, et bon courage pour la thèse ! J'ai réussi à commencer et finir Zelda pendant la thèse, y arriveras-tu ?

Un grand merci également à mon comité de suivi de thèse, les Dr **Xavier Loyer** et Dr. **Hafid Ait-Oufella**. Merci pour les conseils. Désolé pour les ~~millions~~ milliards d'EVs qu'on a pu utiliser pour terminer avec $n=1$ par condition. Comme on a pu l'entendre souvent dans le couloir « T'as des datas ? », accrochez-vous bien, il va y en avoir !

I would also thank Dr. **Stephane Mazlan**, Dr **Shruti Chatterjee**, and Dr **Yanyi Sun**. Even though we started this journey together you all finished before me. Thanks for the happy moments, laughs and countless mice we went through together!

Je tiens également à remercier tous les étudiants passés dans le labo, pour leur coup de main et leur motivation, merci à **Manon, Titouan, Axelle, Ashley** et **Baptiste**.

Merci aussi à celles qui sont parties durant mon passage, merci à **Kiave, Ingrid, Cristina** et **Ivana** pour toutes ces choses que j'ai pu apprendre avec vous !

Un grand merci à **Françoise** d'avoir supporté mes sorties de dernière minute, et toutes les fois où j'ai pu dire « oui oui pas de soucis j'y pense » pour finalement oublier... Merci à toutes les personnes de l'animalerie et plus particulièrement **Gwendoline** et **Nicolas**. Promis on fait ce qu'on peut pour ne pas trop dépasser !

Merci **Véronique** pour toutes les commandes passées, en urgences, sans devis et avec le mauvais code... Merci également à **Martine** pour avoir si souvent vu que le pauvre transporteur en attente à l'accueil était là pour moi !

Je tiens également à remercier **Alain Tedgui** et **Chantal Boulanger**, directeurs du PARCC.

Merci le **PARCC** et surtout merci les souris !

Je tiens également à remercier mes amis pour qui les questions des derniers mois se limitaient essentiellement à « Alors la thèse ? », « Et le manuscrit, ça avance ? » ou encore « T'as fixé ta date de soutenance ? ». Maintenant vous connaissez les réponses à ces questions. Merci à **Guillaume, Paul, Rémi, Alexandre, Nicolas**, et tous les autres d'avoir écouté et au moins fait semblant de s'intéresser à mes histoires de souris sans trop tourner de l'œil !

Je tiens bien évidemment à remercier mes parents pour tout. Effectivement, je n'aurais pas tenu longtemps mon objectif de doubler le nombre de page du manuscrit tous les deux jours... Mais je m'en doutais un peu dès le début quand même.

Et enfin, un grand merci à **Louise**, ma femme, pour partager ma vie et être là au quotidien. Je n'aurais probablement pu faire tout ça sans toi, merci. C'en est fini pour moi de la thèse, c'est maintenant à ton tour !

Sommaire

Résumé.....	1
Summary	3
Remerciements	5
Sommaire	7
Liste des figures	9
Liste des abréviations	10
1. Introduction.....	12
Partie I : Les maladies cardiovasculaires.....	13
A. Épidémiologie	13
B. L'infarctus du myocarde	14
C. Prise en charge	18
(1) Thrombolyse médicamenteuse.....	19
(2) Angioplastie percutanée	20
(3) Pontage aorto-coronarien.....	20
D. Physiopathologie de l'infarctus du myocarde	21
E. Le remodelage post-ischémique dans l'infarctus	23
(1) Hypoxie, apoptose et nécrose	24
(2) Inflammation.....	25
(3) Résolution de l'inflammation et fibrose	27
(4) La revascularisation post-ischémique	27
(5) Equilibre inflammation / réparation	28
F. Insuffisance cardiaque consécutive à l'infarctus et pistes thérapeutiques	30
Partie II : Les chimiokines et récepteurs de chimiokines	34
A. Chimiokines et leurs récepteurs.....	34
(1) Les chimiokines	34
(2) L'oligomérisation des chimiokines	36
(3) Interaction entre les glycosaminoglycanes et les chimiokines.....	37
(4) Récepteurs de chimiokines et signalisation cellulaire	40
B. La principale fonction des chimiokines : la chimioattraction ou chimiotaxie.....	45
Partie III : Les chimiokines et leurs récepteurs dans l'infarctus du myocarde	50
A. Régulation de l'expression des chimiokines après l'IM	50
B. Chimiokines et inflammation post-IM.....	51
C. Actions sur les autres types cellulaires	53
D. Les chimiokines comme pistes thérapeutiques dans l'IM ?.....	54
Partie IV : CXCL12-CXCR4-CXCR7	56
A. CXCL12.....	56
(1) CXCL12	56
(2) Les isoformes de CXCL12	56
(3) Expression de CXCL12.....	58
(4) Modulations de l'expression et de l'activité de CXCL12	59
(5) L'isoforme CXCL12 γ	60
B. Les récepteurs CXCR4 et ACKR3	63
(1) CXCR4.....	63
(2) RDC1/CXCR7/ACKR3.....	65
(3) Signalisation associée au trio CXCL12-CXCR4-ACKR3.....	67

C. L'axe CXCL12-CXCR4/ACKR3 en contexte pathologique	70
(1) Infections virales	70
(2) Syndrome WHIM.....	71
(3) CXCL12/CXCR4/ACKR3 dans le cancer	72
(4) Maladies inflammatoires	73
(5) Pathologies fibrotiques	74
(6) Pathologies d'origine ischémiques.....	75
Partie V : L'axe CXCL12-CXCR4/ACKR3 dans l'infarctus du myocarde	78
A. Mobilisation et recrutement des cellules inflammatoires et progénitrices	78
B. Effet direct sur les cardiomyocytes.....	79
C. La dualité de la contribution de CXCR4.....	80
D. Contributions d'ACKR3	81
E. Le potentiel thérapeutique de l'axe CXCL12-CXCR4/ACKR3 dans l'infarctus du myocarde	82
(1) Approches expérimentales.....	83
(2) Approches thérapeutiques cliniques.....	84
2. Hypothèse et objectifs	85
3. Résultats	86
CXCL12 γ isoform controls cardiac remodeling and function after acute myocardial infarction	87
4. Discussion, perspectives et conclusion.....	154
5. Bibliographie	165
6. Annexes	199
A. Cardiomyocytes and Macrophages Discourse on the Method to Govern Cardiac Repair.	199
B. Cytotoxic CD8 + T cells promote granzyme B-dependent adverse post-ischemic cardiac remodeling	209

Liste des figures

Figure 1 Illustration de l'infarctus du myocarde de type 1 et de type 2.....	17
Figure 2 Organigramme de choix de la stratégie de reperfusion	19
Figure 3 Formation de la plaque et progression jusqu'à la rupture et l'infarctus du myocarde.....	22
Figure 4 Les trois phases du remodelage cardiaque post infarctus.....	24
Figure 5 Les trois phases de l'inflammation dans l'infarctus du myocarde	29
Figure 6 Architecture macro- et microscopique du remodelage ventriculaire post-infarctus.....	31
Figure 7 Régulation du système RAA pour limiter la progression de l'insuffisance cardiaque.....	32
Figure 8 Structure d'une chimiokine.....	34
Figure 9 Illustration de la structure des 4 familles de chimiokines.....	36
Figure 10 L'oligomérisation des chimiokines	37
Figure 11 Les glycosaminoglycanes	38
Figure 12 Domaines d'interaction chimiokines et GAGs.....	40
Figure 13 Interactions Chimiokines et Récepteurs de Chimiokines.	41
Figure 14 Interaction Récepteur – Protéine G – beta arrestine	43
Figure 15 La signalisation beta-arrestine-dépendante	44
Figure 16 La niche hématopoïétique de la moelle osseuse chez l'adulte	46
Figure 17 Le mode d'action des chimiokines : la chimioattraction	47
Figure 18 Chimiokines et chimiotaxie des cellules immunitaires.....	48
Figure 19 Mécanisme de recrutement des cellules circulantes	49
Figure 20 Régulation de l'expression des chimiokines après IM.....	51
Figure 21 Rôle des chimiokines dans l'infarctus du myocarde	53
Figure 22 Epissage alternatif de CXCL12 chez l'Homme	56
Figure 23 Illustration de la structure des isoformes de CXCL12.....	58
Figure 24 Structures de CXCL12 α et CXCL12 γ	61
Figure 25 Présentation de CXCL12 α et CXCL12 γ à CXCR4 médiée par les HS.....	62
Figure 26 La signalisation dépendante de CXCL12	67
Figure 27 Les rôles de CXCL12 en contexte pathologique	70
Figure 28 L'axe CXCL12/CXCR4-ACKR3 dans le microenvironnement tumoral.	73
Figure 29 Fonction cardiaque et remodelage après IM dans un modèle Cxcr7 ^{flox/flox} xMyh6Cre ⁺	160
Figure 30 Implication de CXCL12 γ dans la régénération cardiaque	161
Figure 31 Potentiel thérapeutique de la surexpression de CXCL12 γ	163

Liste des abréviations

AA : Acide aminé
ACEI : Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (Angiotensin-converting enzyme inhibitors)
ACKR : Récepteur atypique de chimiokine (Atypical ChemoKine Receptor)
AHA : American heart association
ARB : Bloqueur du récepteur à l'angiotensine (Angiotensin receptor blocker)
ADP/ATP : Adénosine Di/Tri Phosphate
AVC : Accident Vasculaire Cérébral
BMS : Stent métalliques nus (Bare Metal Stents)
CABG : Pontage aorto-coronarien (Coronary Artery Bypass Graft)
CK: Chimiokine
CML: Cellule musculaire lisse
CRT : Thérapie de resynchronisation cardiaque (Cardiac Resynchronisation therapy)
CSCs : Cellule souches cardiaques
CSMs : Cellules souches mésenchymateuses
CPEs : Cellule progénitrice endothéliale
DAMPs : Motifs moléculaires associés aux dégâts (Damage Associated Molecular Patterns)
DRI : Inhibiteur direct de la rénine (Direct renin inhibitor)
DES : Stents couverts de molécules actives (Drug Eluting Stents)
ECG : Electrocardiogramme
ESC : European society of cardiology
FGF : Fibroblast growth factor
GAGs : Glycosaminoglycanes
GDP/GTP : Guanosine Di/Tri phosphate
GRKs : Kinases de récepteur couplé à la protéine G
HA : Acide Hyaluronique
hi-PSC-CM : cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites
HMGB1 : High mobility group box-1
HS : Héparane-Sulfate
HSP : Heat Shock Protein
HTS : Cicatrice hypertrophique
ICD : Implantable Cardioverter-defibrillator
ICF_{Er} : Insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite
IL : Interleukine
IM : Infarctus du Myocarde
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
LTS : Sténose laryngotrachéale
M1 / M2 : Macrophage de type 1 / 2
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MEC : Matrice extracellulaire
MIF : Macrophage migration inhibitory factor
MINOCA : Myocardial Infarction with Non-Obstructive Coronary Arteries
MMPs : Métalloprotéinases
MRA : Antagoniste du récepteur aux minéralocorticoïdes
NOS : Nitric oxide synthase

Liste des abréviations

OxLDL : lipoprotéines de basses densité oxydées (Low density lipoproteins)
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
RAAS : Système Rénine – Angiotensine – Aldostérone
RAGE : Receptor for Advanced Glycation Endproducts
RCK : Récepteur de chimiokine
RCPG : Récepteur couplé à une protéine G
PCI : Percutaneous Coronary Intervention
PDB : Protein Database
PI3K : Phosphatidylinositol-3-kinase
PSGL-1 : P-selectin glycoprotein ligand 1
PRRs : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptors)
TLRs : récepteur Toll-like
TnI : Troponine C
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
WHIM : Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, Myelokathexis

1. Introduction

Partie I : Les maladies cardiovasculaires

A. Épidémiologie

Associées depuis plus d'une dizaine d'années à presque un tiers de la mortalité et 10% de la morbidité à l'échelle mondiale, les maladies cardiovasculaires représentent un problème de santé publique majeur^{1,2}. Ainsi, 17,9 millions de décès sont directement liés aux maladies cardiovasculaires dans le monde en 2019 ; 82% de ces décès sont dus à une atteinte cérébrale ou cardiaque². Selon les projections, ces pathologies resteront la première cause de mortalité dans le monde. Le terme « maladies cardiovasculaires » regroupe différentes pathologies affectant le cœur et les vaisseaux sanguins, parmi lesquelles notamment :

- l'hypertension artérielle ;
- les maladies cérébro-vasculaires, dont l'accident vasculaire cérébral (AVC) ;
- l'insuffisance cardiaque ;
- les cardiopathies congénitales ou coronariennes, incluant en fonction du degré de gravité : l'angine de poitrine stable, l'angor instable, l'infarctus du myocarde sans élévation du segment ST, l'infarctus du myocarde avec élévation persistante du segment ST et la mort subite.

Les principaux facteurs de risques de développer un infarctus du myocarde sont les suivants³ :

- tabagisme ;
- diabète ;
- hypertension ou antécédents d'hypertension ;
- obésité ;
- consommation de fruits et légumes limitée ;
- alcoolisme ;
- absence d'activité physique.

D'autres facteurs de risques peuvent se surimposer comme par exemple l'infection par le SARS-CoV-2⁴.

A l'exception de quelques régions du monde, l'incidence des maladies cardiovasculaires est globalement uniforme au niveau mondial^{5,6}. Depuis les années 1990, les avancées médicales ainsi que les changements socio-démographiques ont permis de fortement contenir les maladies cardiovasculaires dans les pays à haut niveau de développement. Cependant, sur les cinq dernières années, l'incidence des maladies cardiovasculaires stagne dans les pays à revenus élevés comme dans les pays à revenus faibles et intermédiaires, pour des raisons différentes. En effet, les pays aux revenus les plus élevés font face à un vieillissement global de leurs

populations alors que les pays en voie de développement combinent une augmentation rapide de la population et une exposition récente et généralisée à de nombreux facteurs de risques cardiovasculaires. Si les facteurs de risques sont les mêmes indépendamment des revenus, les études mettent en évidence des disparités en matière de prévention des risques cardiovasculaires, en particulier dans les pays en développement qui font également face à des pathologies infectieuses beaucoup moins présentes ailleurs.

En France, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine d'environ 160 000 décès par an et représentent la première cause de mortalité chez la femme et la seconde chez l'homme après le cancer. Sur les 120 000 personnes victime d'un infarctus du myocarde chaque année, 10% décèdent dans l'heure, 15% dans l'année ; ce qui représente 18 000 décès par an⁷. On estime à environ 3 à 4 millions le nombre de personnes actuellement traitées pour des pathologies associées à une atteinte cardiovasculaire. Selon les données de Santé Publique France, plus d'1 million de personnes sont hospitalisées chaque année pour traiter une maladie cardiovasculaire.

B. L'infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde (IM) est défini sur le plan physiopathologique comme une nécrose myocardique d'origine ischémique⁸. Il est très souvent le résultat d'une complication ou conséquence d'une maladie coronarienne aiguë préexistante. Bien qu'il s'agisse le plus souvent d'une occlusion provoquée par un processus athéro-thrombotique lié à une rupture de plaque d'athérome, d'autres mécanismes bien que plus rares peuvent être impliqués ; c'est le cas du vasospasme, de la dissection de l'artère coronaire, des artérites inflammatoires non athéromateuses ou encore de l'embolie coronaire.

Sur le plan clinique, l'IM n'a pas la même ampleur et ne se manifeste pas de la même manière chez tous les patients, les symptômes couvrant un très large spectre allant de la mort subite à un événement mineur asymptomatique en passant par différents tableaux de choc cardiogénique. Afin de pouvoir identifier au mieux les symptômes associés à l'IM, il a donc été important de recueillir le maximum d'informations sur les symptômes et tableaux cliniques pour le diagnostiquer le plus précisément et rapidement possible. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a pu dès les années 1970 fournir des critères standards pour le diagnostic de l'IM⁹. En 1979, un rapport joint de l'OMS et la Société Internationale et Fédération de Cardiologie ont publié une révision de cette définition¹⁰.

L'IM du myocarde était alors diagnostiqué à partir de mesures enzymatiques, de relevés d'électrocardiogrammes (ECG) ou d'observations post-mortem :

- (a) ECG montrant des ondes Q pathologiques et / ou une élévation ou dépression du segment ST ;
- (b) antécédents d'angines de poitrine (typiques ou atypiques) avec des changements évidents d'ECG ou des enzymes élevées (troponine, myoglobine ou encore créatine kinase) ;
- (c) antécédents d'angine de poitrine atypique et des enzymes élevées sans nécessairement de changements sur l'ECG ;
- (d) pour les cas mortels, soudains ou non, une autopsie montrant un infarctus du myocarde ou une occlusion coronaire récente (thrombus *ante mortem*, embolisme ou hémorragie dans une plaque d'athérome).

Après des révisions successives par les différentes entités compétentes¹¹ et en tenant compte des nouveaux éléments de diagnostic modernes tels que l'imagerie myocardique ou l'angiographie coronaire, l'OMS publie en 2008 une nouvelle version de la définition de l'IM¹², qui doit alors être diagnostiqué quand l'un des critères suivants est respecté :

- 1) Détection d'une augmentation des biomarqueurs cardiaques, de préférence la troponine C, avec au moins l'un d'eux atteignant le 99^e percentile supérieur de la limite de référence, associé à des signes d'ischémie myocardique avec au moins l'un des symptômes suivants :
 - a. Un certain nombre de combinaisons de douleurs à la poitrine, aux extrémités supérieures, à la mâchoire ou un malaise épigastrique, pendant un effort ou au repos. Le malaise est habituellement inférieur à 20 minutes, souvent diffus, non localisé, non positionnel, non affecté par le mouvement de la région. Il peut être accompagné d'une dyspnée, d'une diaphorèse, d'une nausée ou d'une syncope ;
 - b. Des modifications significatives des ondes S et T au niveau de l'ECG ;
 - c. Le développement d'ondes Q pathologiques détectées à l'ECG ;
 - d. Une perte de masse ventriculaire viable ou la détection des régions akinétiques par imagerie.
- 2) Une mort cardiaque soudaine et inattendue impliquant un arrêt cardiaque, parfois précédé de symptômes suggérant une ischémie myocardique et accompagnée :
 - a. D'une élévation *a priori* récente du segment ST,
 - b. De l'évidence de la formation d'un thrombus récent par angiographie coronaire et/ou lors de l'autopsie ;
- 3) Indices d'une forme aiguë d'infarctus du myocarde détectée au moment de l'autopsie.

En 2012, une nouvelle définition de l'IM est élaborée par ce même consensus international, tenant compte des avancées scientifiques et médicale dans la détection des enzymes ou les mesures d'ECG⁸. Enfin, la définition actuelle date de 2018. Elle tient notamment compte des progrès en termes de résonance magnétique appliquée au domaine cardiovasculaire et d'angiographie coronaire par tomographie à densité (coronary CT-angiography). Cette définition permet également la distinction entre l'IM, les lésions myocardiques et les lésions consécutives à des interventions chirurgicales, cardiaques ou non-cardiaques¹³. Il s'agit donc de la quatrième

définition universelle de l'IM, qui permet de définir 5 types d'IM, basés sur les critères suivants :

Pour l'IM de type 1, associé à un thrombus (occlusif ou non) et de type 2 (associé à un déséquilibre de l'apport en oxygène, sans thrombus), illustrés en Figure 1 :

- Détection d'une élévation / diminution d'un biomarqueur cardiaque (de préférence la troponine C cardiaque (TNc) avec au moins une valeur au-dessus du 99^e percentile de la limite supérieure de référence, accompagné d'au moins un des éléments suivants : Symptômes d'ischémie aiguë, changements d'ECG indiquant une ischémie, développement d'ondes Q pathologiques, preuve d'une perte de myocarde viable par l'imagerie ou preuve d'un thrombus coronaire par angiographie.

Pour l'IM de type 3, associé à un décès survenu avant le diagnostic

- Décès d'origine cardiaque précédé de symptômes suggérant une ischémie myocardique avec modifications présumées nouvelles à l'ECG, mais décès survenant avant le prélèvement sanguin, ou avant l'augmentation des biomarqueurs dans le sang ou enfin infarctus détecté lors de l'autopsie.

Pour l'IM associé à une intervention coronaire percutanée (type 4) :

- Définition associée à une élévation des TNc (> 5 fois le 99^e percentile de la limite supérieure) chez des patients présentant des valeurs initiales normales, ou une élévation des valeurs de la TNc > 20% si les valeurs initiales et stables ou en diminution. En plus, il est nécessaire de constater la présence (i) de symptômes ECG indicateurs d'une ischémie cardiaque, (ii) d'ondes Q pathologiques (iii) la preuve d'une nouvelle perte de myocarde viable ou d'une nouvelle anomalie de la contractilité cardiaque à l'imagerie ou (iv) des observations angiographiques compatibles avec une complication associée à une limitation de flux coronaire (occlusion, thrombus, dissection, etc.)

Pour l'IM associé à un pontage coronarien (type 5) :

- Définition arbitraire par une élévation de la TNc (>10 fois le 99^e percentile de la limite supérieure). De plus, il est nécessaire de constater la présence (i) de nouvelles ondes Q pathologiques, (ii) d'une nouvelle occlusion d'une coronaire native ou d'un greffon ou (iii) d'une nouvelle perte de myocarde viable ou d'une nouvelle anomalie de la contractilité relevée par imagerie cardiaque.

L'IM le plus représenté dans la population est l'IM de type 1 associé à une thrombose coronarienne. Les IM de type 2 associés à une inadéquation entre les apports et les besoins en oxygène sans occlusion coronarienne sont minoritaires (environ 15% des cas)¹⁴. La baisse d'apport en oxygène peut alors avoir plusieurs origines :

- une forme d'athérosclérose coronaire, sans rupture de plaque¹⁵ ;
- une vasoconstriction des artères coronaires, liée à un phénomène de vasospasmes comme l'angor de Prinzmetal¹⁶ ;
- une dissection coronaire spontanée, avec ou sans hématome intra mural¹⁷ ;

- une impossibilité de l'organisme à répondre à l'augmentation de consommation d'oxygène (fièvre, hyperthyroïdie, faible de compte de globules rouges ou pression artérielle basse)
- une dysfonction endothéliale, soit l'incapacité d'un vaisseau à se relaxer en réponse à une augmentation du débit sanguin.

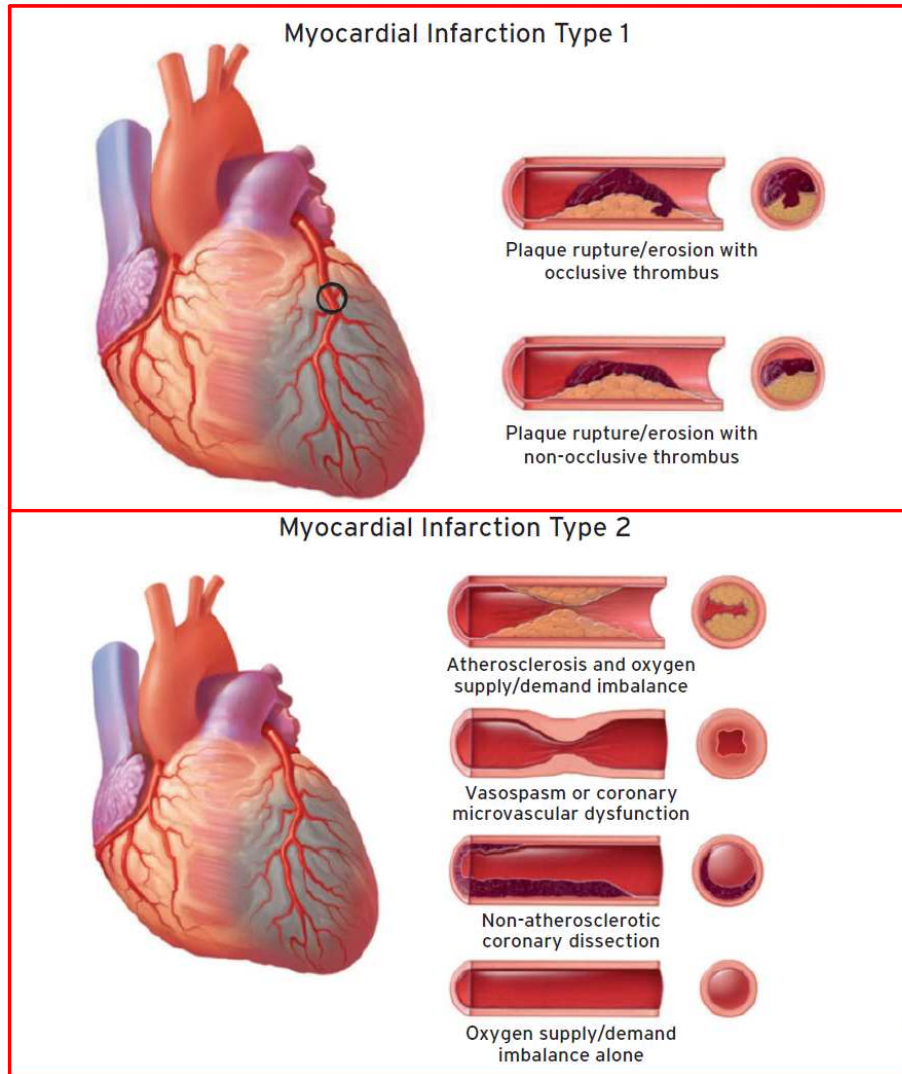


Figure 1 Illustration de l'infarctus du myocarde de type 1 et de type 2.

L'infarctus de type 1 correspond à une occlusion totale ou partielle de l'artère coronaire suite à une rupture de plaque et formation de thrombus. L'infarctus du myocarde de type 2, correspond à une diminution de l'apport en oxygène sans thrombus ni occlusion. D'après *Thygesen et al., Eur Heart J, 2019*.

Ce type d'IM touche le plus souvent les femmes et la mortalité est plus importante que pour les IM de type 1 en raison de la prévalence de comorbidités^{18,19}.

La standardisation de la définition de l'IM est d'une importance capitale car cela constitue un outil indispensable permettant l'obtention de données comparables afin d'évaluer les stratégies de prévention et de traitement à des échelles nationales comme internationales, tout en s'affranchissant des différences dans les systèmes de santé.

C. Prise en charge

L'ischémie provoquée par une thrombose coronaire occlusive ou non-occlusive est réversible dans les premières heures. Par conséquent, la reperfusion du myocarde, qu'elle soit médicamenteuse ou interventionnelle doit se faire en urgence. En effet, si cette reperfusion est tardive celle-ci peut avoir des conséquences délétères aussi importantes que l'ischémie en elle-même²⁰. La stratégie actuelle consiste à limiter l'extension de la thrombose et faciliter la recanalisation par traitement médicamenteux et/ou interventionnel, par angioplastie percutanée ou pontage aorto-coronarien pour les cas les plus sévères ou en cas de dissection artérielle. Cette stratégie a permis d'améliorer grandement le pronostic des patients atteints d'IM²¹ (Figure 2). Ainsi, les recommandations sont d'administrer dès que possible à un patient souffrant d'un IM un bolus d'aspirine associé à un antiagrégant plaquettaire de la famille des inhibiteurs du récepteur P2Y₁₂ de l'adénosine diphosphate (ADP). Le Clopidogrel a d'abord été utilisé, puis plus récemment le Prasugrel ou le Ticagrelor. Par anticipation d'une angioplastie percutanée, il peut y avoir ajout d'inhibiteur des glycoprotéines Gp2b3a (Tirofiban, Eptifibatide). Enfin, un traitement anticoagulant inhibant l'activité des facteurs de la coagulation de type Xa et/ou IIa (héparine non fractionnée, héparines de bas poids moléculaires ou encore Enoxaparin) est également recommandé²².

A la suite de ce traitement visant à limiter l'extension du thrombus, il est urgent de permettre la reperfusion du myocarde. Il existe trois manières pour cela : la thrombolyse médicamenteuse, l'angioplastie percutanée ou le pontage aorto-coronarien. Plusieurs critères entrent en compte dans le choix de la méthode. Bien que la contre-indication à la thrombolyse, en raison d'un traitement anticoagulant déjà en cours ou un risque important de saignement, soit un critère majeur à prendre en compte, le principal élément pour le choix de la méthode de reperfusion est à l'heure actuelle le délai d'accès à une salle de cathétérisme. Dans le cas d'un délai d'admission en coronarographie inférieur à 120 minutes, l'angioplastie sera privilégiée. En revanche, pour des délais supérieurs à 120 minutes, le choix de la thrombolyse sera fait.

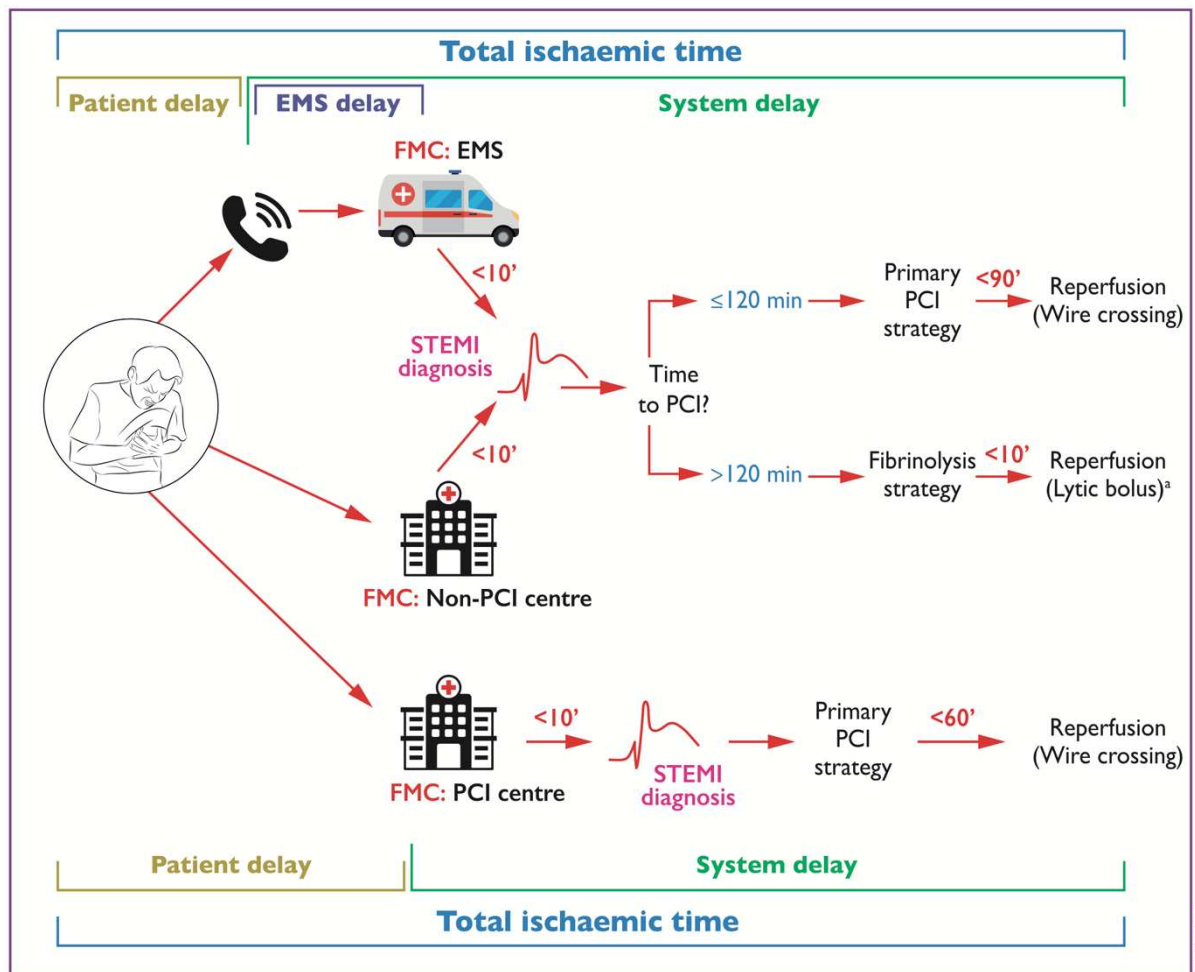


Figure 2 Organigramme de choix de la stratégie de reperfusion

Le choix du traitement dépend notamment des équipements à disposition et des délais d'accès à la coronarographie. FMC : First medical contact ; EMS : emergency medical system ; PCI : percutaneous coronary intervention, STEMI: ST-elevated myocardial infarction. D'après *Ibanez et al., Eur. Heart. J., 2018*.

(1) Thrombolyse médicamenteuse

Utilisée dès le début des années 1980, la thrombolyse médicamenteuse, également appelée fibrinolyse thérapeutique, consiste en l'utilisation d'agents thrombolytiques pour fracturer le thrombus et permettre la reperfusion de l'artère occluse. Dans le cas de la thrombolyse appliquée à l'IM, une forme recombinante de l'activateur tissulaire du plasminogène (rtPA) associée à de l'héparine (non fractionnée ou de bas poids moléculaire) seront utilisés afin de stimuler la fibrinolyse secondaire par la plasmine. De nombreuses études montrent ainsi les bénéfices de l'utilisation de ce traitement²³. Dans la majorité des cas, la thrombolyse intraveineuse permet donc de reperfusionner l'artère coronaire dans un délai de 30 à 60 minutes. Cela s'accompagne également d'une diminution de la douleur et d'une réduction du décalage du segment ST. Cependant, ce traitement reste associé à un risque élevé de récurrence précoce et une coronarographie reste nécessaire pour vérifier la reperfusion par angiographie et établir un bilan des lésions. En cas d'échec de cette thérapie, il faut réaliser une angioplastie de sauvetage.

(2) Angioplastie percutanée

L'angioplastie transluminale percutanée permet de rétablir le flux sanguin coronaire en ouvrant les artères occluses à l'aide d'un cathéter inséré dans l'artère fémorale ou radiale, avec un guidage associé à l'imagerie rayons-X. Méthode réalisée pour la première fois par Charles Dotter en 1964 sur le chien, la première angioplastie coronaire chez l'Homme date de 1977 par Andreas Grüentzig²⁴. Dans le cas d'angioplastie coronaire (Percutaneous coronary intervention, PCI), le thrombus est aspiré (si l'IM est associé à un thrombus) et un ballon est inséré puis gonflé au niveau de la zone d'intérêt afin de restaurer le diamètre natif de l'artère. Depuis, il y a eu de nombreux progrès dans la PCI ; le principal étant le développement d'endoprothèses coronaires, les stents, dans les années 1990²⁵. Différentes technologies de stents ont été développées : les stents métalliques nus (BMS, Bare Metal Stent) ; les stents couverts de molécules actives (DES, Drug Eluting Stents) afin de limiter la resténose associée à la prolifération des cellules musculaire lisses (CML) sur la surface du stent ; DES avec polymères biodégradables, stents auto-expansibles ; *etc.*²⁶. Dès le début des années 1990, de nombreuses études montrent que l'angioplastie coronaire réalisée tôt est plus intéressante que la thrombolyse^{27,28}.

(3) Pontage aorto-coronarien

La dernière méthode de reperfusion coronaire est le pontage aorto-coronarien (ou Coronary Artery Bypass Graft, CABG). Elle n'est cependant indiquée que dans les situations de sauvetage : échec de thrombolyse ou de PCI, IM étendu dans une zone anatomiquement défavorable à la PCI, sténose serrée du tronc commun ou encore dans le cas de complication mécaniques de l'IM : anévrisme, rupture pariétale ou rupture de pilier mitral²⁹. Dans ces cas, l'objectif de la chirurgie est de contourner l'artère obstruée en greffant en aval de cette dernière un vaisseau prélevé sur le patient. La première chirurgie réussie de ce genre sur patient date de 1964³⁰. En général, les vaisseaux utilisés pour les greffes sont soit les veines saphènes dans la jambe ou les artères mammaires. Si les artères mammaires montrent de meilleurs résultats dans la plupart des cas, l'utilisation de veine saphène semble préférable dans le cas de pontage d'une artère coronaire droite fortement sténosée³¹. Cependant, malgré la revascularisation, la mortalité reste élevée à la suite d'un pontage³².

D. Physiopathologie de l'infarctus du myocarde

L'IM est la résultante d'une ischémie massive et prolongée du myocarde, entraînant une mort massive des cellules. Cette ischémie est liée à un défaut de perfusion sanguine au niveau d'une artère coronaire, associée à une privation locale de sang et donc d'oxygène, entraînant ainsi des dommages irréversibles sur une partie du myocarde. Cette diminution de l'apport en oxygène peut être associée à une occlusion et un thrombus coronaire ou non.

Dans la majorité des cas, l'IM est provoqué par la rupture d'une plaque d'athérome, ce qui va entraîner l'occlusion totale ou partielle de l'artère à la suite d'un processus athérotrombotique³³. L'athérosclérose, pathologie aux causes et mécanismes complexes, est associée à un remodelage de l'*intima* des artères³⁴. Des altérations de l'endothélium des artères de moyen et large calibre favorisent l'accumulation et la rétention au sein de l'*intima* des artères de lipoprotéines de basses densité oxydées (oxLDLs). Cette accumulation entraîne l'activation des cellules endothéliales ainsi que le recrutement et l'infiltration de monocytes et macrophages au sein de la plaque. La phagocytose de ces oxLDLs par les monocytes, macrophages et cellules musculaires lisses (CML) aboutit à leur transformation en cellules spumeuses puis leur nécrose, libérant ainsi leur contenu lipidique dans ce qui constituera le cœur de la plaque. Cela génère de nouveaux signaux de chimioattraction, entraînant le recrutement de davantage de cellules et l'accumulation de lipides dans la plaque³⁵. En parallèle de cette accumulation de lipides, les CMLs prolifèrent et produisent de la matrice extracellulaire pour renforcer cette plaque. La plaque finit néanmoins par se fragiliser et s'éroder ou se rompre, exposant le facteur tissulaire sous-endothélial, ce qui entraîne l'activation de la cascade de coagulation et donc la formation d'un thrombus et l'occlusion totale ou partielle de l'artère³⁶ (Figure 3).

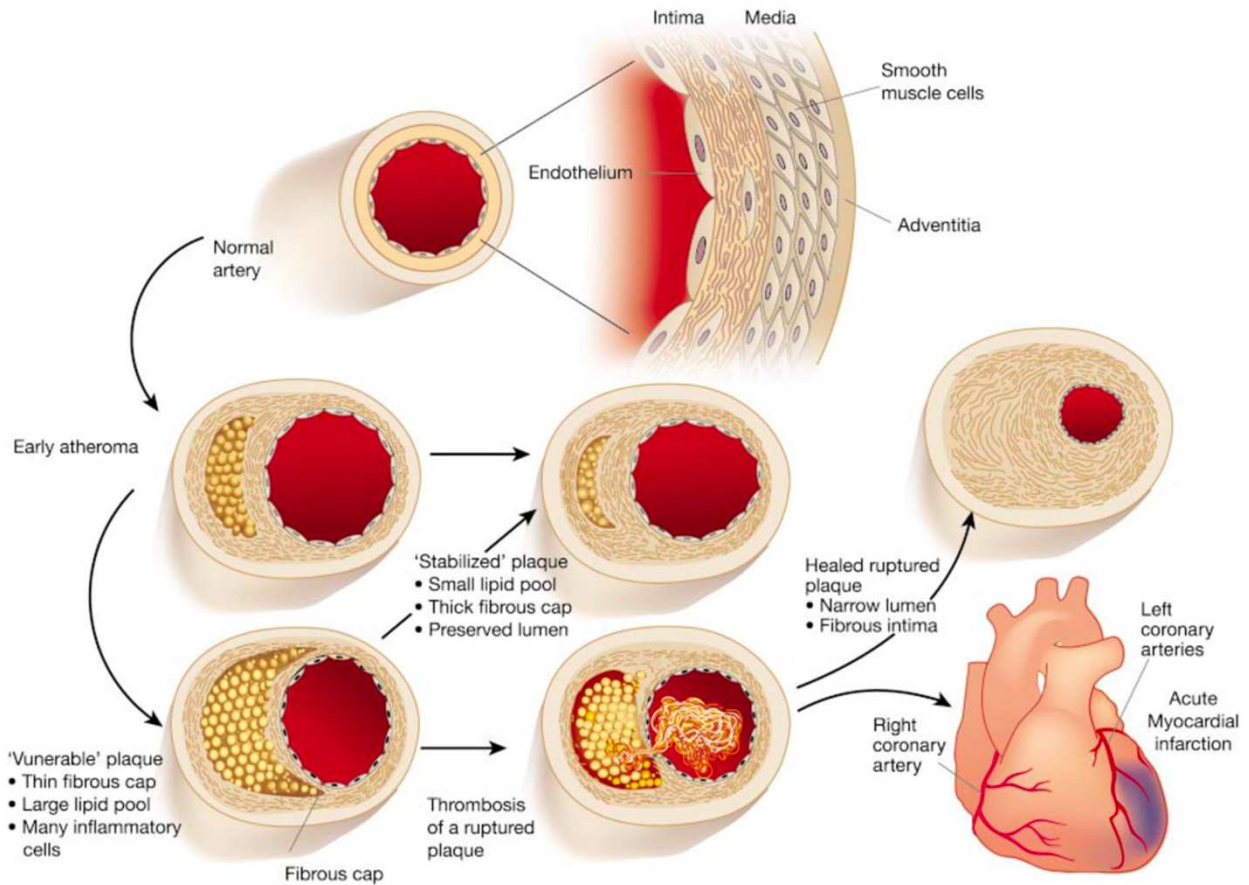


Figure 3 Formation de la plaque et progression jusqu'à la rupture et l'infarctus du myocarde

L'artère coronaire saine présente une structure trilamininaire. L'*intima* : les cellules endothéliales en contact avec le sang dans la lumière de l'artère reposent sur une membrane basale. La limitante élastique interne forme la barrière entre l'*intima* et la *media*. La *media* est constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses (CML) au sein d'une matrice riche en collagène et en élastine. La limitante élastique externe sépare ensuite la *media* et l'adventice. A un stade précoce d'athérosclérose, l'accumulation de lipides et le recrutement de cellules inflammatoires dans l'*intima* conduisent à la formation d'un noyau riche en lipide, et l'artère s'élargit vers l'extérieur. Si les conditions inflammatoires prévalent et que des facteurs de risque tels que la dyslipidémie persiste, le noyau lipidique peut croître, les protéinases sécrétées par les leucocytes activés vont dégrader la matrice extracellulaire, tandis que les cytokines pro-inflammatoires limitent la synthèse de nouveau collagène. Ces changements peuvent amincir la chape fibreuse, la rendre friable et susceptible de se rompre. Lorsque la plaque se rompt, le sang en contact avec le facteur tissulaire présent dans la plaque coagule et forme un thrombus. Si le thrombus obstrue totalement le vaisseau, un infarctus aigu du myocarde peut se produire. Le thrombus peut se résorber grâce à une thrombolyse endogène ou thérapeutique. L'empiètement de la plaque fibrosée sur la lumière de l'artère peut restreindre le flux, entraînant une ischémie qui provoque généralement des symptômes tels que l'angine de poitrine. À un stade avancé, les plaques devenues plus fibreuses, peuvent s'avérer moins sensibles à la rupture et à une nouvelle thrombose. L'hypolipidémie peut réduire la teneur en lipides et réduire la réponse inflammatoire intimale, ce qui permet d'obtenir une plaque plus stable, avec une chape fibreuse épaisse et une lumière préservée tout en évitant la rupture de la plaque. D'après Libby, *Nature*, 2002.

Sur le plan pathologique, l'IM correspond à une mort cellulaire au sein du myocarde en raison d'une ischémie prolongée. Les premiers changements structurels sont visibles quelques minutes après le début de l'ischémie, avec une relaxation des fibres contractiles (myofibrilles) et disruption des membranes des cellules musculaires (sarcolemmes)³⁷. Au niveau cellulaire, on constate une diminution du glycogène cellulaire ainsi que des anomalies mitochondriales dès 10 minutes d'ischémie³⁸.

Dans les modèles expérimentaux d'IM, la mortalité des cardiomyocytes survient dès 10 minutes après le début de l'ischémie. Les examens *post-mortem* montrent que la nécrose des myocytes peut apparaître après plusieurs heures³⁹. Selon les modèles expérimentaux, la nécrose progresse de l'endocarde vers le péricarde sur plusieurs heures. Cette progression peut être ralentie grâce à une circulation collatérale augmentée, une diminution de la consommation en oxygène du myocarde ou une occlusion/reperfusion coronaire intermittente⁴⁰. Enfin, la mise en application rapide des thérapies de reperfusion appropriées permet de limiter les dommages du myocarde consécutifs à l'ischémie⁴¹.

E. Le remodelage post-ischémique dans l'infarctus

Le remodelage cardiaque post-ischémique peut être bénéfique et peut permettre au cœur de retrouver un équilibre semblable à celui qu'il avait avant l'IM. Inversement, le remodelage peut échouer à rétablir l'équilibre cardiaque. Il est alors nommé délétère et associé à la dégradation progressive de la fonction cardiaque, qui évoluera vers l'insuffisance cardiaque.

Le remodelage est un processus complexe faisant intervenir les cellules inflammatoires infiltrées dans le myocarde, des cytokines et chimiokines (CK), des médiateurs neuroendocriniens, différentes formes de stress mécanique aboutissant à des modifications cellulaires, moléculaires et tissulaires importantes ainsi qu'à des modulations d'expression génique. Les cardiomyocytes sont la cible majeure du remodelage cardiaque post-ischémique. Toutefois, d'autres cellules telles que les cellules endothéliales, les fibroblastes mais aussi la matrice extracellulaire jouent également un rôle crucial ce processus. Le remodelage cardiaque consécutif à un IM peut être divisé selon 3 phases principales et distinctes (Figure 4). A la suite de l'occlusion de l'artère coronaire par un thrombus, la réduction de perfusion du tissu cardiaque environnant entraîne une diminution de la concentration locale en oxygène (hypoxie) et en nutriments. La principale manifestation de cet événement ischémique, qu'il soit prolongé ou non, est la mort des cardiomyocytes dans les heures suivant son occurrence. Cela conduit à l'activation de la réponse inflammatoire pendant laquelle les cellules immunitaires infiltrées au sein du myocarde lésé vont éliminer les cellules mortes. Ceci mène à l'accumulation de

protéines matricielles, à l'hypertrophie des cardiomyocytes et enfin à la revascularisation *via* le remodelage des vaisseaux collatéraux préexistants et/ou la formation de nouveaux vaisseaux dans le myocarde infarci, permettant de poser les bases du remodelage cardiaque⁴².

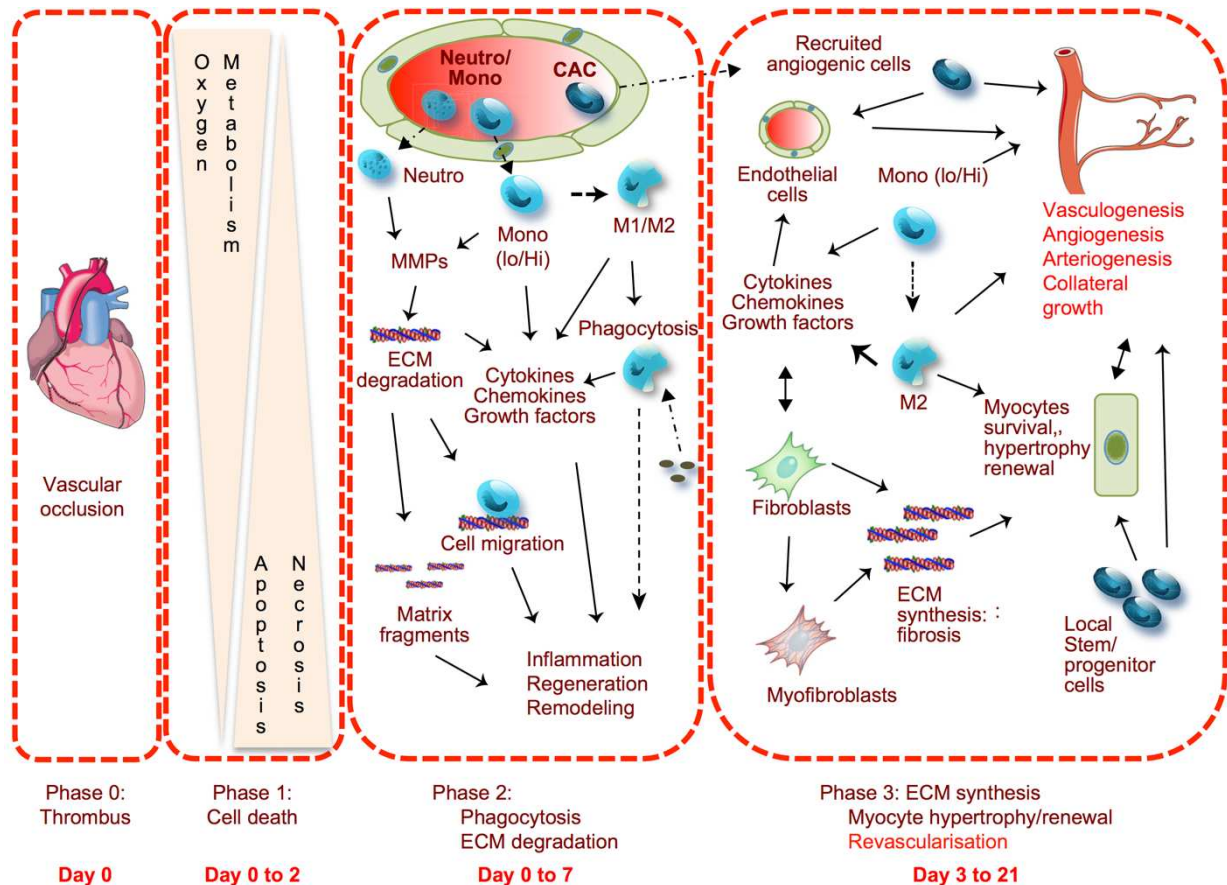


Figure 4 Les trois phases du remodelage cardiaque post infarctus.

L'occlusion initiale, liée à la formation d'un thrombus, entraîne une ischémie et hypoxie tissulaire, suivie d'une mort cellulaire massive (phase 1) ; suivie d'une phase d'inflammation intense (phase 2) consistant en le recrutement de nombreux types de cellules inflammatoires pour éliminer les débris. Cela aboutit par la suite à la déposition de protéines de matrice extracellulaire, hypertrophie des cardiomyocytes et revascularisation *via* la formation de nouveau vaisseaux (phase 3). Neutro, neutrophiles ; Mono, monocytes ; CAC cellules angiogéniques circulantes ; M1/M2, macrophages de types 1 et type 2 ; MMP, métalloprotéinases ; ECM, matrice extracellulaire. D'après Silvestre *et al.*, *Physiol. Rev.*, 2013.

(1) Hypoxie, apoptose et nécrose

Une des grandes caractéristiques des cellules des mammifères est le métabolisme cellulaire aérobie. C'est pourquoi la disponibilité de l'oxygène au sein d'un tissu influe fortement sur les éventuelles conséquences physiopathologiques⁴³. Dans le cas de l'IM, l'occlusion d'une artère par un thrombus va être à l'origine d'une interruption de l'apport en oxygène au sein du tissu. La principale conséquence en sera un changement rapide et brutal du métabolisme des cellules⁴⁴. Cette activation d'un métabolisme anaérobie entraîne rapidement un épuisement des réserves lié à une limitation de l'apport en énergie : à quantité équivalente de glucose, le métabolisme anaérobie est dix fois moins efficace que le métabolisme aérobie pour la

production d'ATP. D'autres conséquences de ces changements métaboliques sont l'accumulation du calcium intracellulaire et de produits de l'activité métabolique cellulaire (protons, CO₂) entraînant une chute du pH. La combinaison de tous ces changements conduit finalement à une augmentation de la mort cellulaire au sein du tissu affecté.

Il existe deux formes distinctes de mort cellulaire : l'apoptose, mode de mort cellulaire « ordonné » ; et la nécrose, mode « non contrôlé ». À la suite des changements rapides de métabolisme et à l'accumulation intracellulaire de composés toxiques, un grand nombre de cellules directement impactées par l'hypoxie vont entrer en nécrose. La nécrose consiste en une disruption rapide et incontrôlable de l'homéostasie cellulaire, une accumulation d'eau aboutissant à une rupture de la membrane cellulaire et des organelles, conduisant ainsi à une dispersion dans le milieu extracellulaire de composés intracellulaires⁴⁵. A l'inverse, l'apoptose est l'aboutissement de mécanismes cellulaires qui peuvent avoir une origine intrinsèque (ADN irréversiblement endommagé, accumulation massive de calcium intracellulaire, *etc.*) ou extrinsèque (activation de la voie TNF- α)⁴⁶. Dès 1996, il a été montré que la nécrose était la voie de mort cellulaire principale des cellules directement irriguées par l'artère occluse alors que l'apoptose affecte plutôt des cellules marginales au sein de la zone périphérique⁴⁷.

A la suite de ce phénomène de mort cellulaire massive et de la nécrose tissulaire associée, un nombre important de signaux sont envoyés à travers l'organisme pour déclencher une réponse du système immunitaire.

(2) Inflammation

Dans les 48 heures suivant l'IM, la mort des cellules et la libération de leur contenu intracellulaire va entraîner une très forte inflammation stérile. Elle va principalement servir à digérer et éliminer les débris cellulaires et les fragments de matrice extracellulaire. Ainsi, les cellules apoptotiques, nécrotiques ou en souffrance vont libérer des facteurs, parmi lesquels les motifs moléculaires associés aux dégâts (DAMPs, Damage Associated Molecular Patterns)⁴⁸. Ces DAMPs se lient aux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptors, PRRs) présents à la surface des cellules de l'immunité innée, des cellules résidentes dans le tissu, ainsi que des leucocytes infiltrés⁴⁹. Cette reconnaissance est à l'origine de l'activation d'une cascade de signaux médiateurs de l'inflammation passant principalement par les voies associées aux Toll-Like récepteurs (TLRs)^{50,51}. En plus des cellules inflammatoires, les fibroblastes jouent un rôle central à la fois par leur capacité de libération de DAMPs et par leur capacité de sécrétion de nombreuses cytokines⁵². En parallèle de cette

signalisation, l'hypoxie entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui facilite l'infiltration des leucocytes⁵³.

Les premières cellules inflammatoires à infiltrer le myocarde sont les neutrophiles, dès les premières heures suivant l'ischémie. Les neutrophiles circulants se fixent sur l'endothélium activé *via* l'expression de CK liés aux glycosaminoglycanes (GAGs) puis immobilisés grâce à la voie des intégrines⁵⁴. Leur infiltration est ensuite facilitée par une faible expression locale des protéines de la matrice extracellulaire⁵⁵. Une fois sur le site de l'inflammation, les neutrophiles libèrent des enzymes protéolytiques qui permettent la dégradation et l'évacuation des débris de cellules et de matrice extracellulaire. Ils libèrent également des facteurs renforçant la réponse inflammatoire⁵⁶.

A la suite des neutrophiles, les monocytes infiltrent le myocarde infarci. Ces cellules immunitaires proviennent de la moelle osseuse et de la rate. On distingue deux types de monocytes ayant deux rôles distincts⁵⁷ : les monocytes Ly6C^{hi} et les monocytes Ly6C^{lo}. Les Ly6C^{hi} sont considérés comme pro-inflammatoires et infiltrent en premier *via* la voie MCP1/CCR2⁵⁸. Ils sont stimulés par une expression massive et soutenue d'interleukine 1 (IL-1). Plus tard, les monocytes Ly6C^{lo}, considérés comme anti-inflammatoires, infiltrent à leur tour le tissu endommagé. Leur arrivée permet notamment la résolution de l'inflammation. Un autre type de cellules impliquées dans la réponse inflammatoire consécutive à l'ischémie cardiaque sont les lymphocytes. De nombreuses études indiquent que la présence de lymphocytes T cytotoxiques au site d'inflammation est délétère⁵⁹ ; d'autre part, il a été démontré que les lymphocytes-B jouent un rôle majeur dans la mobilisation des monocytes Ly6C^{hi}, contribuant de façon majeure à l'activation de la cascade inflammatoire⁶⁰. Enfin, les macrophages jouent un rôle important dans l'inflammation post-ischémique grâce à leur grande plasticité phénotypique. Ils sont importants tant dans l'inflammation que dans sa résolution⁶¹⁻⁶³.

Dans le processus naturel de l'inflammation, certains signaux contribuent à la résolution de l'inflammation à la fin de la phase aiguë. Les cellules immunitaires contribuent elles-mêmes à la résolution de l'inflammation. C'est notamment le cas des monocytes Ly6C^{lo}, des macrophages, mais également des neutrophiles apoptotiques qui contribuent de différentes manières à cette résolution⁶⁴ : libération de médiateurs de la résolution (resolvines) afin de promouvoir l'apoptose des neutrophiles et leur phagocytose tout en inhibant leur infiltration. Ils ont aussi la capacité d'exprimer certains « decoy / scavenger receptors » ou récepteurs dits « leurres » pour dépléter le milieu en médiateurs pro-inflammatoires.

(3) Résolution de l'inflammation et fibrose

Cette dernière phase est celle qui s'inscrit dans la durée et représente « l'après ». C'est au cours de cette phase que de nombreux processus se mettent en place : installation de la fibrose, néovascularisation, hypertrophie des cardiomyocytes, *etc.* Cette phase de réparation est accompagnée d'une réponse inflammatoire totalement différente de la première. Des neutrophiles, monocytes et macrophages et certains sous-types de lymphocytes T infiltrent le tissu et permettent dans un premier temps la résolution de l'inflammation *via* la sécrétion de signaux anti-inflammatoires⁶⁵, l'élimination des cellules inflammatoires en fin de vie et la sécrétion de signaux pro-angiogéniques et pro-fibrotiques.

La résolution de l'inflammation s'accompagne de nombreux changements pour d'autres types cellulaires. Lors de la phase aiguë, les fibroblastes cardiaques présentent un phénotype pro-inflammatoire et promeuvent la dégradation de la matrice extracellulaire⁶⁶. Une signalisation associée à l'IL-1 permet l'inhibition de leur prolifération et maturation, afin de favoriser l'élimination du tissu endommagé avant d'acquiescer un phénotype réparateur^{67,68}. Les signaux anti-inflammatoires sécrétés lors de la phase de résolution conduisent à l'expansion de certaines populations de fibroblastes et à leur différenciation en myofibroblastes, principaux contributeurs à la génération de tissu cicatriciel et de fibrose interstitielle à travers leur sécrétion abondante de matrice extracellulaire⁶⁹. Une des principales caractéristiques de ces myofibroblastes est l'expression de α -SMA. Ces cellules sont stimulées par leur environnement pour sécréter de manière abondante des protéines de matrice extracellulaire et différents types de collagène, afin de remplacer la structure temporaire essentiellement composée de fibrine et fibronectine laissée après la phase de phagocytose⁷⁰. A la fin de cette phase de prolifération commence une phase de maturation où un certain nombre de signaux anti-fibrotiques aboutissent à une inhibition de la prolifération des fibroblastes et à une réduction de la production matrice extracellulaire⁷¹.

(4) La revascularisation post-ischémique

L'autre événement majeur de la phase de remodelage est la revascularisation consécutive à l'ischémie cardiaque. En effet, il a été démontré très tôt que des facteurs angiogéniques étaient libérés dans le tissu cardiaque après IM⁷², et qu'il y avait formation de nouveaux vaisseaux en périphérie de la zone atteinte⁷³. Ce processus d'angiogenèse est indispensable pour le remodelage tissulaire. L'inflammation joue un rôle important dans le processus angiogénique *via* la sécrétion par différentes cellules immunitaires de nombreux signaux, dans un premier temps anti-angiogéniques (tels que l'IL-18⁷⁴ ou l'IL-10⁷⁵) sécrétés par les mastocytes,

macrophages ou cellules dendritiques, puis pro-angiogéniques (VEFG, FGF, MMP9)^{76,77} libérés notamment par les monocytes et les macrophages au moment du déclenchement de la phase de résolution de l'inflammation.

(5) Equilibre inflammation / réparation

Étant donné son importance, son étendue et la diversité des acteurs impliqués, l'inflammation consécutive à l'ischémie est déterminante dans le processus de remodelage. La façon dont les mécanismes se mettent en place dépend fortement du processus inflammatoire. Par conséquent, des changements de composition et d'intensité de l'inflammation peuvent induire un remodelage délétère malgré une activité de revascularisation. En effet, un certain nombre de leucocytes ont des propriétés potentiellement délétères pour le remodelage, surtout dans le contexte de l'ischémie cardiaque : il a été démontré qu'une inflammation excessive, provoquée par une infiltration massive de neutrophiles et de monocytes Ly6C^{hi}, était associée à une hypertrophie accrue et une fonction cardiaque réduite dans un modèle murin d'IM, malgré un effet supérieur sur l'angiogénèse dans la zone périphérique⁷⁸. D'autre part, le rôle des lymphocytes T est également à double tranchant : si certains présentent une activité cytotoxique sur des cardiomyocytes *in vitro*⁶⁵, ce qui pourrait avoir des effets négatifs *in vivo* si leur activation est trop importante au sein du tissu, certaines d'études indiquent un rôle protecteur des lymphocytes T régulateurs dans l'ischémie, qu'il s'agisse d'ischémie du membre inférieur⁷⁹ ou d'ischémie cardiaque⁸⁰.

De même, certaines cytokines pro-inflammatoires favorisent une inflammation accrue et sont associées à un remodelage délétère notamment *via* un excès de fibrose, malgré leur activité pro-angiogénique. C'est le cas de l'IL-6 : il a été montré une corrélation entre le taux IL-6 circulant et les modifications géométriques du ventricule gauche après l'IM chez l'Homme⁸¹ ; d'autre part une inhibition de la signalisation de l'IL-6 *via* l'utilisation d'anticorps neutralisant son récepteur IL-6R limite l'inflammation et la fibrose après l'IM⁸². A l'inverse, certaines cytokines peuvent avoir un effet bénéfique sur le remodelage malgré des propriétés anti-angiogénique. Ainsi, l'IL-10 semble présenter un effet protecteur dans un modèle d'IM chez la souris : l'IL-10, sécrétée par certaines cellules mononuclées provenant de la moelle osseuse limite l'inflammation et permet de réduire les effets délétères du remodelage, à savoir l'hypertrophie et la fibrose^{83,84}.

Une illustration de la précarité de cet équilibre est l'insuffisance cardiaque chronique provoquée par une inflammation chronique du tissu plusieurs semaines voire mois après l'IM (Figure 5). Qu'il s'agisse d'une nouvelle amplification de l'infiltration associée à un défaut lors de la

résolution de l'inflammation ou d'une seconde réponse immunitaire en réponse à certains facteurs, cette inflammation au long-cours aggrave le phénotype cardiaque, entraînant une nouvelle fois apoptose, fibrose et dysfonction contractile⁸⁵.

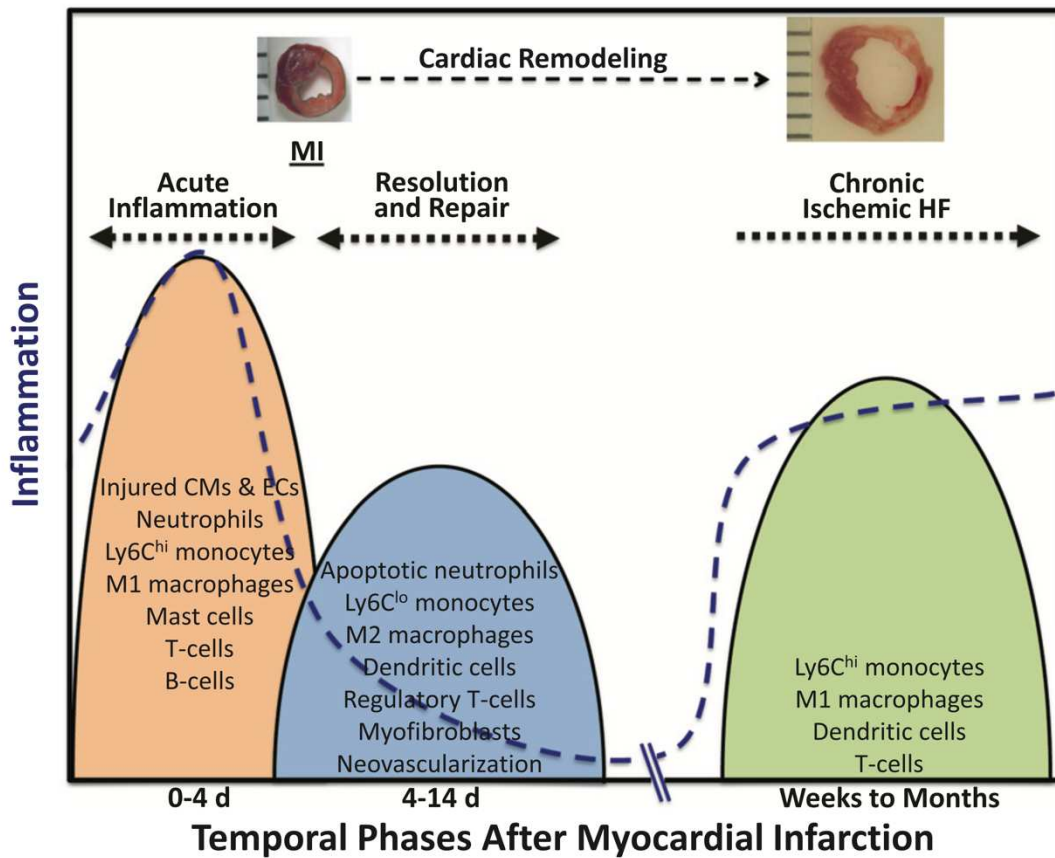


Figure 5 Les trois phases de l'inflammation dans l'infarctus du myocarde

L'inflammation consécutive à l'infarctus du myocarde se déroule en trois phases : une première phase, aiguë et caractérisée par l'infiltration de nombreux types cellulaires ; une seconde phase de résolution de l'inflammation et de réparation tissulaire. Enfin, une dernière phase d'inflammation chronique associée à une résolution incomplète ou une nouvelle augmentation de l'infiltration inflammatoire. Cette dernière phase est liée au développement de l'insuffisance cardiaque chronique D'après *Prabhu & Frangogiannis, Circ. Res. 2016*.

La principale manifestation de ce remodelage délétère est le développement de la fibrose interstitielle, dépôt excessif de matrice extracellulaire. Dans le contexte de l'IM, la fibrose permet de renforcer le tissu et compenser la perte des cellules. Cependant, une fibrose excessive peut avoir des conséquences pathologiques, entraînant une rigidité du ventricule. La rigidité causée par la fibrose et l'épaississement de la paroi ventriculaire suite à l'hypertrophie des cardiomyocytes altèrent les fonctions systolique et diastolique⁸⁶. A une échelle plus locale, la fibrose peut perturber la transmission des contractions des fibres et être associé à des troubles de conduction ou des troubles du rythme⁸⁷.

Ainsi l'équilibre entre les conséquences bénéfiques et délétères du processus de remodelage est extrêmement fin et dépend très fortement de l'homéostasie au sein du tissu endommagé. Pris indépendamment, chaque acteur joue un rôle nécessaire mais pouvant être bénéfique ou délétère

en fonction du contexte et de la chronologie. Il faut donc que chaque type cellulaire soit présent au bon endroit, au bon moment et en quantité adéquate. Cet équilibre se décale progressivement vers l'inflammation, entraînant un remodelage délétère qui aboutit à l'installation d'une insuffisance cardiaque chronique^{88,89}.

F. Insuffisance cardiaque consécutive à l'infarctus et pistes thérapeutiques

L'insuffisance cardiaque est la principale complication de l'IM⁹⁰. En effet, plusieurs études de suivi de patients montrent que selon la classe d'âge, 30 à 50% des patients pris en charge pour un IM en l'absence d'insuffisance cardiaque lors de leur admission en développeront une dans les 5 ans⁹¹. Le développement de l'insuffisance cardiaque est une conséquence directe des nombreux processus cellulaires déclenchés lors de l'IM⁹² (Figure 6). Cette insuffisance peut se déclarer rapidement ou plusieurs années après l'IM. Elle peut être transitoire et se résoudre, réapparaître, être persistante et stable ou encore s'aggraver avec le temps⁹³. Une insuffisance cardiaque détectée lors de l'IM peut être un reflet de la mort cellulaire, une décompensation d'insuffisance préexistante ou liée à un phénomène de régurgitation mitrale en raison de dysfonction des muscles papillaires. Une insuffisance cardiaque qui se déclare peu de temps après peut être la conséquence d'un des phénomènes précédents ou bien lié à une surcharge d'agent de contraste, une tamponnade cardiaque ou un défaut septal. Enfin, une insuffisance cardiaque associée à une dilatation ventriculaire, déclarée longtemps après est une conséquence de la mort cellulaire et fibrose apparaissant durant le remodelage ventriculaire⁹⁴. Le remodelage cardiaque consécutif à un IM est à l'origine de l'insuffisance cardiaque ; l'essentiel de ce remodelage est modulé par un certain nombre de signalisations visant à conduire la bonne cellule au bon endroit au bon moment.

Ainsi, la plupart des décès de personnes ayant eu des antécédents d'IM sont attribués à une insuffisance cardiaque⁹⁵. Les principaux symptômes de l'insuffisance cardiaque sont liés à une fraction d'éjection réduite et des pressions intracardiaques élevées : essoufflement, fatigue, hypertension ou œdème. On parle ici d'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection réduite (ICFEr, ou HFrEF). L'examen cardiaque peut également montrer des anomalies au niveau des valves, du péricarde ou de l'endocarde, des troubles du rythme ou encore des troubles de la conduction électrique.

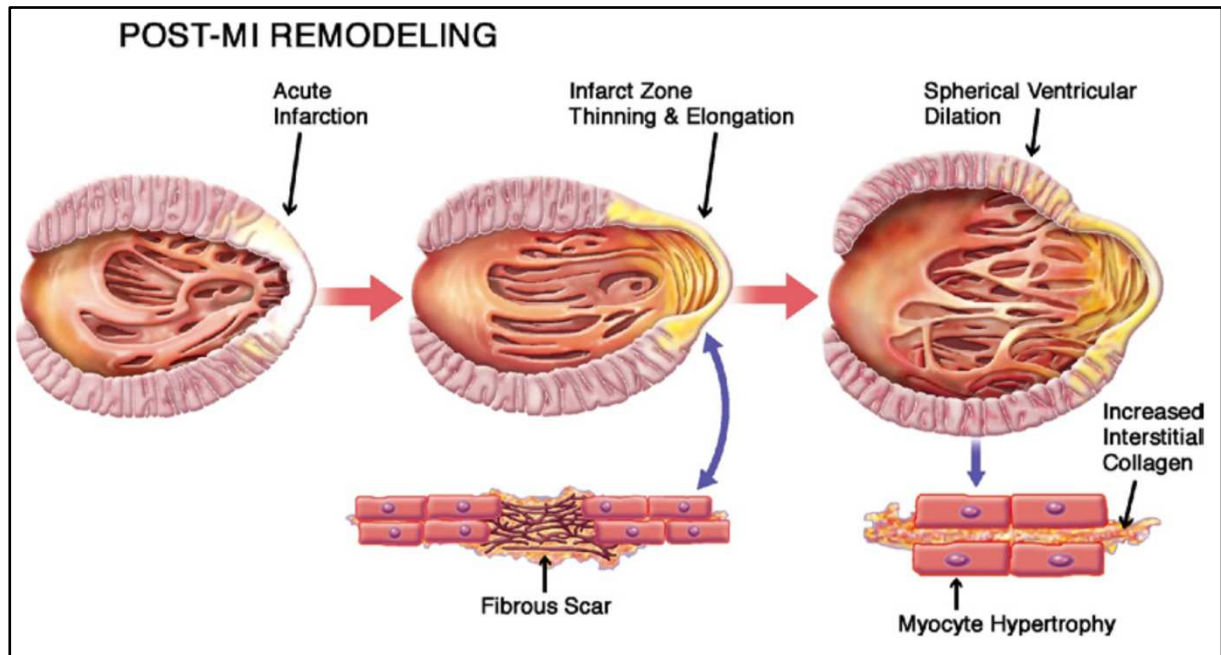


Figure 6 Architecture macro- et microscopique du remodelage ventriculaire post-infarctus.

La phase précoce du remodelage est marquée par l'amincissement et l'élongation de la cicatrice fibreuse dans la zone infarctée. S'en suit une dilatation sphérique du ventricule principalement liée à une hypertrophie diffuse des cardiomyocytes et une augmentation de la fibrose interstitielle, associée au développement d'une insuffisance cardiaque chronique. D'après *Konstam et al., JACC : Cardiovascular Imaging, 2011*

La gestion de l'insuffisance cardiaque commence par le diagnostic, en général réalisé par des moyens écho-cardiographiques ou par imagerie en résonance magnétique (IRM). Une fois l'insuffisance cardiaque diagnostiquée, il s'agit de retarder, prévenir ou atténuer le développement des symptômes. Pour cela, des thérapies médicamenteuses, peuvent être mises en place, utilisées seules ou en combinaison.

En plus de l'utilisation d'inhibiteurs des récepteurs β -adrénergiques, la majorité de ces traitements ciblent le système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (RAAS), mécanisme responsable de la régulation de la pression artérielle et de l'équilibre hydrique⁹⁶ (Figure 7). Ces approches thérapeutiques, recommandés par l'ESC (Société européenne de cardiologie)⁹⁷ et l'AHA (American Heart Association)⁹⁸ visent à bloquer ce système, en utilisant des bloqueurs du récepteur à l'angiotensine (ARB), des inhibiteurs de la rénine (DRI), des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACEI), ou encore des antagonistes du récepteur aux minéralocorticoïdes (MRA).

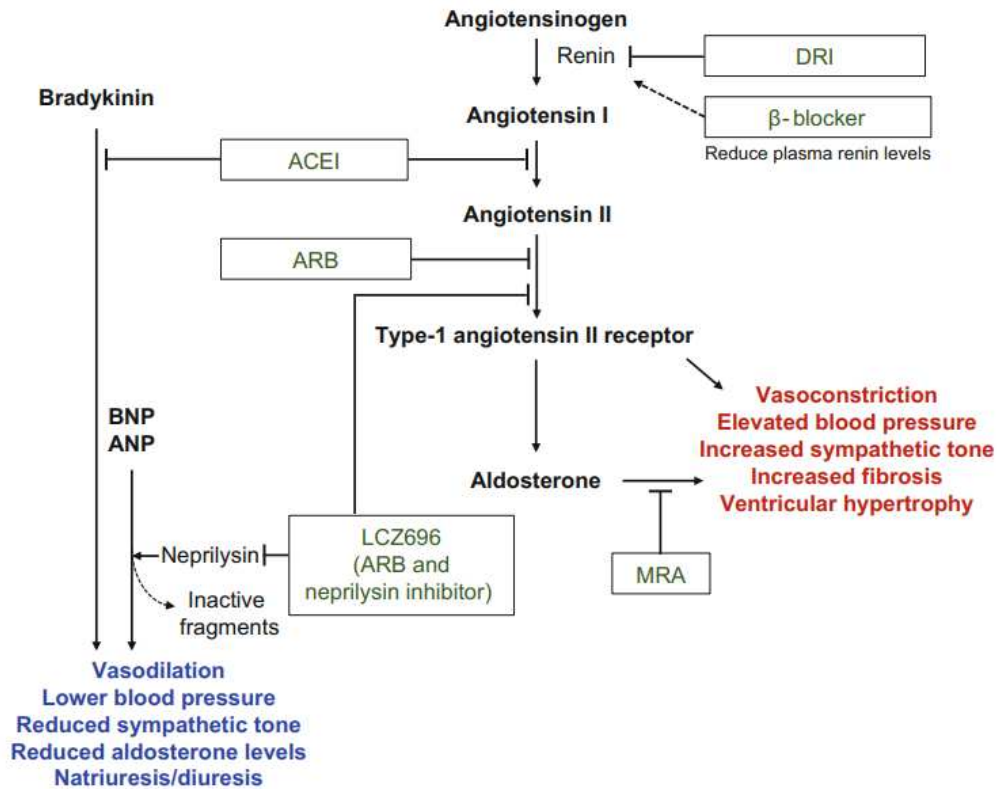


Figure 7 Régulation du système RAA pour limiter la progression de l'insuffisance cardiaque.

RAA Renine-Angiotensine-Aldostérone, DRI direct renin inhibitor, ACEI angiotensin converting enzyme inhibitor, ARB angiotensin receptor blocker, MRA mineralocorticoid receptor antagonist. D'après *Nochioka et al., 2018*

De nombreuses études ont montré les effets bénéfiques sur le pronostic des patients souffrant d'HF_{FrEF} de ces traitements pris individuellement (CONSENSUS⁹⁹ pour l'utilisation de l'ACEI, CHARM pour l'ARB¹⁰⁰) ou en combinaison (ACEI + MRA, étude RALES¹⁰¹ puis EMPHASIS-HF¹⁰², bêtabloquants et ACEI dans l'étude Carvedilol¹⁰³). Cependant, l'action sur le système RAA pourrait montrer ses limites, avec l'étude SUPPORT indiquant que la triple thérapie ACEI, ARB et bêtabloquants n'apporte pas de bénéfices supplémentaires et au contraire, présente des risques accrus de développer événements délétères (mortalité, dysfonctions rénales)¹⁰⁴.

Il existe également des approches chirurgicales. La première alternative est l'implantation d'un défibrillateur automatique (ICD, Implantable cardioverter-defibrillator) afin de prévenir les bradycardies et arythmies potentiellement létales, permettant de réduire la mortalité associée à la mort subite¹⁰⁵. Une autre approche est la thérapie de resynchronisation cardiaque (Cardiac resynchronisation Therapy, CRT) consistant en l'implantation d'un défibrillateur ("pacemaker") permettant de corriger les di-synchronies lors de la contraction¹⁰⁶, réduire les pressions intraventriculaires, aboutissant *in fine* à une amélioration de la fonction cardiaque. La CRT a été étudiée lors de nombreux essais cliniques (COMPANION¹⁰⁷, CARE-HF¹⁰⁸ CARDiac

Resynchronisation in Heart Failure, MIRACLE¹⁰⁹). Si tous indiquent des effets bénéfiques de ce traitement, ils soulignent également que certains patients n'y répondent pas du tout.

Enfin, un certain nombre de nouvelles thérapies sont en développement ou à l'étude afin de tenter de régler le problème à la source : la perte de contractilité. Un moyen d'y parvenir est soit d'activer une réparation du tissu lésé, soit de régénérer *de novo* pour remplacer le muscle atteint. Il existe plusieurs essais cliniques de thérapies cellulaires ayant utilisé des cellules de moelle totale (TOPCARE-CHD¹¹⁰), des cellules souches mésenchymateuses (CSMs) de la moelle (OSIRIS¹¹¹) ou du tissu adipeux (ATHENA¹¹²) ne montrant pas ou peu d'effets délétère et des bénéfices légers, confirmant le potentiel de cette voie thérapeutique. D'autres études, centrées sur des cellules d'origine cardiaque (CHART-I¹¹³, CADUCEUS¹¹⁴) et montrant une légère réduction ou résorption de la cicatrice et une amélioration de la fonction cardiaque, renforcent les perspectives prometteuses de ces approches.

Partie II : Les chimiokines et récepteurs de chimiokines

Les cytokines sont un ensemble de glycoprotéines solubles qui interagissent avec leurs cellules cibles *via* des récepteurs spécifiques et activent de multiples voies de signalisation, entraînant l'activation, la différenciation, la prolifération ou encore la mort de la cellule. La signalisation liée à une cytokine implique bien souvent d'autres cytokines et les mécanismes en jeu sont souvent redondants, certaines voies pouvant être activées par plusieurs cytokines différentes. L'activation par les cytokines peut être paracrine, endocrine, autocrine ou juxtacrine. A la différence des hormones qui circulent à des concentrations nano-molaires (10^{-9} M) et dont les taux peuvent présenter en général des variations de moins d'un ordre de grandeur, les cytokines peuvent être exprimées à des concentrations pico-molaires (10^{-12} M) et leurs taux peuvent être multipliés par 1000 dans des conditions particulières. Enfin, les cytokines peuvent être exprimées par tout type cellulaire alors que les hormones sont souvent produites par un type cellulaire défini.

A. Chimiokines et leurs récepteurs

(1) Les chimiokines

Les chimiokines (CHEMOtactic cytoKINES) sont des cytokines de faible poids moléculaire (8 à 14 kDa) avec une homologie structurale élevée. Elles présentent une structure très homogène entre elles, avec en particulier 4 résidus cystéines (C) dans leur partie N-terminale contribuant à leur structure 3D *via* la formation d'un ou deux ponts disulfures. Les structures des CK sont caractérisées par un domaine N-terminal flexible court, jouant un rôle critique dans l'activation du récepteur de la CK¹¹⁵ ; suivi d'une région en boucle (« β -loop »), prolongée par 3 feuillets β antiparallèles reliés entre eux par de courtes boucles et recouverts par une hélice α C-terminale^{116,117} (Figure 8).

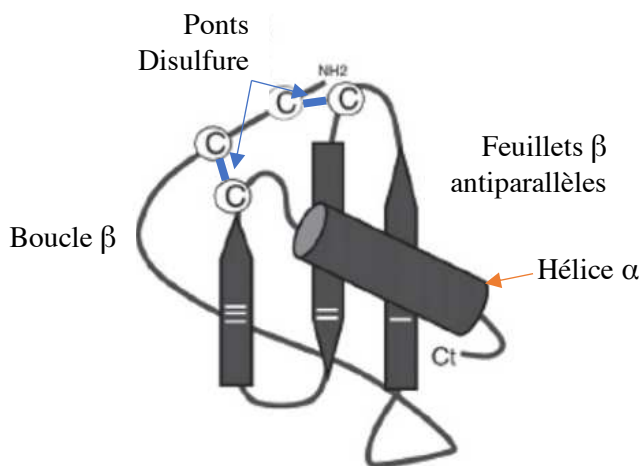


Figure 8 Structure d'une chimiokine

Illustration de la structure d'une chimiokine, avec son domaine N-terminal suivi d'une boucle β , des trois feuillets β antiparallèles suivi d'une hélice α C-terminale (flèche orange) les deux ponts disulfure (flèches bleues) contribuent fortement à la structure de la protéine. D'après Chew et al., *Biomed. Rep.*, 2013.

Environ 50 CKs ont été identifiées chez l'Homme. Leur fonction principale est de réguler le chimiotactisme, c'est à dire la migration cellulaire orientée en réponse à un gradient de CK. Les CK ont longtemps été étudiées essentiellement pour leur rôle dans l'attraction des leucocytes vers les sites inflammatoires¹¹⁸. Sur la base de leur expression puis de leur fonction, les CK ont été initialement classées en deux grandes catégories : constitutives, exprimées à l'état basal ou homéostatique ; inductibles, exprimées dans un contexte inflammatoire ou infectieux. Or cette classification est devenue obsolète étant donné les nombreux autres rôles attribués aux CK et leurs implications dans de nombreux processus physiologiques comme la prolifération, l'apoptose, la fibrose ou encore l'angiogenèse^{119,120}. Il a également été montré que les CK jouaient un rôle dans de nombreuses pathologies telles que les maladies auto-immunes, les phénomènes de rejets, les infections ou encore l'hypertension artérielle¹²¹. Ainsi, une nomenclature commune basée sur la position des résidus cystéines a permis de classer les CK en quatre sous-familles, CXC, CC, CX3C et XC^{122,123} (Figure 9) :

- La famille des α -chimiokines, ou CXC, possèdent un acide aminé (X) entre les deux dernières cystéines, et compte 17 membres à l'heure actuelle. De cette famille, CXCL12 est la CK la plus étudiée pour son rôle dans le trafic leucocytaire et la revascularisation post-ischémique¹²⁴ ;
- La famille des β -chimiokines au motif CC est la plus importante avec plus de 28 membres identifiés. C'est également la famille la plus étudiée, plus particulièrement CCL2 (ou MCP-1) et CCL7 (MCP-3) connus pour leur rôle dans le recrutement des monocytes et macrophages en conditions inflammatoires¹²⁵ ;
- La famille des γ -chimiokines, XC est un peu particulière car ces CK ne possèdent que deux des quatre cystéines. Elle compte deux membres chez l'Homme (XCL1 et XCL2) et un seul chez la souris, XCL1 ou lymphotactine¹²⁶ ;
- La famille des δ -chimiokines, au motif CX3C, avec trois résidus séparant les deux cystéines. Cette famille ne compte qu'un seul membre identifié, CX3CL1 (également appelée fractalkine ou neurotactine) connue pour jouer également un rôle dans la régénération vasculaire¹²⁷.

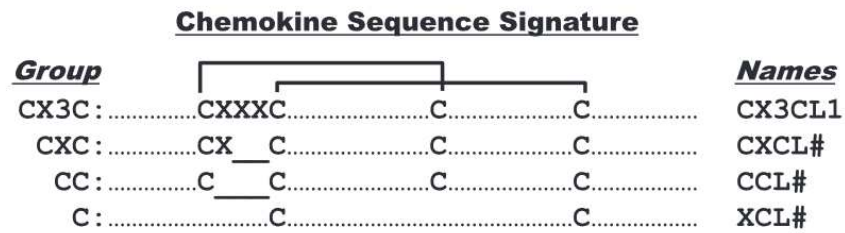


Figure 9 Illustration de la structure des 4 familles de chimiokines

Il y a moins de 30% de similarité dans les séquences d'acides aminés entre les groupes, mais les membres d'une même famille peuvent partager de 30 à 99% de séquence d'acides aminés. Le C représente les résidus Cystéine, les lignes les ponts disulfides. D'après *Bachelier et al., Pharmacol Rev., 2014*.

(2) L'oligomérisation des chimiokines

De nombreuses CK possèdent la capacité de former des dimères ou des oligomères d'ordre plus élevé en solution ou lors de liaison avec d'autres protéines de la matrice extracellulaires telles que les GAGs¹²⁸⁻¹³⁰. Les CK peuvent s'oligomériser avec elles-mêmes (homo-oligomérisation) ou entre-elles (hétéro-oligomérisation) (Figure 10). Néanmoins, peu de choses sont connues sur l'existence des homo- ou hétéro-oligomères de CK *in vivo* et sur leurs effets fonctionnels, la résolution de leur structure étant en général réalisée dans des conditions non physiologiques.

Des analyses en spectroscopie en résonance magnétique nucléaire ou cristallographie indiquent l'existence de dimères et de tétramères pour certaines CK telles que CCL2, CCL4 ou CCL5¹³¹⁻¹³³. Les CK CXC forment également des homo-oligomères par interactions au niveau des feuilletts β , formant des dimères sous la forme d'un feuillet β à 6 brins pour des dimères, 12 pour les tétramères, le reste de la structure étant stabilisée par les hélices α ¹³⁴. C'est le cas de CXCL4 ou CXCL10^{135,136}.

Pour certaines CK, si la forme monomérique est suffisante pour activer le récepteur, un oligomère est nécessaire pour la liaison avec les GAGs et donc pour la chimiotaxie^{137,138}.

L'existence de forme hétérodimériques des CK a également été démontrée, avec par exemple des hétérodimères CCL12/CXCL13, CXCL8/CXCL4 ou encore CCL5-CXCL4¹³⁹⁻¹⁴¹. Les hétéro-oligomères peuvent jouer un rôle majeur dans la modulation des fonctions de CK. Il a été montré que certains hétéro-oligomères se liants à leurs récepteurs respectifs peuvent agir en coopération, avoir des effets inhibiteurs sur les récepteurs, ou présenter de nouvelles voies de signalisation par l'activation simultanée de plusieurs récepteurs^{139,140,142}. La formation des hétéro-oligomères peut aussi avoir un effet indirect en régulant la quantité de CK monomérique disponible et en formant des dimères non fonctionnels. A ce jour, aucune donnée n'est disponible concernant l'oligomérisation des CK *in vivo*.

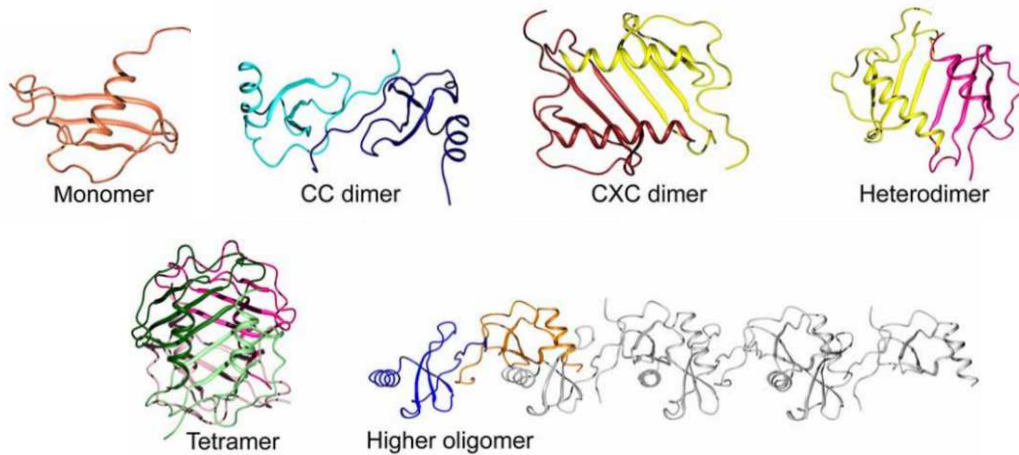


Figure 10 L'oligomérisation des chimiokines

Représentation classique d'une chimiokine sous forme monomérique (CCL20 ; PDB ID 2JYO en orange). Les dimères en CK CC sont formés par des contacts entre les deux domaines N-terminaux (homodimères de CCL2 ; PDB ID 1DOM en bleu). Un dimère de CK CXC est formé par l'interaction entre les feuillets- β stabilisés par les hélices α (CXCL8; PDB ID 1IL8). Une hétérodimérisation est également possible, représentée ici avec CXCL8 CXCL4/PF4 (PDB ID 1IL8 and 1RHP, respectivement). L'organisation en tétramère est aussi assez commune avec la dimérisation de deux dimères de CXCL4 colorés de manière à souligner cette configuration (PDB ID 1RHP). Une oligomérisation d'ordre plus élevé est également possible même si elle est plus rare, comme le polymère de formes dimériques de CCL5 (PDB ID 2L9H). Adaptée du *Nguyen & Vogel, Front. Immunol. 2012.*

(3) Interaction entre les glycosaminoglycanes et les chimiokines

Il a rapidement été démontré après l'identification des différentes familles de CK que leur mécanisme d'action passait par leur immobilisation notamment à la surface de l'endothélium, favorisant l'occurrence de gradients de CK¹⁴³. La formation de ces gradients est d'ailleurs critique pour l'effet des CK sur la migration cellulaire, leur absence entraînant une migration altérée^{144,145}. Cette fixation passe par l'interaction des CK avec les GAGs. En effet, l'utilisation de CK mutées incapables d'interagir avec les GAGs ne leur permet pas d'induire une migration cellulaire¹³⁸.

- Structure des GAGs

Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des macromolécules glucidiques chargées négativement et présentes sur la membrane des cellules. Il existe différents types de GAGs en fonction de leur structure et constitution, parmi lesquels on trouve le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, le kératane sulfate, l'héparane sulfate (HS) ou encore l'acide hyaluronique et l'héparine (Figure 11). Les deux dernières sont les seules formes solubles. Les HS représentent la famille la plus complexe parmi les GAGs, en termes de fonctions comme de variabilités structurelles. La base commune à tout GAG est un polymère linéaire de disaccharide composé d'une osamine (N-acetyl-D-glucosamine (D-GlcNAc) ou N-acetyl-D-galactosamine (D-GalNAc)), et d'un acide uronique (D-glucuronic (D-GlcA) or L-iduronic acid (L-IdoA)).

Cette chaîne est liée à une protéine principale *via* une sérine^{146,147}. Ce polymère peut ensuite subir de nombreuses modifications locales essentiellement sous la forme de sulfatation. Cela aboutit ainsi à des molécules présentant des domaines hautement sulfatées, chargées négativement permettant d'interagir avec les CK *via* des interactions électrostatiques.

- Fonction des GAGs

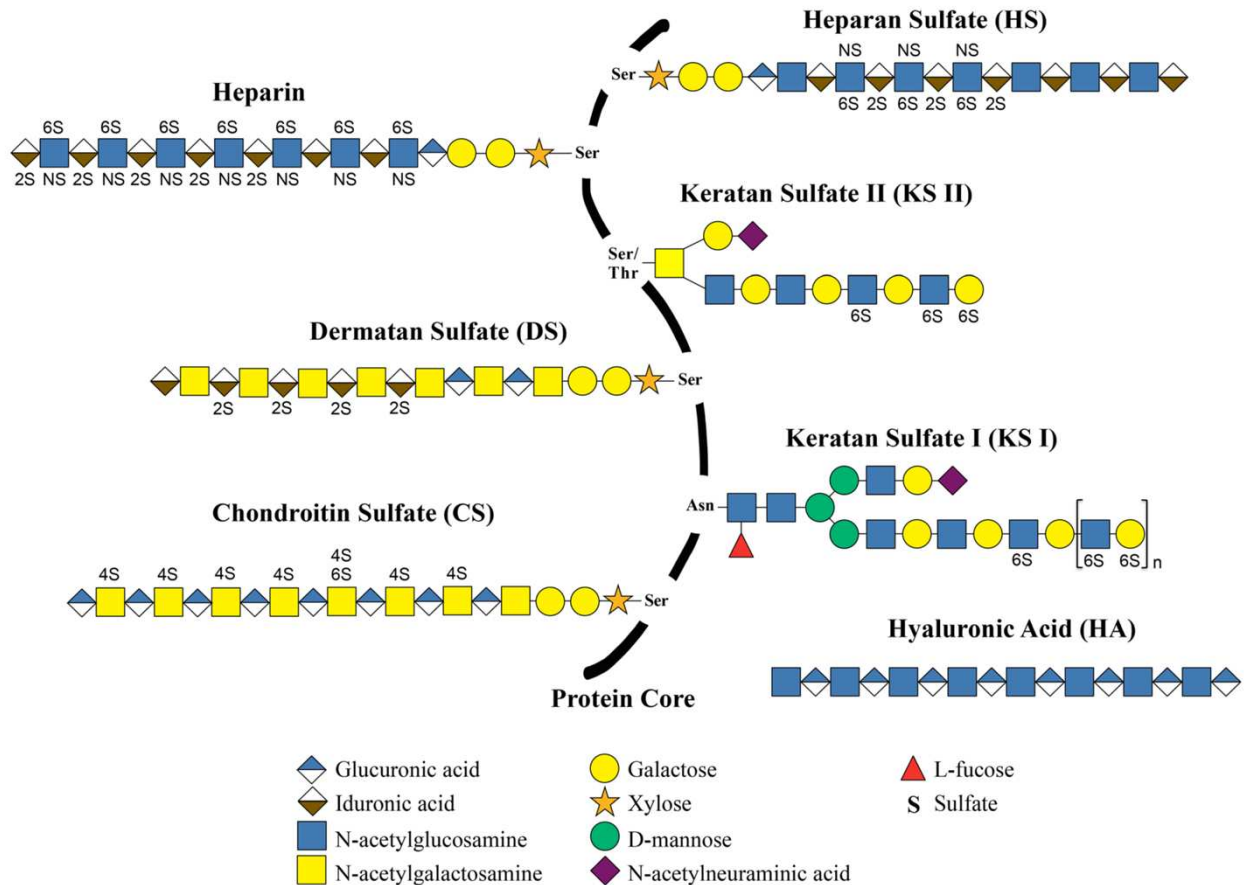


Figure 11 Les glycosaminoglycannes

Représentation des chaînes de glycosaminoglycane héparine, héparane-sulfate, dermatane-sulfate, chondroïtine-sulfate, kératane-sulfate liées à une protéine centrale. L'acide hyaluronique est représenté seul car il n'est pas lié à une protéine centrale. D'après Merida-de-Baros et al., *Parasit. Vectors*, 2018.

Les GAGs participent à différents processus physiologiques comme l'activation ou la liaison de différents ligands tels que les facteurs de croissance et les CK¹⁴⁸. Ils jouent un rôle critique pour la fixation des CK et leur contribution notamment dans les interactions entre les leucocytes et le système vasculaire. Il a été démontré que les vaisseaux présentent des gradients d'HS entre les surfaces luminales et basolatérales et que l'inflammation augmentait fortement le dépôt d'HS au niveau de la matrice extracellulaire. Cela permet donc une modulation précise des gradients de CK dans les vaisseaux¹⁴⁹. De plus, les interactions CK—GAGs sont importantes pour la formation des gradients nécessaire à une réponse inflammatoire adéquate^{138,150}

- Interactions CK/GAGs

Les CK montrent des affinités allant de l'ordre du nano molaire au micro molaire pour les HS. Cette interaction s'établit d'une part grâce à la polarité négative et aux caractéristiques structurales des chaînes des HS, et d'autre part *via* une exposition de résidus basiques (B) formant des motifs consensus BBXB à la surface de la CK (X représentant tout autre résidu). Les détails moléculaires de la façon dont les CK se lient aux GAGs ainsi que la caractérisation des sites de liaison aux GAGs représentent une question complexe. Dès 1989, en fonction de l'agencement des motifs BBXB, deux clusters de CK présentant des séquences consensus de liaison de protéines aux HS suivantes sont identifiées : les groupes XBBXB ou XBBBXXB¹⁵¹. Cependant, des analyses postérieures indiquent que ces sites de liaison ne sont pas nécessairement linéaires mais peuvent inclure des résidus distants dans la séquence, rassemblés selon une orientation spatiale précise suite au repliement de la protéine¹⁵². En ce qui concerne les CK, les résidus impliqués dans la liaison avec les GAGs sont en général dispersés le long de la chaîne peptidique mais sont regroupés dans la structure repliée de la protéine¹⁵³. Dans ces clusters, les domaines de liaison au récepteur et ceux impliqués dans l'interaction avec les HS sont respectivement juxtaposés ou se chevauchent partiellement. De ce fait, la caractérisation des rôles respectifs de deux fonctions paradigmatiques des CK *in vivo*, qui sont l'engagement du récepteur et l'interaction avec les GAGs, s'est avérée difficile.

Un troisième cluster, comprenant uniquement CXCL12 a été identifié. Dans ce cluster, le domaine de liaison au récepteur et le domaine de liaisons aux GAG se trouvent dans des régions distantes et non chevauchantes de la protéine¹⁵⁴ (Figure 12). L'importance des interactions CXCL12/GAG sera plus développée dans la partie IV.

Cette capacité d'interaction GAG-CK permet à ces dernières de se fixer à la matrice extracellulaire, se concentrant notamment sur leur lieu de sécrétion, ce qui entraîne la création d'un gradient chimiotactique, attirant les cellules selon ce gradient vers les zones de plus fortes concentrations^{143,144}. D'autre part, la liaison des CK aux GAGs peut entraîner des changements d'affinités avec leurs récepteurs, certaines interactions étant facilitées ou entravées par la liaison aux GAGs. C'est par exemple le cas de CCL5 pour laquelle la liaison aux GAGs est nécessaire à son interaction avec CCR1, mais sans effets sur son affinité avec CCR5¹⁵⁵. Par ailleurs, la liaison des CK avec les GAGs protège certaines CK des clivages protéolytiques, modulant ainsi leur activité biologique^{156,157}.

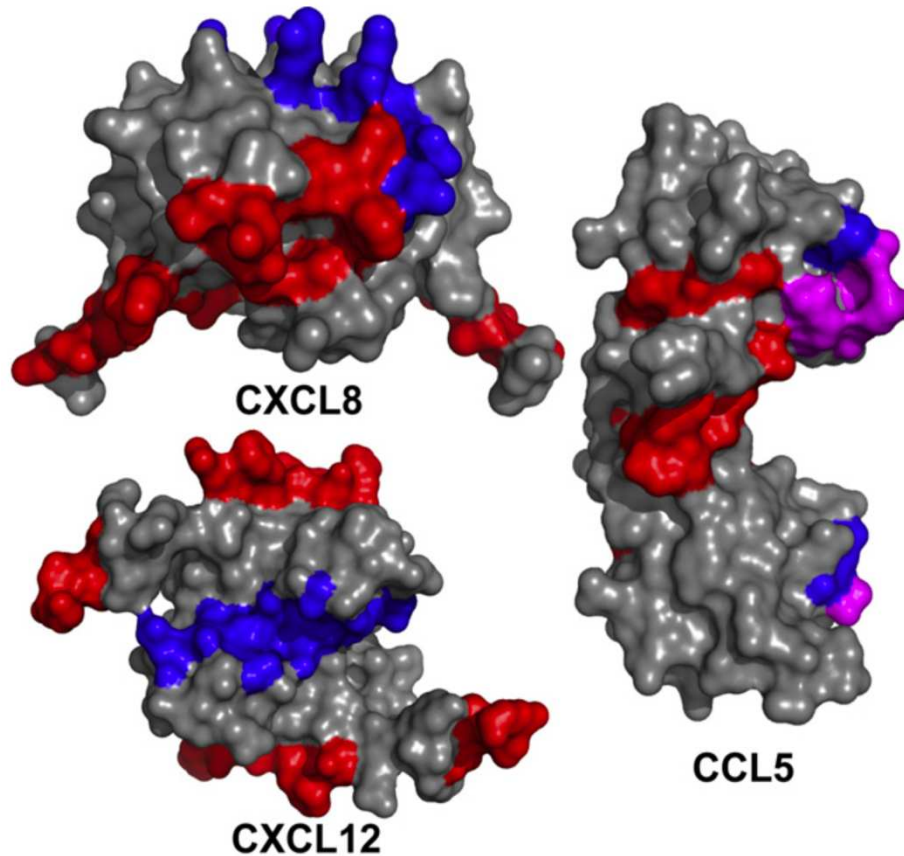


Figure 12 Domaines d'interaction chimiokines et GAGs
Représentation de CXCL8 (PDB : 1IL8), CCL5(PDB : 1B3A) et CXCL12 (PDB : 1A15) sous forme dimérique. Les domaines d'interaction avec les récepteurs sont en rouge, les sites d'interaction avec les GAGs sont en bleu. Pour CCL5, les domaines en violet représentent les recouvrements entre le domaine de liaison aux GAGs et celui aux récepteurs. PBD : Protein DataBase D'après *Laguri et al., Carbohydr. Res. 2008.*

(4) Récepteurs de chimiokines et signalisation cellulaire

La complexité de l'étude des interactions entre les CK et les récepteurs de chimiokine (RCK) réside dans le fait que les couples récepteur-ligand ne sont pas exclusifs. En effet, une même CK peut activer plusieurs RCK, et un RCK peut être activé par plusieurs CK différentes¹⁵⁸. Les différentes interactions entre les CK et RCK sont représentées en Figure 13. De plus, les profils d'expression de ces protéines peuvent être extrêmement variables. Certaines sont exprimées constitutivement et permettent une régulation basale du trafic cellulaire alors que d'autres ne sont exprimées que localement et dans un contexte particulier (inflammation, hypoxie, *etc.*). Certaines CK peuvent également avoir les deux propriétés.

Les RCK appartiennent à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires ou récepteurs couplés à une protéine G (RCPG). Leur classification est semblable aux CK, en fonction de leur structure¹⁵⁹. On a donc des récepteurs de type CC, CXC, CX3C ou XC, se liant à des CK du même groupe : un récepteur CCR aura pour ligand une CK CCL, un récepteur CXCR se liera à une CXCL.

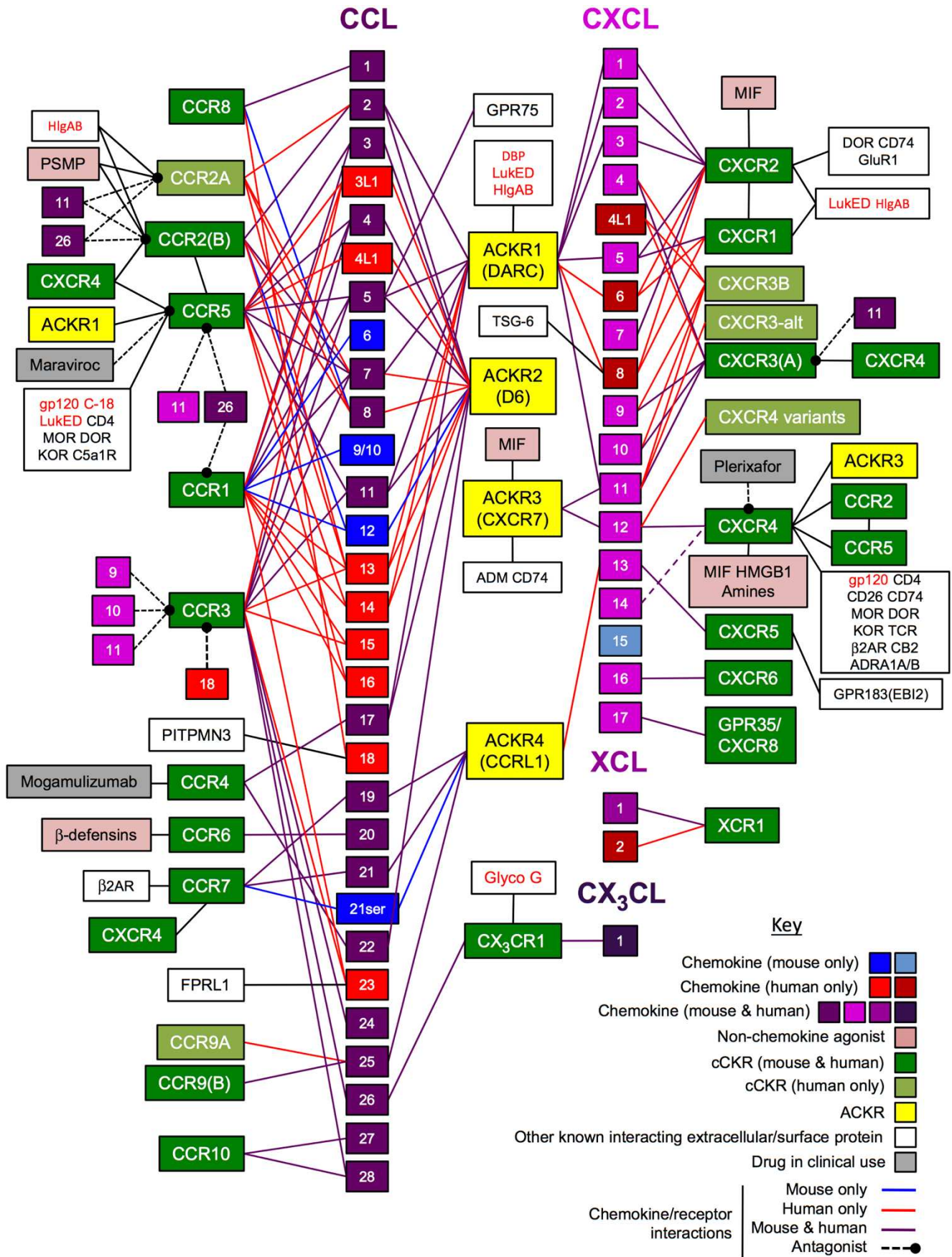


Figure 13 Interactions Chimiokines et Récepteurs de Chimiokines.

Certaines protéines ne sont présentes que chez l'Homme (rouge) ou la souris (bleu) ; un ligand peut interagir avec plusieurs récepteurs et inversement. Il peut également y avoir des interactions avec d'autres protéines (blanc), ou des composés utilisés à des fins thérapeutiques (gris). D'après *Hughes & Nibbs, FEBS J., 2018.*

La majorité des RCK emprunte des voies de signalisation classiques des RCPG. La liaison de la CK au RCK induit des changements de conformation au niveau des domaines transmembranaires du récepteur. Ces changements vont induire l'activation des protéines G hétérotrimériques. Ces dernières sont une classe de protéines intracellulaires participant au mécanisme de transduction du signal. Elles sont nommées protéines G car elles lient le GTP et GDP. Chez l'Homme il existe 35 gènes codants pour différents types de sous-unités de protéines G, regroupés en 3 classes, α (16 gènes), β (5 gènes) et γ (14 gènes). Les sous-unités β et γ peuvent s'hétéro-dimériser et également interagir avec différentes sous-unités α , formant ainsi une protéine G hétérotrimérique.

Lors de l'activation du récepteur, la molécule de GDP est échangée pour une molécule de GTP dans la sous-unité $G\alpha$, car le récepteur activé agit comme un facteur d'échange de la guanosine. Cela induit un changement de conformation dans la protéine G, permettant l'activation d'autres effecteurs tels que des enzymes cytosoliques ou membranaires. L'activité GTPase intrinsèque de la sous-unité $G\alpha$ mène ensuite à l'hydrolyse du GTP en GDP, terminant le cycle d'activation qui pourra alors recommencer. Selon le modèle classique, l'activation entraînerait la dissociation de la protéine G en sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$. Or, d'autres études suggèrent que les protéines G hétérotrimériques ainsi que des effecteurs sont déjà précouplés avec le récepteur, formant ainsi un complexe de signalisation¹⁶⁰⁻¹⁶³. Ainsi, lors de la liaison du ligand au récepteur, ce complexe subirait des changements de conformation plutôt qu'un cycle d'association/dissociation tel que suggéré par le modèle classique. Cela conduit à l'activation de différentes cascades de signalisation, dites de « second messagers » comme par exemple les adénylyl cyclases, les phospholipases ou les canaux calciques et potassiques¹⁶⁴. Après hydrolyse du GTP en GDP avec l'aide de protéines régulatrices de la signalisation des protéines G (RGS), le système peut retourner à son état basal^{164,165}.

L'activation de ce complexe entraîne la phosphorylation du RCK par des kinases de récepteur couplé à la protéine G (GRKs), augmentant fortement son affinité avec la β -arrestine¹⁶⁶. Cette dernière fait partie d'une classe de protéine, les arrestines. Celles-ci sont des protéines ubiquitaires identifiées comme permettant de réguler l'activité de certains récepteurs couplés à la protéine G¹⁶⁷. La β -arrestine a été identifiée en 1990 comme régulateur de l'activité des RCPGs dans le système β -adrénergique¹⁶⁸.

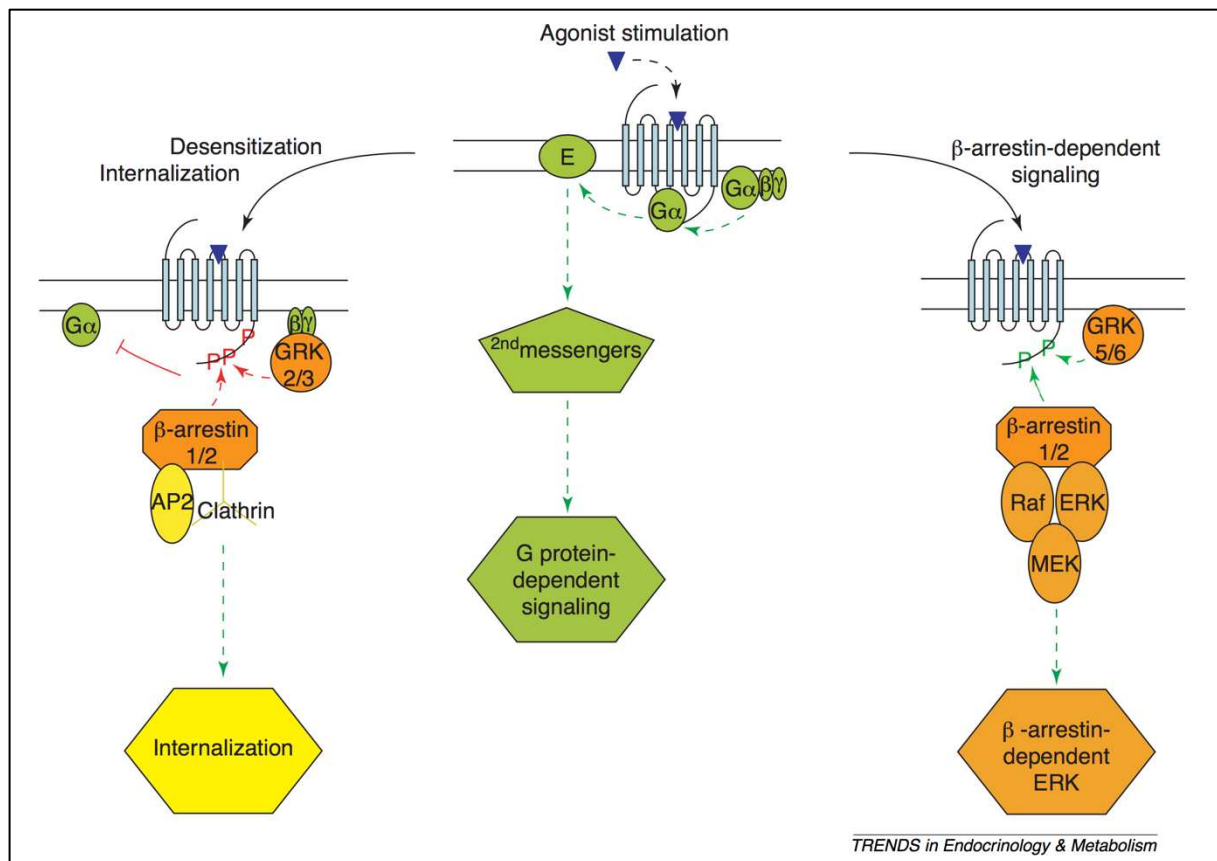


Figure 14 Interaction Récepteur – Protéine G – β -arrestine

Après activation du récepteur, le recrutement des sous-unités de protéine G entraîne l'activation d'une voie de second messenger puis la dissociation de la sous unité $G\alpha$. Les GRK2/3 sont recrutées par interaction avec les sous-unités $G\beta\gamma$ et conduisent à la phosphorylation du récepteur, recrutement de la β -arrestine puis à l'internalisation du récepteur tout en empêchant la signalisation second messenger en inhibant l'activité $G\alpha$. Cela conduit ainsi à la désensibilisation du récepteur et à son internalisation. Autrement, le récepteur peut également être phosphorylé par les GRK5/6, constitutivement présentes à la membrane plasmique, et entraîner une activation de la voie ERK dépendante de la β -arrestine. Il est à noter que les GRK5/6 peuvent également aboutir à une internalisation du récepteur. Flèches pointillées vertes : activation ; flèches pointillées rouges et lignes rouges : inhibition. D'après Reiter & Lefkowitz, *Trends. Endocrinol. Metab.*, 2006.

Le recrutement de la β -arrestine au niveau du récepteur phosphorylé va dans un premier temps empêcher l'interaction avec la protéine G par encombrement stérique, entraînant une inhibition de la voie associée aux seconds messagers¹⁶⁹ : on parle de désensibilisation du récepteur. La β -arrestine sert d'intermédiaire et permet l'adaptation entre le récepteur et les éléments nécessaire à l'internalisation, telles que la clathrine ou la protéine AP-2^{170,171}. Lors de l'internalisation, le ligand est dégradé ; deux voies sont possibles pour la suite : une voie « rapide » et une voie « lente ». Dans certains cas, la β -arrestine se dissocie rapidement et le récepteur est dégradé ou recyclé à la membrane¹⁷² (Figure 14). Elle peut également former un complexe β -arrestine-récepteur beaucoup plus stable ; ce dernier sera dégradé ou recyclé à la membrane beaucoup plus lentement, permettant dans l'intervalle l'activation des signalisations intracellulaires, telles que les voies des MAP kinases¹⁷³⁻¹⁷⁵ (Figure 15). En effet, en plus des voies canoniques impliquant les protéines G, les RCKs peuvent également activer les voies de signalisation

indépendamment des protéines G et notamment les voies β -arrestine-dépendantes. Dans ce contexte, les arrestines sont des protéines d'échafaudage et activent des effecteurs intracellulaires comme les MAPK, la PI3K ou encore la protéine kinase B^{176,177}.

D'autres récepteurs ont été classés dans la famille des récepteur atypique de chimiokines (Atypical ChemoKine Receptors, ACKR) en raison de l'absence d'activation des protéines G hétérotrimériques et leur capacité à lier de nombreux ligands conduisant à leur internalisation et à leur dégradation¹²². Des analyses moléculaires avancées montrent notamment que les ACKR ne possèdent pas le domaine E/DRYLAIV mais une version différente. Bien que l'on

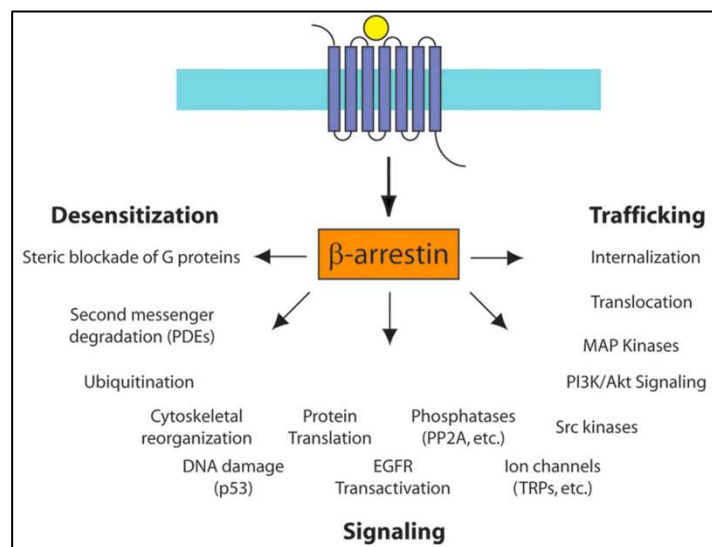


Figure 15 La signalisation dépendante de la β -arrestine

La signalisation des beta arrestine est associée à la désensibilisation des GPCR par blocage stérique des protéines G et à leur internalisation ; elle est également associée à un certain nombre de voies de signalisation telles que la dégradation des seconds messagers, l'activation de canaux ioniques ou encore l'activation des voies kinases-dépendantes. D'après *Smith & Rajagopal, J. Biol. Chem., 2016*.

puisse penser que l'altération de ce domaine soit la raison de l'absence de signalisation par les protéines G, ce n'est pas le cas¹⁷⁸. En effet, certains récepteurs comme CXCR6 possèdent également un domaine altéré mais conservent une signalisation protéine G-dépendante classique^{179,180}. Cette catégorie de récepteurs est également appelée récepteurs « decoy / leurres » ou « scavenger / éboueurs ». Il y a actuellement 4 membres dans la famille des ACKR, respectivement connus ACKR1 à 4 : Duffy, D6, CXCR7 et CCX-CKR. Le rôle de ces récepteurs atypiques est de maintenir le gradient de CK *via* l'internalisation par la β -arrestine puis le recyclage à la membrane, permettant l'élimination de l'excédent de CK extracellulaire ainsi que la formation locale de gradients¹⁸¹. Plus récemment, il a été montré que ces récepteurs étaient également capable d'activer des voies de signalisation dépendantes des β -arrestine¹⁸².

B. La principale fonction des chimiokines : la chemoattraction ou chimiotaxie

La principale caractéristique des CK est leur capacité à contrôler le maintien mais également la migration, la circulation et le recrutement des cellules immunitaires au cours du développement, de l'homéostasie ou dans des conditions inflammatoires. Elles dirigent aussi bien la mobilisation des différents types de cellules immunitaires que les interactions entre ces différentes cellules. Bien que n'importe quel tissu, sain ou endommagé, comporte des cellules immunitaires résidentes, une grande partie des acteurs de l'inflammation ainsi que certains types de progéniteurs sont originaires d'autres organes. Notamment, la moelle osseuse contient certaines niches de cellules souches hématopoïétiques ainsi que des progéniteurs hématopoïétiques CCR2⁺, activés après l'IM¹⁸³. La rate et la moelle osseuse sont toutes deux d'importants réservoirs de monocytes¹⁸⁴. Enfin, la rate est également une source importante de lymphocytes tout comme le tissu adipeux qui représente un réservoir conséquent de lymphocytes B^{60,185}.

La moelle osseuse constitue néanmoins la composante majoritaire dans la réponse inflammatoire, source principale de cellule souches hématopoïétiques (CSHs) et de cellules progénitrices endothéliales (CPEs), localisées dans des niches périvasculaires ainsi que dans les niches ostéoblastiques de l'endoste (tissu vascularisé sur la face interne des os longs, délimitant la cavité médullaire)¹⁸⁶. Le recrutement de ces cellules depuis leur niche d'origine jusqu'au site de l'ischémie passe par trois grandes étapes : la mobilisation du réservoir vers le sang, l'adressage vers le site de l'inflammation puis le recrutement du sang vers le tissu lésé. Les CK participent à chacune de ces étapes.

- Maintien / Mobilisation depuis le réservoir

Il a été montré que les CK jouaient un rôle majeur dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques (CSHs) aux niveaux des niches de la moelle osseuse, notamment *via* la retenue des cellules CXCR4⁺ par interaction avec CXCL12 présent à la surface de ces niches^{187,188}. Dans des conditions pathologiques, une expression augmentée de VEGF entraîne une activation de la MMP9 des niches, clivant CXCL12 et libérant ainsi les cellules retenues^{189,190} (Figure 16).

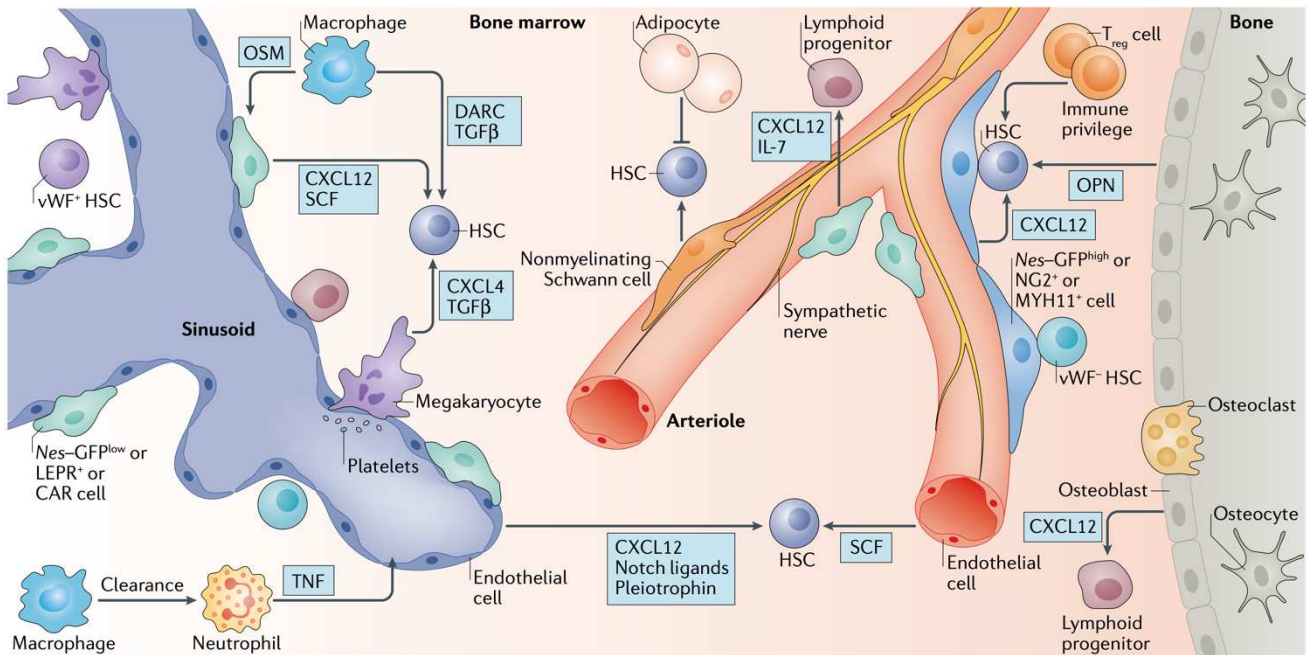


Figure 16 La niche hématopoïétique de la moelle osseuse chez l'adulte

Représentation schématique de la niche des cellules souches hématopoïétiques (CSH) de la moelle osseuse adulte en homéostasie, montrant les différents types de cellules et les facteurs qui régulent directement ou indirectement l'activité des CSHs à l'aide d'un modèle rapporteur Nestin-GFP. Des preuves mettent en évidence la vascularisation et les cellules stromales associées, telles que les cellules péri-artériolaires Nestin (Nes)-GFP^{high}, les cellules positives à l'antigène neural-glia 2 (NG2), les cellules positives à la chaîne lourde de myosine 11 (MYH11), les cellules péri-sinusoidales Nes-GFP^{low}, les cellules réticulaires abondantes en CXCL12 (CAR) et les cellules positives au récepteur de la leptine (LEPR), comme des régulateurs clés de la maintenance des CSH. Les nerfs du système nerveux sympathique (SNS) régulent la mobilisation des CSHs, et les cellules de Schwann non myélinisées peuvent contribuer à la quiescence des CSHs. Les ostéoblastes ont été impliqués dans la régulation des CSH, mais les signaux moléculaires précis n'ont pas été clairement élucidés ; cependant, ils pourraient jouer un rôle dans la régulation des progéniteurs lymphoïdes. Les adipocytes peuvent avoir un effet négatif sur le maintien des CSH. Les cellules hématopoïétiques, telles que les macrophages, les neutrophiles, les cellules T régulatrices (Treg) et les mégacaryocytes, sont des exemples de progénitures dérivées des CSH qui peuvent réagir et contribuer au maintien ou à la mobilisation des CSH. La localisation régionale des sous-ensembles de CSH a montré que les CSH de type von Willebrand (Vwf)-GFP⁺ et Vwf-GFP⁻ à base de plaquettes ou de cellules myéloïdes peuvent être localisées et régulées par des niches distinctes de la moelle osseuse contenant des mégacaryocytes et des artérioles, respectivement. DARC, Duffy antigen receptor for chemokines; IL-7, interleukine-7; OPN, ostéopontine ; OSM, oncostatine M ; SCF, stem cell factor ; TGFβ, transforming growth factor-β ; TNF, tumour necrosis factor. D'après Pinho & Frenette, *Nat. Rev. Mol. Cel. Biol.*, 2019.

- Contrôle de la migration des cellules circulantes.

Une fois les cellules mobilisées depuis leur réservoir vers la circulation, ces dernières sont amenées à suivre les gradients des CK auxquelles elles sont sensibles pour se diriger vers le site ischémique (Figure 17). Ces gradients se forment en général *via* les interactions CK-GAGs présents dans le milieu extracellulaire. Différents types ou sous-types cellulaires seront alors sensibles au gradient de différentes CK et cela peut également varier en fonction de l'état d'homéostasie ou d'inflammation du tissu¹⁹¹, illustré en Figure 18.

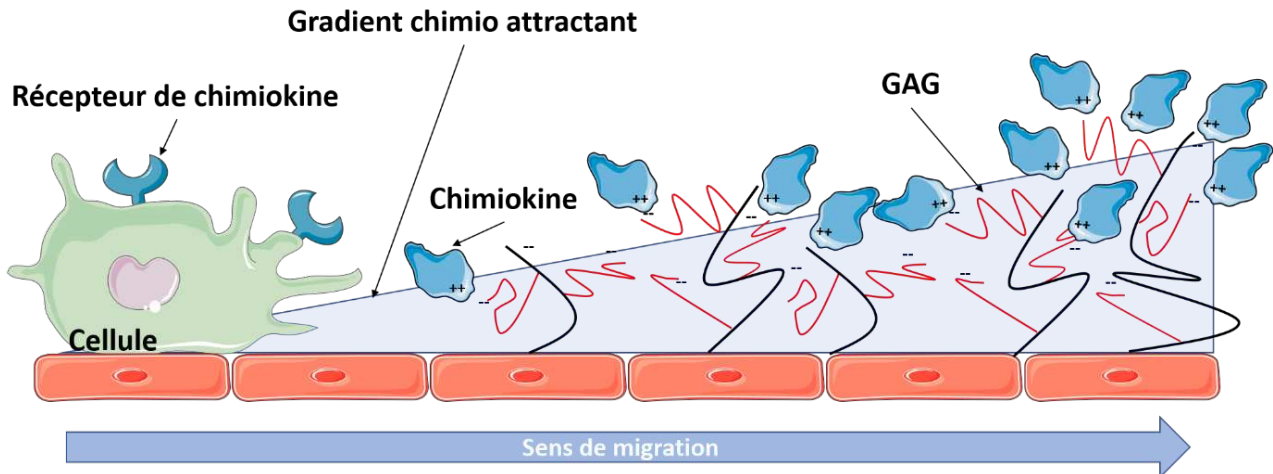


Figure 17 Le mode d'action des chimiokines : la chimioattraction

Les cellules migrent en direction du gradient de chimiokine en réponse aux interactions chimiokine / récepteur. La formation du gradient est rendue possible par la liaison des chimiokines aux GAGs présents dans la matrice extracellulaire.

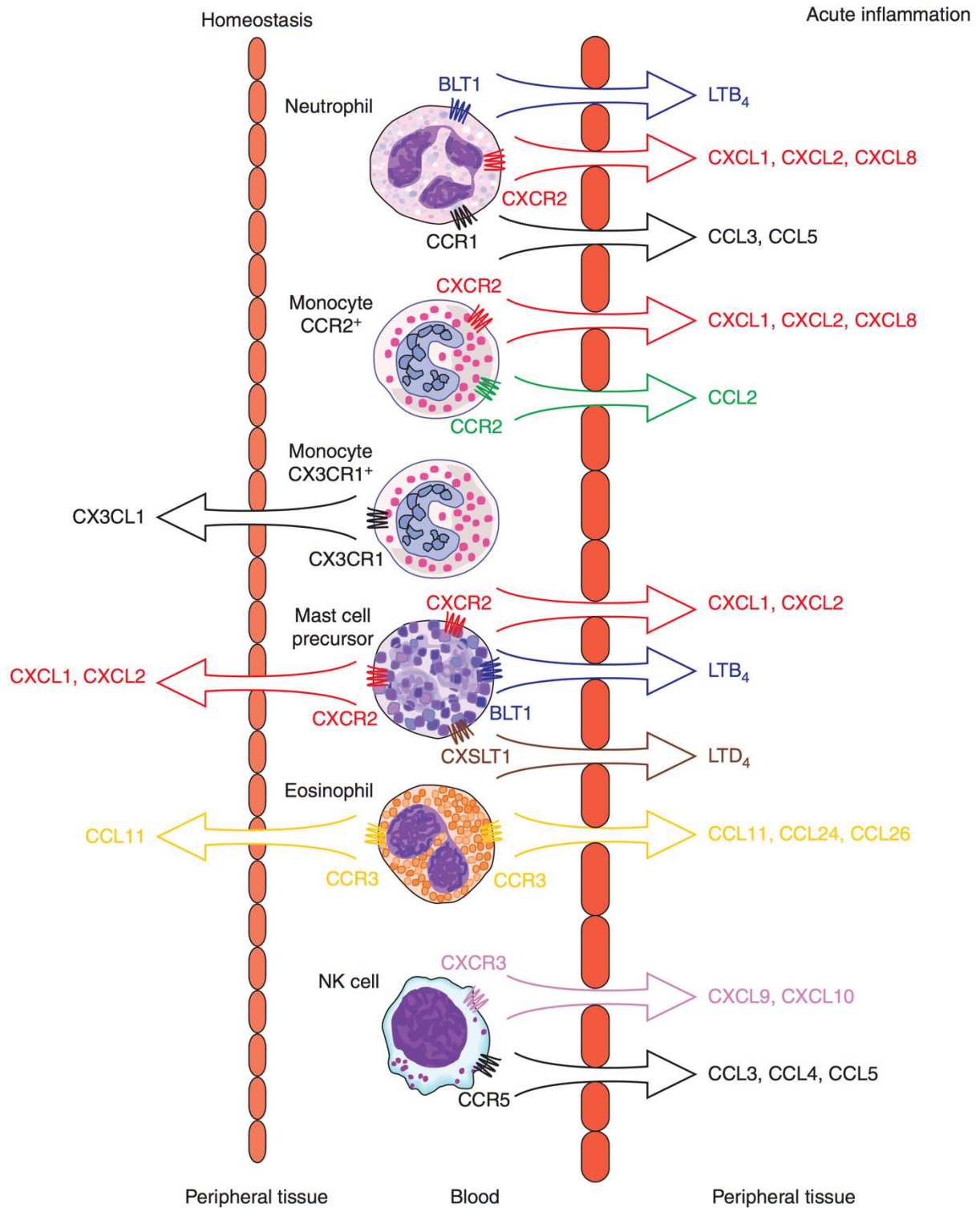


Figure 18 Chimiokines et chimiotaxie des cellules immunitaires

Dans des conditions d'homéostasie, les monocytes CX3CR1⁺ suivent le gradient de CX3CL1 ; les précurseurs de mastocytes le gradient de CXCL1 et CXCL2 et enfin les éosinophiles suivent le gradient de CCL11. En conditions inflammatoires, les cellules NK vont migrer selon les gradients de CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL4 ou CCL5 ; les éosinophiles vont rejoindre le site de l'inflammation en suivant CCL11, CCL24 et CCL26 ; les monocytes CCR2⁺ suivent les gradients de CCL2, CXCL1, CXCL2, CXCL8 ou CCL2 ; les neutrophiles migrent selon l'expression de CCL3, CCL5, CXCL1, CXCL2, CXCL8 ou la leukotriène B4 (LTB₄). D'après Sokol & Luster, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2015.

- Mécanisme de recrutement.

Attirées sur le site de l'ischémie par le gradient de CK, les cellules vont ensuite être recrutées au sein du tissu lésé selon le processus de diapédèse consistant en trois principales étapes : le roulement des cellules sur l'endothélium, leur arrêt puis la transmigration¹⁹² (Figure 19). Les sélectines sont des glycoprotéines exprimées par les cellules endothéliales dont l'expression augmente dans des conditions pathologiques. Elles se lient par interactions faibles au PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) présent à la surface des cellules circulantes, ralentissant ainsi leur progression dans la circulation et conduisant à leur roulement sur l'endothélium^{193,194}. L'arrêt du roulement se fait par les interactions entre les CK liées aux GAGs extracellulaires et les récepteurs membranaires, entraînant l'expression des intégrines, protéines se liant aux récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales (ICAM-1, VCAM-1)^{195,196}. Le caractère fort et stable de ces interactions permet l'adhésion des cellules circulantes sur l'endothélium. Ces dernières franchissent finalement l'endothélium soit en traversant une cellule endothéliale (transmigration transcellulaire) soit en traversant entre deux cellules (transmigration paracellulaire). Cette transmigration est en générale facilitée par l'expression de NO, puissant vasodilatateur augmentant la perméabilité de l'endothélium, induite par l'adhésion des cellules circulantes¹⁹⁷.

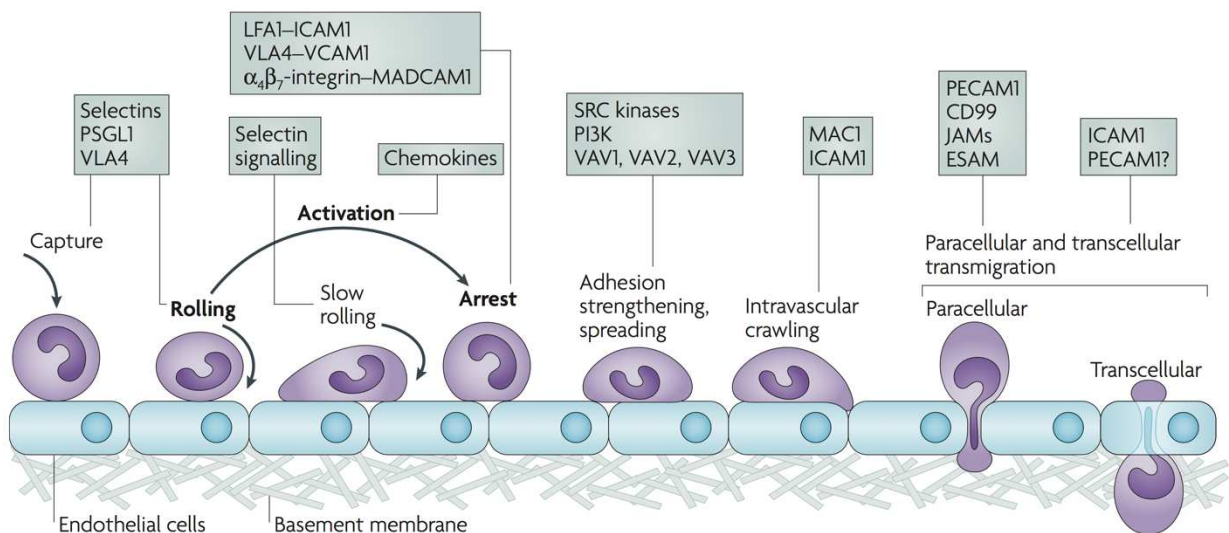


Figure 19 Mécanisme de recrutement des cellules circulantes

Le recrutement des cellules circulantes se fait selon 3 principales grandes étapes : la capture et roulement sur l'endothélium *via* les interactions selectines-PSGL1 dans un premier temps ; l'activation des cellules par les chimiokines et leur récepteurs, l'arrêt du roulement par les intégrines et l'adhésion *via* ICAM-1 et VCAM-1 dans un second temps ; enfin la cellule infiltre le tissu par transmigration para- ou transcellulaire. ESAM, endothelial cell-selective adhesion molecule; ICAM1, intercellular adhesion molecule 1; JAM, junctional adhesion molecule; LFA1, lymphocyte function-associated antigen 1 (also known as α L β 2 -integrin); MAC1, macrophage antigen 1; MADCAM1, mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1; PSGL1, P-selectin glycoprotein ligand 1; PECAM1, platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; VCAM1, vascular cell-adhesion molecule 1; VLA4, very late antigen 4 (also known as α 4 β 1 -integrin) D'après *Ley et al., Nat. Rev. Immunol., 2007*.

Partie III : Les chimiokines et leurs récepteurs dans l'infarctus du myocarde

A. Régulation de l'expression des chimiokines après l'IM

L'expression d'un grand nombre de CK et de leurs récepteurs est augmentée dès le début de la phase inflammatoire de l'IM, au sein de nombreux types cellulaires tels que les macrophages, lymphocytes, cellules endothéliales, fibroblastes ou encore les cardiomyocytes en hypoxie^{60,198,199}. Rapidement, les cellules nécrotiques vont libérer des DAMPs à l'origine de l'activation des PRRs et de l'augmentation de l'expression de nombreuses CK²⁰⁰ (Figure 20). Par exemple, les cardiomyocytes apoptotiques ou nécrotiques représentent la principale source de HMGB1 (High Mobility Group Box-1). La sécrétion de HMGB1 est associée à la production de CK dans les fibroblastes et les cellules endothéliales *via* l'activation du récepteur RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts)^{201,202}. Les cardiomyocytes en nécrose sécrètent également de l'IL-1 α , entraînant l'expression de certaines CK dans les macrophages *via* une signalisation dépendante de MyD88²⁰³. D'autre part, il y a libération d'ARN extracellulaire et de microARNs par les cardiomyocytes en nécrose²⁰⁴ ainsi que de la protéine HSP (heat-shock protein) pouvant être associée à l'augmentation de l'expression des CK dans le cœur infarci⁵¹.

Dans le myocarde, les TLRs (Toll-Like Receptors) représentent la principale famille des PRRs. Dans des modèles expérimentaux d'IM et chez des patients après IM, il a été montré l'expression et l'activation des TLR2, TLR3, TLR4 et TLR7²⁰⁵⁻²⁰⁸. Les TLRs à la surface des cellules (leucocytes, fibroblastes, cellules endothéliales) reconnaissent les DAMPs, ce qui conduit à une activation des voies NF- κ B et des MAPK avec une éventuelle activation intermédiaire de MyD88/Irak-1²⁰⁹, aboutissant à la translocation nucléaire de NF- κ B et à l'augmentation de l'expression des CK^{210,211}. D'autre part, le système du complément contribue aussi à l'expression des CK après l'IM. La libération du contenu cellulaire des cardiomyocytes en nécrose est associée à l'activation des composants précoces de la cascade du complément (C1, C2, C3 et C4). Il a été montré *in vivo* et *in vitro* que le complément pouvait entraîner l'expression de CK, *via* C3a et C5a^{212,213}. Enfin, l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou de l'IL-1 β induit celle de certaines CK après un IM^{214,215}.

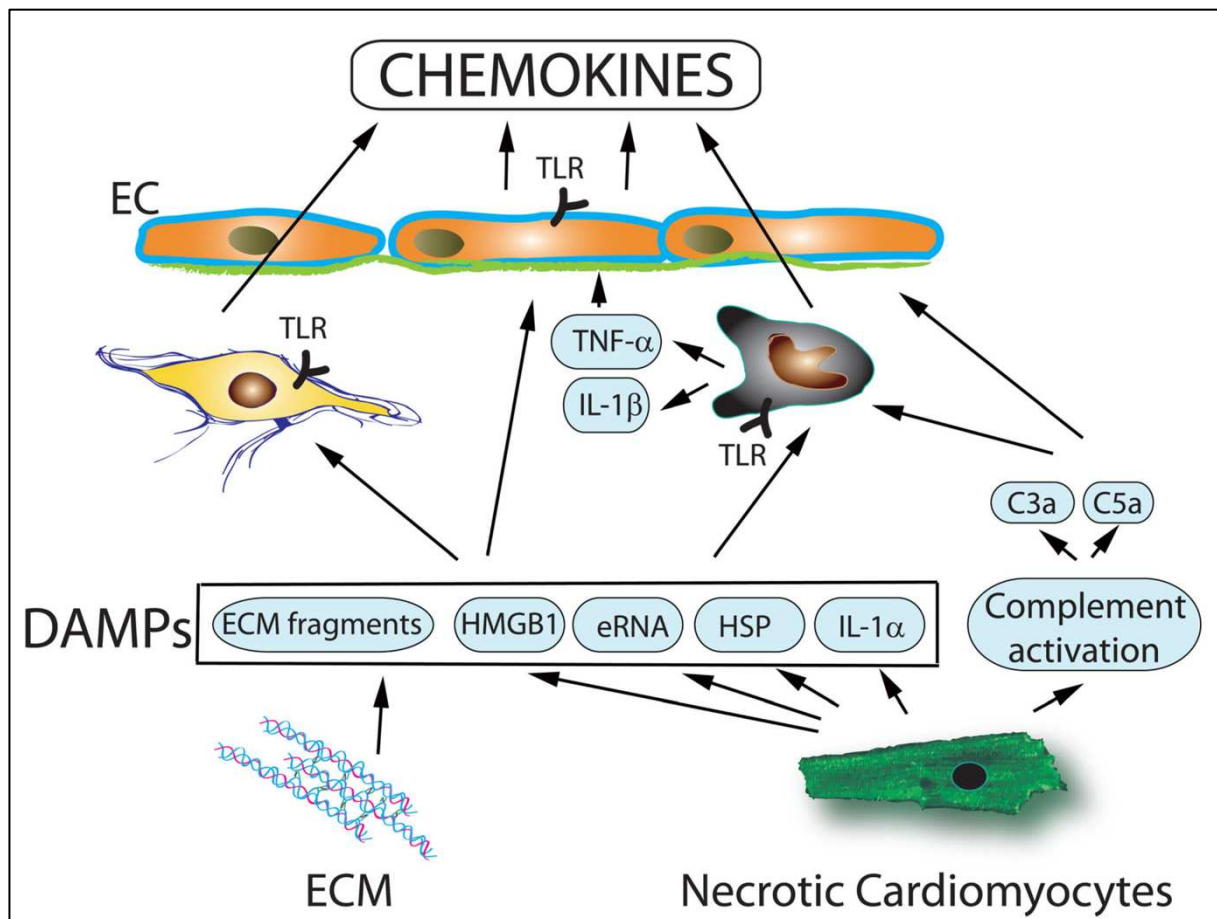


Figure 20 Régulation de l'expression des chimiokines après IM

Après IM, les cardiomyocytes en nécrose libèrent des DAMPs tels que HMGB1, HSP, des ARN extracellulaires ou encore de l'IL-1 α . Ces derniers vont activer des mécanismes de l'immunité innée, conduisant à l'expression de chimiokines par les macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales (EC). De plus, l'activation de la cascade du complément, la libération de fragments de matrice extracellulaire ou l'expression locale de cytokines (telles que l'IL-1 β ou le TNF- α) entraînent également une synthèse de chimiokines. TLR : Toll-like Receptor. ECM: matrice extracellulaire; EC: cellules endothéliales D'après *Chen & Frangogiannis, J. of Cardiovasc. Trans. Res., 2020*.

B. Chimiokines et inflammation post-IM

Les CK agissent essentiellement *via* le recrutement des leucocytes par la formation de gradients, chaque CK étant associée au recrutement de certains types de cellules. Ainsi, les CK comme CXCL1, CXCL2 et CXCL8, associées à leurs récepteurs CXCR1 et CXCR2 sont connues pour mobiliser les neutrophiles et induire un effet pro-angiogénique. C'est le cas de CXCL8 (également connu comme l'IL-8 ; absent chez la souris), dont l'expression est modulée par la voie du complément C6 et est nécessaire au recrutement de neutrophiles dans le myocarde ischémié chez le lapin²¹⁶. Son expression chez les patients est associée à un IM plus important²¹⁷. Le rôle de CXCR2 est plutôt ambivalent. En effet, si son absence est principalement corrélée à une forte diminution du recrutement de leucocytes inflammatoires chez la souris, elle est également associée à la perte d'un effet cardioprotecteur²¹⁸.

D'autres CK telles que CXCL9, CXCL10 et CXCL11 ne sont pas capables de moduler la migration des neutrophiles et granulocytes, mais peuvent mobiliser les lymphocytes. En particulier, CXCL10 et son récepteur CXCR3, dont les expressions sont accrues dans des modèles murins et canins d'IM²¹⁹, permettent le recrutement de lymphocytes T et des cellules NK²²⁰. CXCL12 est également impliquée dans le recrutement et la mobilisation des cellules dans l'IM. Étant donné que les travaux de thèse portent sur cet axe, ce dernier sera développé plus en détails dans la partie IV.

En ce qui concerne les CK CC, de nombreux membres sont exprimés après l'IM, dans le myocarde et dans la circulation. CCL3, CCL4, CCL5, CCL7 ou encore CCL21, sont impliquées dans le recrutement de différents sous-types de monocytes pro-inflammatoires dans la zone infarctée²²¹. En particulier, CCL2 et son récepteur CCR2 font partie des membres les plus étudiés de la famille des CK dans les pathologies ischémiques. Le cœur sain comporte des macrophages résidents CCR2⁻ d'origine embryonnaire et CCR2⁺ d'origine hématopoïétique. Lors de l'IM, ces derniers sont activés par les DAMPs, sécrètent des CK et sont impliqués dans le recrutement des leucocytes. Les modèles murins invalidés pour CCR2 présentent une réponse inflammatoire réduite, ainsi qu'une élimination ralentie des débris cellulaires suggérant une phagocytose diminuée, ainsi que des perturbations des processus de réparation tissulaire⁵⁸. De nombreuses études sur l'effet des CK CC dans l'IM indiquent un rôle délétère de ces CK, en raison de leur effet pro-inflammatoire. Ainsi, la neutralisation de CCL5 atténue les effets délétères de l'IM notamment en limitant l'infiltration de monocytes et macrophages²²² ; l'invalidation de CCR9, récepteur unique de CCL25²²³ ; ou celle de CCR1, récepteur de CCL3, CCL5, CCL7 et CCL23²²⁴ ainsi que l'inhibition de CCL21²²⁵, sont tous associés à une réduction de l'infiltration de cellules inflammatoires, une fonction cardiaque préservée et un remodelage cardiaque adéquat après un IM. Cependant, les CK contribuent également à la résolution de l'inflammation ; c'est notamment le cas de CCR5 dont l'absence empêche le recrutement de lymphocytes T régulateurs et des monocytes anti-inflammatoires, entraînant ainsi une inflammation non contrôlée et délétère⁸⁰.

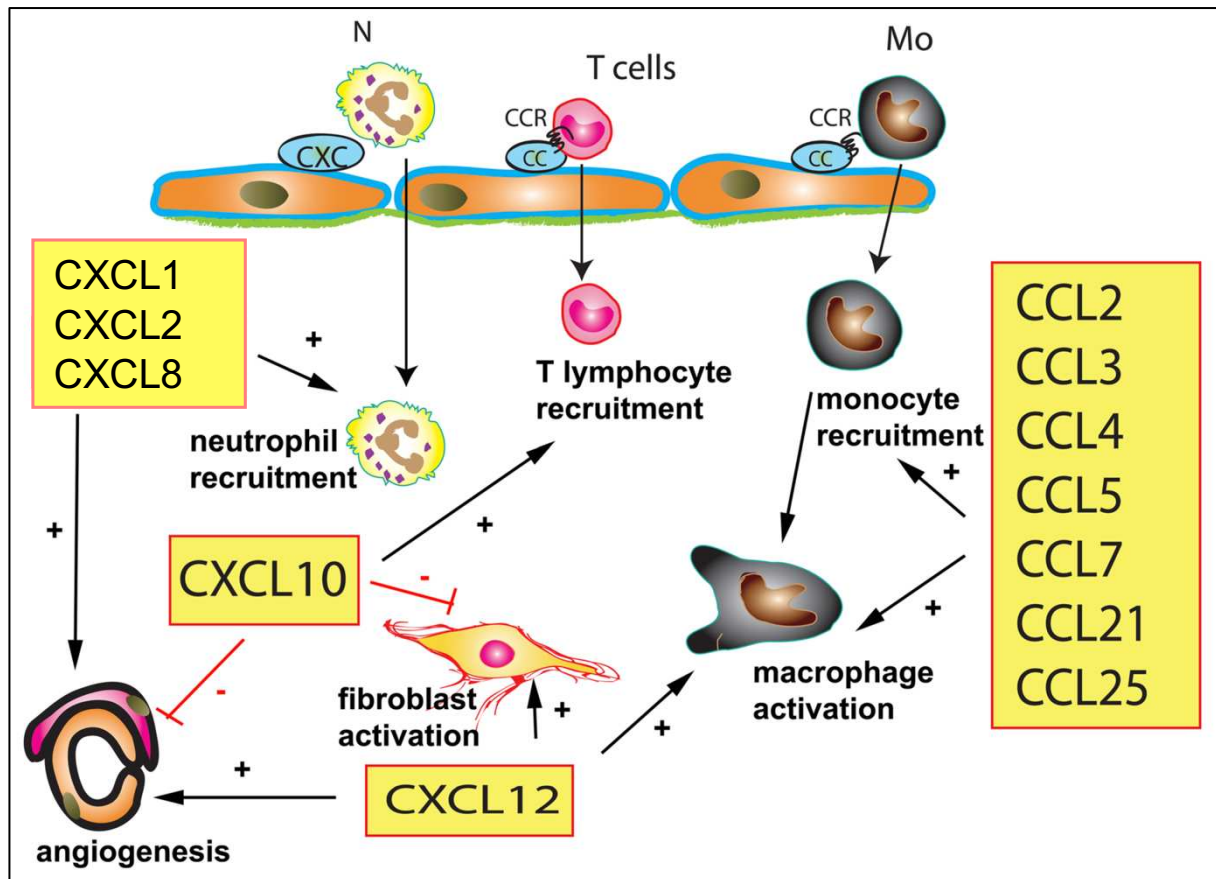


Figure 21 Rôle des chimiokines dans l'infarctus du myocarde

L'induction des chimiokines dans le myocarde infarcté joue un rôle critique dans le recrutement des cellules inflammatoires mais module également le phénotype de cellules non-immunitaires. Les chimiokines CC et CXC pro-inflammatoires se lient aux GAGs à la surface de l'endothélium générant des gradients recrutant les cellules qui expriment les récepteurs associés. Les chimiokines CXCL1, CXCL2 ou CXCL8 modulent le recrutement des neutrophiles, mais présentent également des effets pro-angiogéniques. CXCL10 agit comme acteur anti-fibrotique et anti-angiogénique. CXCL12 présente un grand nombre d'effets sur l'angiogenèse, les cardiomyocytes mais aussi sur l'activation des fibroblastes et des macrophages. Enfin, les chimiokines CC sont essentiellement impliquées dans le recrutement des monocytes et la modulation du phénotype des macrophages. N : neutrophile, Mo : monocyte, T cell : lymphocyte T. Adaptée de *Chen & Frangogiannis, J. of Cardiovasc. Trans. Res., 2020.*

C. Actions sur les autres types cellulaires

Le rôle des CK dans le remodelage du cœur après IM ne se limite pas à la mobilisation et au recrutement des cellules inflammatoires. En effet, les CK exercent un certain nombre d'effets sur les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cardiomyocytes soit directement, soit *via* les leucocytes recrutés (Figure 21).

Ainsi, CCR2 peut contribuer à l'aggravation de la fibrose interstitielle dans le cœur et d'autres organes en conditions pathologiques et ce de différentes manières. Celui-ci peut agir indirectement *via* le recrutement de macrophages sécrétant des facteurs fibrogéniques tels que le TGF β ou le FGF (fibroblast growth factor)²²⁶ ou de manière plus directe *via* le recrutement de progéniteurs de fibroblastes^{227,228}, la stimulation de la prolifération et la différenciation des myofibroblastes²²⁹, ou la sécrétion accrue de collagène²³⁰. CXCL1 pourrait également participer

au développement de la fibrose *via* le recrutement de sous-populations de monocytes fibrogéniques CXCR2⁺ dans un contexte d'hypertension²³¹.

De même, l'effet anti-fibrotique de certaines CK pourrait être lié au recrutement de certaines populations de leucocytes ou à une action directe sur les fibroblastes cardiaques. CXCL10 montre une action anti-fibrotique en inhibant la migration des fibroblastes de manière indépendante de CXCR3, par interaction avec les GAGs^{71,232}. CXCL10 joue également un rôle dans la modulation de la revascularisation, en exerçant un effet anti-fibrotique à des temps précoces afin de permettre l'élimination des débris cellulaires avant l'angiogenèse²³³.

De nombreuses CK et plus particulièrement CXCL8, présentent un fort potentiel pro-angiogénique en ayant simultanément un effet anti-apoptotique en inhibant la voie Capase3 tout en promouvant la prolifération des cellules^{234,235}.

Enfin, la fractalkine ou CX3CL1 présenterait un caractère délétère dans l'IM. En effet, l'augmentation de son expression après IM est associée avec un mauvais pronostic et sa neutralisation induit des effets bénéfiques en limitant l'hypertrophie ventriculaire et en ralentissant la progression de l'insuffisance cardiaque^{236,237}. Ces effets sont notamment médiés par le recrutement de lymphocytes T induit par CX3CL2 mais également par la stimulation de la prolifération des fibroblastes cardiaques et l'augmentation de l'apoptose des cardiomyocytes.

D. Les chimiokines comme pistes thérapeutiques dans l'IM ?

Étant donné le rôle central des CK dans l'inflammation et le remodelage post-ischémique, de nombreuses études visant à apporter de manière exogène certaines CK, à stimuler ou à neutraliser leur expression ont été réalisées²⁰⁰. Cependant, cela a abouti à un nombre relativement réduit d'applications dans le domaine thérapeutique notamment en raison de la difficulté à cibler une CK en particulier, à déterminer le dosage et la chronologie adaptée, et enfin en raison de la multiplicité des actions des CK.

Néanmoins, quelques applications ont été approuvées pour des indications liées notamment à certains cancers. Ainsi, on peut citer le Maraviroc (Celsentri®) qui est un antagoniste de CCR5 utilisé en traitement contre le VIH²³⁸ ; le Plerixafor (Mozobil®), antagoniste de CXCR4 est utilisé pour mobiliser les progéniteurs hématopoïétiques dans le contexte de transplantations autologues dans le traitement du lymphome non-Hodgkinien ou myélome²³⁹ ; ou encore le Mogamulizumab (Poteligeo®), un anticorps anti-CCR4 utilisé en traitement contre les lymphomes et leucémies associées aux lymphocytes T²⁴⁰.

Il n'y a pour l'heure aucune utilisation approuvée d'un blocage ou d'une activation des CK ou de leurs récepteurs dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Cependant, certaines approches thérapeutiques sont à l'étude comme le blocage de CCR5 qui entraîne une réduction du recrutement des lymphocytes T, monocytes et neutrophiles au cours de l'athérosclérose ou encore pendant l'ischémie-reperfusion chez la souris²⁴¹⁻²⁴³. La protéine d'origine virale M3 (qui limite la réponse immunitaire de l'hôte infecté²⁴⁴) permet de limiter la progression de l'athérosclérose en inhibant l'activité de CCL2, CCL5 et CX3CL1²⁴⁵. Les évasines, protéines immunomodulatrices sécrétées par les tiques²⁴⁶, permettent également d'inhiber l'activité de certaines CK. Utilisées dans l'IM, ces protéines permettent notamment d'améliorer la survie et de limiter l'étendue de la cicatrice post IM chez la souris en limitant le recrutement de neutrophiles^{247,248}. Un anticorps monoclonal anti-CCR2 (MLN1202) a montré une réduction des marqueurs d'inflammation chez des patients à risque de maladies cardiovasculaire²⁴⁹. Enfin, étant donné le rôle de CXCR2 dans l'athérosclérose, l'essai CICADA (CXCR2 Inhibition – A Novel Approach to Treating Coronary Heart Disease) étudie l'effet sur les paramètres cardiovasculaires de l'inhibition de CXCR2 chez des patients souffrant de maladies coronarienne^{250,251}.

Partie IV : CXCL12-CXCR4-CXCR7

A. CXCL12

(1) CXCL12

La chimiokine CXCL12, également appelée SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor-1) ou PBSF (Pre B-cell growth Stimulating Factor) a été identifiée pour la première fois en 1994 par l'équipe de Nagasawa dans les cellules stromales de la moelle osseuse²⁵². Bien que la séquence codante pour CXCL12 ne soit pas située sur le même chromosome chez l'Homme, la souris et le rat (respectivement sur les chromosomes 10, 6 et 4^{253,254}), celle-ci est extrêmement conservée entre les espèces, avec plus de 95% de similitude entre les séquences nucléotidiques humaine et murine, et d'importantes similitudes avec d'autres espèces de vertébrés (poulet, lapin ou encore xénope).

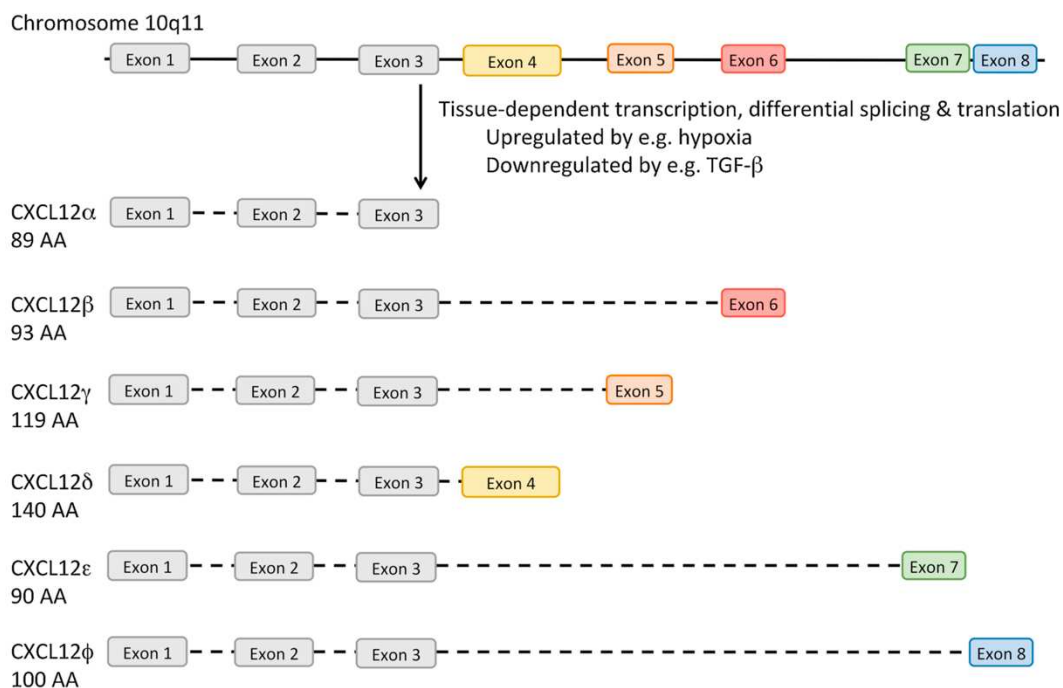


Figure 22 Epissage alternatif de CXCL12 chez l'Homme

Chez l'Homme, on compte 6 isoformes de CXCL12 issues d'un épissage alternatif. Toutes ont en commun les trois premiers exons et varient dans leur 4ème et dernier exon. La transcription, l'épissage alternatif et la traduction des isoformes de CXCL12 dépend notamment du tissu et des conditions tissulaires (inflammation, hypoxie, etc.) D'après Janssens et al., *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2018.

(2) Les isoformes de CXCL12

Plusieurs isoformes issues d'un épissage alternatif ont été progressivement découvertes. Ainsi, on compte trois isoformes fonctionnelles de CXCL12 chez la souris (α , β , γ)^{255,256} et six chez l'Homme (α , β , γ , δ , ϵ , θ)^{124,257} (Figure 22). L'épissage alternatif n'est pas un mécanisme commun à toutes les CK : CXCL12 est la seule CK à motif CXC à présenter des isoformes. Parmi les CK à motif CC, CCL4/CCL4L, CCL20, CCL23 et CCL27 présentent aussi un

épissage alternatif²⁵⁸. L'isoforme CXCL12 α , la plus étudiée, est composée de 68 acides aminés (AA). Les deux autres isoformes murins CXCL12 β et CXCL12 γ partagent les trois premiers exons du gène incluant donc les 68 AA de CXCL12 α mais diffèrent au niveau de leur chaîne C-terminale, dans le 4^{ème} exon. CXCL12 β a 4 AA supplémentaires formant un second domaine BBXB de liaison aux HS et CXCL12 γ a 30 AA supplémentaires qui contiennent 4 domaines de liaison aux HS²⁵⁹ (Figure 23). Dans ce manuscrit je me focaliserai essentiellement sur les isoformes CXCL12 α et CXCL12 γ .

Ces isoformes de CXCL12 sont capables de se lier aux récepteurs CXCR4 et ACKR3. Elles possèdent également un ou plusieurs domaine(s) de liaison aux GAGs et plus particulièrement avec les HS présents à la membrane cellulaire²⁶⁰. L'interaction entre les HS et CXCL12 est permise grâce à la présence d'un motif canonique dit domaine « BBXB » où B représente un AA basique et X un autre AA. Les résidus basiques chargés positivement permettent l'adhésion par contacts électrostatiques de CXCL12 α aux HS de la matrice extracellulaire chargée négativement^{261,262}. Ces sites de liaison aux HS sont bien distincts du domaine de liaison de CXCL12 à CXCR4²⁶¹. Une mutation dans ce domaine supprime la capacité d'adhésion de CXCL12 α aux HS²⁶³. L'injection de CXCL12 γ qui présente une haute affinité pour les HS due à la présence de 4 motifs BBXB supplémentaires par rapport à l'isoforme CXCL12 α , promeut l'accumulation intrapéritonéale des leucocytes ainsi que l'angiogenèse dans une matrice de matrigel *in vivo* de manière supérieure à l'isoforme CXCL12 α . Inversement, l'injection de mutants de CXCL12 incapables d'interagir avec les HS échoue à promouvoir le recrutement de leucocytes dans la cavité péritonéale soulignant l'importance des interactions CXCL12/HS dans la fonction biologique de CXCL12²⁵⁹. L'importance de ces interactions CXCL12/HS a été démontrée *in vivo*. Des travaux antérieurs de notre laboratoire ont révélé un rôle essentiel des interactions CXCL12/HS dans la croissance et le remodelage vasculaire post-ischémique dans un modèle expérimental d'ischémie critique du membre inférieur chez une souris exprimant CXCL12 dépourvu de ces sites d'interaction avec les HS (*Cxcl12*^{gagtm/gagtm})²⁶⁴. Deux modèles expérimentaux de lésions musculaires (notexine et lésion par le froid) chez la souris *Cxcl12*^{gagtm/gagtm} ont montré un léger ralentissement de la régénération sans perturbation majeure dans le modèle notexine mais d'importants défauts de régénérescence musculaire chez les souris mutées ayant subi l'agression musculaire la plus sévère (lésion par le froid) avec la présence d'un tissu fibreux cicatriciel et une infiltration d'adipocytes, suggérant un rôle majeur de ces interactions dans la réparation tissulaire²⁶⁵. Ces dommages ont été associés à une dérégulation de l'angiogenèse qui pourrait s'expliquer par la présence de vaisseaux non stabilisés par des

cellules murales (cellules musculaires lisses et péricytes)²⁶⁵. L'importance des interactions CXCL12/HS a également été montrée dans le trafic des cellules B lors de la réaction des centres germinatifs et pour la réponse immunitaire humorale²⁶⁶.

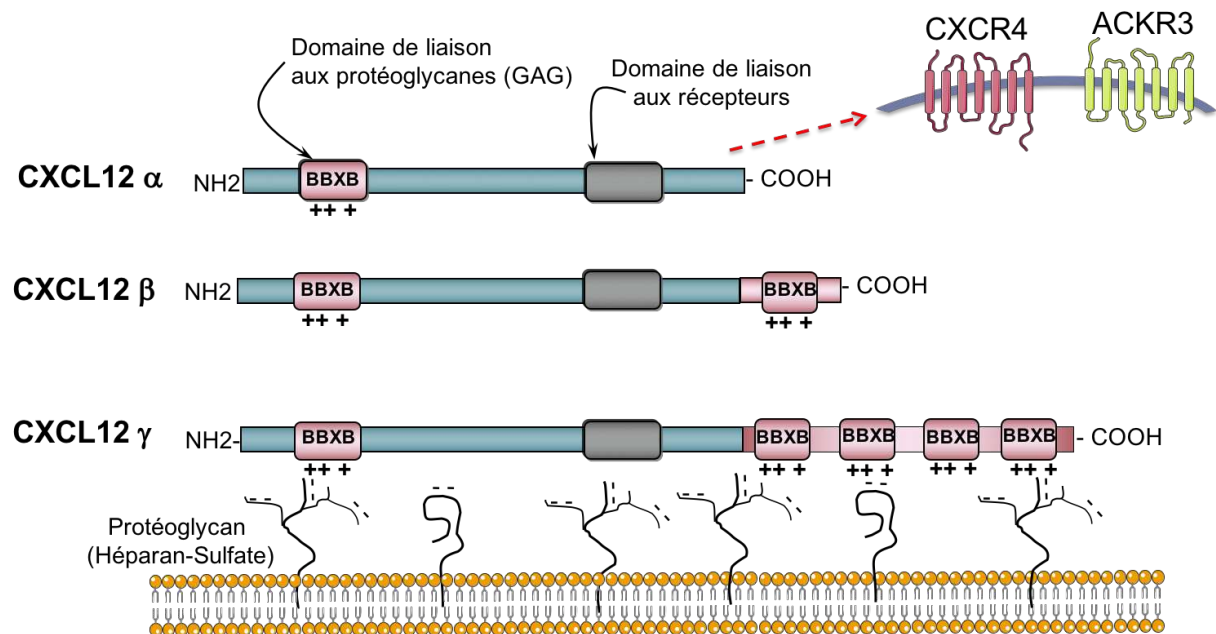


Figure 23 Illustration de la structure des isoformes de CXCL12

Représentation schématique des trois isoformes de CXCL12, avec un premier domaine « BBXB » de liaison aux HS commun aux trois, un domaine de liaison aux récepteurs CXCR4 et ACKR3 ainsi qu'un domaine C-terminal variant pour les isoformes : CXCL12β comporte un domaine BBXB supplémentaire et CXCL12γ en possède 4. Les domaines d'interaction avec les HS et les récepteurs sont spatialement distincts.

(3) Expression de CXCL12

CXCL12 est sécrétée par de nombreux types cellulaires, dont les cellules endothéliales, fibroblastes, cardiomyocytes ou les plaquettes, et est détectable dans la majorité des tissus. L'expression des différentes isoformes est tissu-dépendante et varie selon le stade de développement. Chez la souris, CXCL12α est la forme prédominante, exprimée dans tous les organes mais soumise à une protéolyse rapide dans le sang. Ainsi, CXCL12α est exprimée dans la plupart des organes au cours de l'embryogenèse. En particulier, CXCL12α est sécrétée au niveau de la moelle osseuse. Les souris invalidées pour *Cxcl12* (*Cxcl12*^{-/-}) présentent un phénotype létal²⁶⁷. Si les embryons *Cxcl12*^{-/-} ne présentent pas de phénotype particulier jusqu'à E15.5, la moitié d'entre eux sont morts avant E18.5. Des rares animaux vivants à la naissance, tous meurent dans l'heure malgré une apparence macroscopique normale. Les analyses de ces souris montrent de nombreux défauts hématopoïétiques au cours du développement. L'expression de CXCL12 est ainsi requise pour la myélopoïèse et lymphopoïèse dans la moelle, la lymphopoïèse dans le foie fœtal mais elle n'est pas nécessaire dans le développement du thymus. Enfin, le cœur des animaux *Cxcl12*^{-/-} présente de nombreuses anomalies de

développement avec notamment des défauts de formation du septum interventriculaire entre E13.5 et E18 responsables de la mort périnatale des animaux. D'autres études sur ce modèle montrent des défauts de développement vasculaire au niveau du système digestif²⁶⁸ et au cours du développement du cerveau et du système nerveux²⁶⁹. Afin de s'affranchir de ces défauts de développement et pour étudier le rôle de CXCL12 à l'âge adulte, un modèle d'invalidation inductible de *Cxcl12* a été réalisé et a montré des altérations de la vascularisation pulmonaire et de la structure des alvéoles²⁷⁰.

(4) Modulations de l'expression et de l'activité de CXCL12

CXCL12, comme de nombreuses protéines, est soumise à des modifications post-traductionnelles et enzymatiques pouvant ou non affecter sa structure, sa stabilité ou encore son affinité avec ses récepteurs²⁷¹.

Les 8 premiers AA de CXCL12 (Lys1-Pro2-Val3-Ser4-Leu5-Ser6-Tyr7-Arg8), précédant le motif CXC situé en positions Cys9-Pro10-Cys11, et plus particulièrement les deux premiers, ainsi que les 6 résidus suivants le motif CXC, Arg12-Phe13-Phe14-Glu15-Ser16-His17 également connu sous le nom de motif RFFESH, jouent un rôle majeur dans son interaction avec CXCR4. Ainsi, toute enzyme capable de cliver CXCL12 dans sa partie N-terminale aura un effet délétère sur l'activation de CXCR4 par CXCL12. De tels événements peuvent changer la spécificité et la nature pharmacologique de CXCL12^{272,273}. Il a été montré que la dipeptidyl-peptidase IV (DDP4, aussi connue sous le nom de CD26) peut cliver les deux premiers acides aminés de CXCL12²⁷⁴. La forme ainsi clivée de CXCL12 présente une affinité moindre pour CXCR4 et est incapable de l'activer²⁷⁵. Le clivage de CXCL12 par DPP4 est en revanche rendu impossible lorsque CXCL12 est lié aux HS²⁷⁶. De nombreuses enzymes membres de la famille des métalloprotéases matricielles (MMP), les MMP 1, 3, 9, 13 et 14 sont capables de cliver les 5 premiers acides aminés de CXCL12, empêchant ainsi l'activation de CXCR4, indépendamment d'une éventuelle association aux GAGs²⁷⁷. L'élastase, produite par les neutrophiles et les cellules mononuclées ainsi que la cathepsine G permettent également d'inactiver CXCL12, en clivant respectivement les trois et cinq premiers acides aminés^{278,279}. Récemment, il a été montré que ces variants présentent une sélectivité et une activité différente envers les récepteurs de CXCL12²⁸⁰.

L'activité de CXCL12 peut également être modifiée au travers de modifications post-traductionnelles comme la citrullination des résidus arginine et la nitration des résidus tyrosine. La citrullination, ou déamination, correspond à l'hydrolyse en cétone d'un groupe imine d'un résidu Arg, résultant en citrulline (Cit). Bien que l'effet de cette modification soit subtil (perte

de masse de 1 Da), la conversion de l'arginine en citrulline entraîne une perte de charge, pouvant affecter les interactions avec d'autres protéines. Dans le cas de CXCL12, il y a 5 arginines, pouvant être citrullinées par la peptidylarginine deiminase 2 (PAD2). Il a été montré que la citrullination d'un nombre croissant d'arginine entraînait une diminution progressive de l'activité de CXCL12, la citrullination de toutes les arginines inactivant totalement l'activation des deux récepteurs²⁸¹. L'autre modification de CXCL12 est la nitration des tyrosines par le peroxy-nitrite, un composé oxydant très réactif produit par les oxyde nitrique synthases (Nitric Oxyde Synthase, NOS). Cette modification est une réaction chimique aboutissant à l'insertion d'un groupe nitro NO₂ sur les tyrosines, créant ainsi une nitrotyrosine. En fonction des protéines concernées, cette modification peut ou non avoir un effet biologique. Dans le cas de CXCL12, la nitration de sa seule tyrosine entraîne une diminution de son activité²⁸².

En ce qui concerne les variations dans la séquence nucléotidique, plusieurs polymorphismes ont été identifiés, mais il en existe un étudié pour son effet sur la résistance à l'entrée du VIH ou encore sa prévalence chez les patients souffrant de sclérose en plaque. Il s'agit du variant *Cxcl12-3A*, également connu sous le nom *Cxcl12-A801G* où le A en position 801 est remplacé par un G²⁸³. Étant donné que la mutation se situe dans la zone non traduite, il est supposé qu'elle joue un rôle dans la régulation de l'expression en retardant la dégradation de l'ARN messager codant pour CXCL12, induisant des taux circulants plus élevés de la protéine, et entraînant ainsi une compétition plus importante avec le VIH, qui a également pour corécepteur CXCR4²⁸⁴. Enfin, un peu plus récemment, plusieurs de polymorphismes de *Cxcl12* ont été identifiés et seraient associés à une susceptibilité accrue aux maladies coronariennes²⁸⁵.

(5) L'isoforme CXCL12 γ

Peu de données sur l'étude de CXCL12 γ sont disponibles. En effet, la majeure partie des travaux étudiant le rôle de CXCL12 dans des situations physiologiques ou physiopathologiques s'est très souvent focalisée sur le rôle de l'isoforme CXCL12 α .

CXCL12 γ est l'isoforme de CXCL12 la plus longue. Sur les 98 AA qui composent CXCL12 γ , les 68 premiers AA ont une structure tridimensionnelle proche de celle de l'isoforme α . Les 30 AA supplémentaires constituant l'extrémité C-terminale adoptent une forme non structurée, très mobile et riche en résidus basiques²⁸⁶ (Figure 24). Cette extrémité C-terminale de CXCL12 γ comprend 18 résidus basiques, soit 60% d'AA chargés positivement (lysine (K) et arginine (R)) et 4 motifs de liaison au HS (BBXB). Ceci explique l'affinité extrêmement élevée de CXCL12 γ pour les HS chargés négativement ($K_d = 1,5$ nM versus 200 nM pour CXCL12 α et 53 nM pour CXCL12 β)^{259,286}. CXCL12 γ est ainsi plus retenue à la surface cellulaire par les HS que les autres

isoformes. Cette spécificité structurale fait de l'isoforme CXCL12 γ une protéine aux propriétés haptotactiques supérieures à celles de l'isoforme CXCL12 α avec un spectre de liaison aux GAGs élargi. En effet, il a été montré que CXCL12 γ induit la migration des cellules T lymphoïdes exprimant CXCR4 (riches en HS) avec une puissance agoniste beaucoup plus faible par rapport à l'isoforme CXCL12 α , et ce en accord avec l'affinité réduite de CXCL12 γ pour CXCR4 comparé à CXCL12 α ^{259,286}. En ce qui concerne ACKR3, CXCL12 α et CXCL12 γ se lient de façon similaire à ce récepteur²⁵⁹. De manière intéressante, l'utilisation de mutants de CXCL12 γ ayant perdu les motifs BBXB de liaison aux HS, présente une affinité et une activation augmentée de CXCR4, suggérant le rôle clé des interactions CXCL12 γ /HS dans la fonction biologique de la CK²⁵⁹.

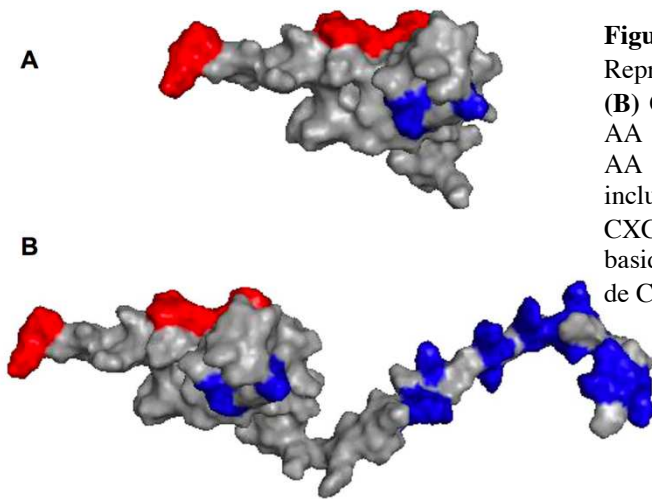


Figure 24 Structures de CXCL12 α et CXCL12 γ
Représentation en surface de contacts de (A) CXCL12 α (B) CXCL12 γ . Les surfaces en rouge représentent les AA impliqués dans la liaison avec les récepteurs. Les AA en bleu représentent les sites de liaison aux HS, incluant les résidus Lys24 et Lys27 communs à CXCL12 α et CXCL12 γ ainsi que les nombreux résidus basiques dans le domaine C-terminal, caractéristiques de CXCL12 γ . D'après *Connell et al., Sci. Signal.* 2016.

Plus récemment, il a été montré que les interactions CXCL12/HS régulent la réponse des isoformes CXCL12 α et CXCL12 γ au travers d'une présentation différente au récepteur CXCR4²⁸⁷. Les auteurs ont montré dans des expériences d'association et en utilisant un récepteur CXCR4 solubilisé que CXCL12 γ présente une affinité plus élevée que CXCL12 α pour CXCR4 mais une capacité de signalisation et de chimiotaxie réduite. Ceci indique que la partie C-terminale de CXCL12 γ interagissant avec l'extrémité N-terminale sulfatée de CXCR4 confère une liaison de haute affinité pour CXCR4 mais non productive en termes d'activité de signalisation. La présence d'HS interfère avec l'activation de CXCR4 par CXCL12 γ mais n'a aucun effet sur les interactions entre CXCL12 α et CXCR4, suggérant que les GAGs contrôlent de manière isoforme-spécifique la fonction de la CK (Figure 25). Ceci démontre que la régulation des CK par les HS va au-delà du simple processus d'immobilisation en modulant directement la liaison et l'activation du récepteur²⁸⁷.

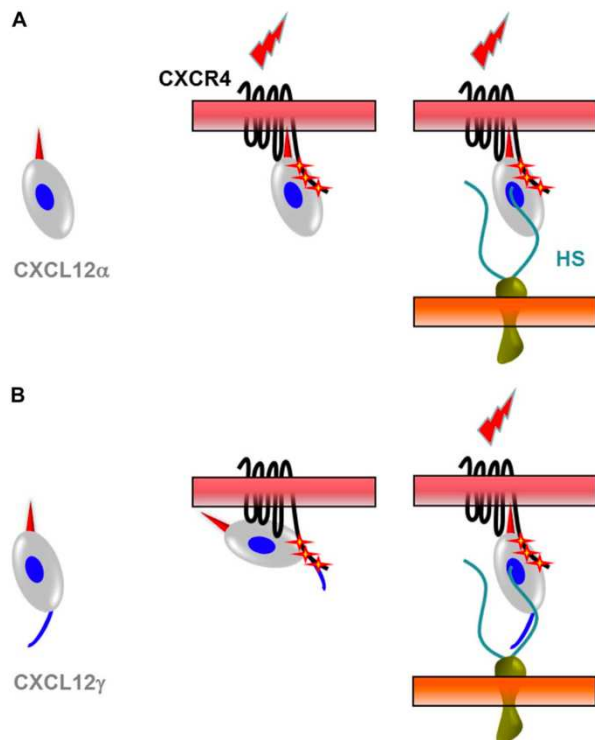


Figure 25 Présentation de CXCL12 α et CXCL12 γ à CXCR4 médiée par les HS.

(A) CXCL12 α interagit avec les HS par le biais d'un groupe de résidus basiques (Lys24/Lys27, point bleu) n'interférant pas avec la liaison et l'activation de CXCR4. Par conséquent, le CXCL12 α libre et le CXCL12 α lié au HS stimulent de manière similaire la signalisation du CXCR4. (B) Pour CXCL12 γ , en l'absence des HS, l'extension C-terminale (en bleu) qui caractérise cette isoforme interagit avec la région N-terminale de CXCR4, ce qui empêche la formation d'une association fonctionnelle entre la chimiokine et son récepteur. Les HS, qui interagissent à la fois avec le cluster Lys24/Lys27 et l'extrémité C-terminale de la chimiokine, repositionnent CXCL12 γ pour promouvoir une interaction chimiokine-récepteur fonctionnelle et restaurer le potentiel de signalisation de cette isoforme. D'après *Connell et al, Sci. Signal. 2016*

Ceci a été appuyé par des résultats récents où il a été démontré que les isoformes de CXCL12 présentaient des capacités différentes à promouvoir l'angiogenèse et à modifier la perméabilité vasculaire en fonction de la nature des matrices en GAGs. CXCL12 γ présente un potentiel pro-angiogénique supérieur aux isoformes CXCL12 α et CXCL12 β et sur une matrice mixte collagène/acide hyaluronique alors que cette capacité s'inverse totalement en présence d'une matrice de collagène²⁸⁸. L'autre propriété unique de CXCL12 γ , découle aussi de la particularité de son extrémité C-terminale qui comprend un signal unique d'export nucléaire, lui permettant d'être transporté dans le noyau des cellules au lieu d'être sécrété dans le milieu extracellulaire²⁸⁹. Cette localisation intranucléaire de CXCL12 γ a été observée dans les cardiomyocytes et les cellules endothéliales cardiaques suggérant une fonction autocrine de CXCL12 γ dans les cellules cardiaques²⁸⁹.

L'ARNm de CXCL12 γ a été identifié pour la première fois dans le cerveau de rats²⁵⁶. Au cours de l'organogenèse CXCL12 γ est exprimé dans la cavité auriculaire. Chez la souris adulte, CXCL12 γ est exprimé essentiellement au niveau du cœur puis au niveau des veines et artères portes du foie, de l'épithélium intestinal, des alvéoles pulmonaires, du thymus et du cerveau^{257,290,291}. L'expression de CXCL12 γ est également modulée dans différentes pathologies²⁹². Une étude réalisée sur des échantillons de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde a montré que CXCL12 γ s'accumule au niveau de l'endothélium, des cellules dendritiques, deux interfaces importantes pour le recrutement et l'activation des lymphocytes T²⁹³. CXCL12 γ jouerait un rôle protecteur dans l'auto-immunité du système nerveux central²⁹⁴.

En effet, CXCL12 γ est fortement exprimé après induction d'une encéphalomyélopathie neuro-immune chez la souris puis son expression est profondément diminuée à la suite de la neuro-inflammation. Il a été observé une expression plus forte de CXCL12 γ dans un modèle murin de résistance à l'encéphalomyélopathie²⁹⁴. Comme les autres isoformes, CXCL12 γ est également capable d'inhiber l'infection par le VIH *in vitro* avec une meilleure efficacité par rapport aux autres isoformes²⁹⁵. CXCL12 γ est exprimé dans les cancers du sein métastatiques. Il a été montré que fibroblastes associés aux tumeurs sécrétant CXCL12 γ favorisent le développement de métastases et que ceci est associé à une augmentation de la vascularisation et diminution de l'apoptose dans les tumeurs²⁹⁶. Enfin, des travaux antérieurs de notre laboratoire, ont révélé un rôle essentiel des interactions CXCL12 γ /HS dans la croissance et le remodelage vasculaire post-ischémique dans un modèle expérimental d'ischémie critique du membre inférieur chez une souris exprimant CXCL12 dépourvu de ces sites d'interaction avec les HS (*Cxcl12*^{gagtm}). Ces travaux ont également montré que l'isoforme CXCL12 γ possède une efficacité supérieure à celle de CXCL12 α pour initier le processus de revascularisation post-ischémique²⁶⁴.

B. Les récepteurs CXCR4 et ACKR3

(1) CXCR4

Les premières mentions de CXCR4 dans la bibliographie datent de 1994, année où un récepteur à sept domaines transmembranaires (7-TMR) similaire à CXCR1 et CXCR2, récepteurs de l'IL-8, a été identifié dans les leucocytes circulants et nommé LESTR (Leukocyte-Derived Seven-Transmembrane domains Receptor)²⁹⁷. Début 1996, un corécepteur d'entrée du VIH (Virus de l'immunodéficience humaine) a été identifié dans les cellules CD4⁺ par clonage et nommé *fusin*²⁹⁸. Assez rapidement, il est constaté que LESTR et *fusin* sont une seule et même protéine. En août 1996, deux études identifient simultanément et indépendamment CXCL12 comme ligand pour LESTR capable de bloquer l'entrée du VIH dans les cellules cibles du virus^{299,300}. Rapidement LESTR est renommée CXCR4 selon la nomenclature des RCK. Fin 1996, l'équivalent murin de LESTR est identifié avec plus de 90% d'homologie avec la séquence humaine et présentant la même caractéristique de corécepteur d'entrée du VIH²⁵⁵. Depuis, d'autres ligands hors CK ont été identifiés, qu'ils soient en compétition avec CXCL12 comme l'ubiquitine extracellulaire³⁰¹, HBD-3 (Beta-Defensin 3)³⁰² ou la cytokine MIF-Macrophage Inhibitory Factor³⁰³. Par ailleurs, il a été démontré que HMGB1 pouvait former des hétérodimères avec CXCL12 et interagir avec CXCR4³⁰⁴.

- Expression de CXCR4

CXCR4 est exprimé dans un grand nombre de tissus, pendant le développement et à l'âge adulte. En particulier, on retrouve une expression soutenue de CXCR4 dans de nombreuses cellules hématopoïétiques telles que les neutrophiles, monocytes, lymphocytes B et T ainsi que leur précurseurs, les cellules progénitrices CD34⁺ de la moelle et du sang³⁰⁵. CXCR4 est également fortement exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires³⁰⁶, ainsi que les neurones du système nerveux central et périphérique ainsi que dans les astrocytes et cellules microgliales^{307,308}

Le rôle primordial de l'axe CXCL12/CXCR4 dans le développement embryonnaire, l'organogénèse et l'hématopoïèse a été mis en évidence chez des souris invalidées pour *Cxcl12* (*Cxcl12^{-/-}*) et *Cxcr4* (*Cxcr4^{-/-}*). En effet, ces dernières présentent une hématopoïèse fortement réduite ainsi que d'importants défauts de développement du système digestif et cardiovasculaire tels qu'une hyperplasie ventriculaire et une communication interventriculaire défectueuse conduisant à leur décès *in utero*^{268,309}. L'analyse de la séquence génomique de *Cxcr4* indique la présence d'un intron interrompant la région codant la partie N-terminale. Une isoforme issue d'épissage alternatif plus faiblement exprimée et plus longue dans sa partie N-terminale sans affecter son affinité aux ligands a été identifiée mais ne semble pas exercer de rôle particulier³⁰⁶, si ce n'est de fournir une redondance en cas de défaut d'expression de la forme principale. Plus récemment, deux autres isoformes supplémentaires de *Cxcr4* ont été identifiées avec des variations de la longueur de la partie N-terminale, sans fonctionnalité apparente³¹⁰.

- Modifications post-traductionnelles

CXCR4 peut être soumis à une glycosylation de son site Asn11 situé dans le domaine extracellulaire³¹¹. Cette glycosylation est importante dans la compétition entre CXCL12 et le VIH pour l'interaction avec CXCR4. En effet, l'absence de ce site de glycosylation diminue l'affinité de CXCL12 à CXCR4 tout en augmentant la capacité de CXCR4 à servir de corécepteur d'entrée pour le VIH^{312,313}. De plus, CXCR4 possède 3 résidus tyrosines (Tyr7, Tyr12 et Tyr21) pouvant être sulfatés par le biais de la tyrosyl-sulfotransferase au niveau de l'appareil de Golgi. Si la sulfatation de CXCR4 ne modifie pas son interaction avec le VIH, celle de la Tyr21 est nécessaire pour conserver l'affinité à CXCL12, en stabilisant la structure de la CK lors de l'interaction avec son récepteur^{314,315}. Enfin CXCR4 subit de nombreuses phosphorylations dans sa partie C-terminale intracellulaire. Il a été démontré qu'il existait 8 sites de phosphorylation, sensibles à des différentes protéines de signalisation, permettant de moduler la cinétique et l'amplitude de la réponse cellulaire³¹⁶.

(2) RDC1/CXCR7/ACKR3

- Histoire

Les formes canine et humaine d'un récepteur orphelin à 7 domaines transmembranaires sont identifiées en 1989³¹⁷ et 1991³¹⁸ et nommées RDC1. La forme murine est identifiée quelques années plus tard en 1998³¹⁹ et montre une homologie supérieure à 85% avec les formes humaines et canines. RDC1 présente une homologie de 42% avec CXCR2. Il perd son statut de récepteur orphelin lorsqu'on lui découvre CXCL12 comme ligand, jusque-là connu comme le seul ligand naturel de CXCR4. De plus, RDC1 présente une affinité 10 fois supérieure à CXCR4 pour CXCL12 α et est capable d'induire la chimiotaxie de lymphocytes en réponse à CXCL12^{320,321}. RDC1 est ensuite qualifié de RCK et renommé CXCR7. Une des premières fonctions identifiées de CXCR7 est son activité « scavenger » lui permettant de réguler le gradient de CXCL12 et ainsi la migration de cellules CXCR4⁺³²². CXCR7 est également susceptible de lier d'autres CK comme CXCL11 (ou I-TAC, interféron-inducible T-cell alpha chemoattractant), MIF³²³, l'adrénomédulline³²⁴ ainsi que plusieurs peptides dérivés des opioïdes^{325,326}. Plusieurs études ont montré qu'ACKR3 était capable de recruter et d'activer les voies β -arrestine en réponse à CXCL12, CXCL11 ou un agoniste synthétique appelé TC14012^{182,327,328}. En raison de sa capacité à lier de multiples ligands et à les envoyer vers des voies de dégradation^{325,329} (activité « decoy » ou « scavenger ») et de son incapacité à activer les voies protéines G-dépendantes³³⁰, CXCR7 est classé parmi les récepteurs atypiques de chimiokines (Atypical Chemokine receptor, ACKR) et renommé ACKR3¹²². Cependant, il est à noter que l'incapacité d'ACKR3 à coupler les protéines G reste débattue car il a été montré une signalisation médiée par la protéine G *via* ACKR3 dans les astrocytes de rongeurs et les cellules de gliome humain^{331,332}.

- Expression de ACKR3

Pour analyser l'expression d'ACKR3, des souris rapportrices génétiquement modifiées dont la région codante pour ACKR3 a été remplacée soit par la β -galactosidase³³³ soit par la séquence de l'EGFP³³⁴ ou encore une GFP placée sous le contrôle du promoteur d'ACKR3 (*Ackr3-Gfp*)³³⁵. Plusieurs groupes ont aussi recherché la présence de l'ARNm par différentes techniques de biologie moléculaire. La distribution de l'ARNm codant pour ACKR3 est ubiquitaire, présente dans de nombreux organes et types cellulaires, mais l'expression de la protéine l'est nettement moins^{318,319}. Pour résumer, ACKR3 a été détecté dans les cellules stromales mésenchymateuses, de nombreuses cellules neuronales (astrocytes, cellules gliales), des cellules du système vasculaire (CML, cellules endothéliales) ainsi que les cellules du système immunitaire³³⁶. Son

expression est également corrélée avec le degré de maturation des lymphocytes B ou celui des cellules dendritiques^{337,338}. L'expression de ACKR3 a également été détectée de façon très transitoire lors du développement embryonnaire ainsi que dans l'endothélium activé³²¹. Les souris invalidées pour *Ackr3* (*Ackr3*^{-/-}) ne présentent pas de défauts de développement de la vascularisation gastrointestinale ou du système nerveux central. En revanche, d'importants défauts de développement du système cardiovasculaire sont observés et conduisent à la mort des animaux, *in utero* ou peu de temps après la naissance sans pour autant qu'il n'y ait de mortalité particulière des animaux *Ackr3*^{-/-} avant E16.5^{333,339,340}. L'analyse de ces animaux a montré une hyperplasie cardiaque associée à une hypertrophie des cardiomyocytes, une sténose des valves aortiques et pulmonaires sans atteinte des valves mitrale et tricuspide ainsi que des communications interauriculaires et interventriculaires, suggérant un rôle majeur de ACKR3 dans le développement cardiovasculaire. Des analyses transcriptomiques ont également mis en évidence une diminution d'expression au niveau des valves semilunaires de certains facteurs essentiels à la croissance vasculaire, tels que *Amd*, *Chf Vwf* ou *Col9a1*. L'essentiel de ces défauts sont retrouvés chez les souris invalidées pour *Ackr3* dans l'endothélium (*via* un modèle *Tie2*-CRE). Contrairement à *Cxcl12* et *Cxcr4*, *Ackr3* ne semble pas subir d'épissage alternatif et ne présente pas d'isoforme après traduction.

- Modifications post-traductionnelles

En ce qui concerne les modifications post-traductionnelles de ACKR3, il a été montré que le récepteur est constitutivement ubiquitinylé dans sa partie C-terminale ; la liaison à CXCL12 entraîne la dé-ubiquitination. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle consistant en la fixation de protéines d'ubiquitine sur des résidus lysines accepteurs, et joue notamment un rôle dans le transport intracellulaire des protéines. Dans le cas de ACKR3, ce phénomène d'ubiquitination réversible jouerait un rôle majeur dans le trafic intracellulaire et la capacité d'être recyclé à la membrane après internalisation^{341,342}. La partie C-terminale intracellulaire de ACKR3 comporte 9 résidus sérine ou thréonine susceptibles d'être phosphorylés³⁴³. Contrairement à CXCR4, peu de choses sont connues sur l'état de phosphorylation de ACKR3 lors de son activation. Il a néanmoins été démontré que dans les astrocytes ACKR3 était phosphorylé par GRK2 uniquement, et que la phosphorylation était nécessaire pour l'activation de ERK et AKT en aval de l'activation de ACKR3³⁴⁴. Plus récemment, il a été montré que la phosphorylation d'ACKR3 régula la migration des cellules neuronales de manière indépendante des arrestines³⁴⁵.

(3) Signalisation associée au trio CXCL12-CXCR4-ACKR3

CXCL12 peut induire une signalisation intracellulaire en se liant à des monomères et homodimères de CXCR4, des monomères d'ACKR3 ou des hétérodimères CXCR4-ACKR3 (Figure 25). Plusieurs modes d'actions possibles pour cette signalisation peuvent être proposés bien qu'il soit difficile de les distinguer les uns des autres^{271,346} :

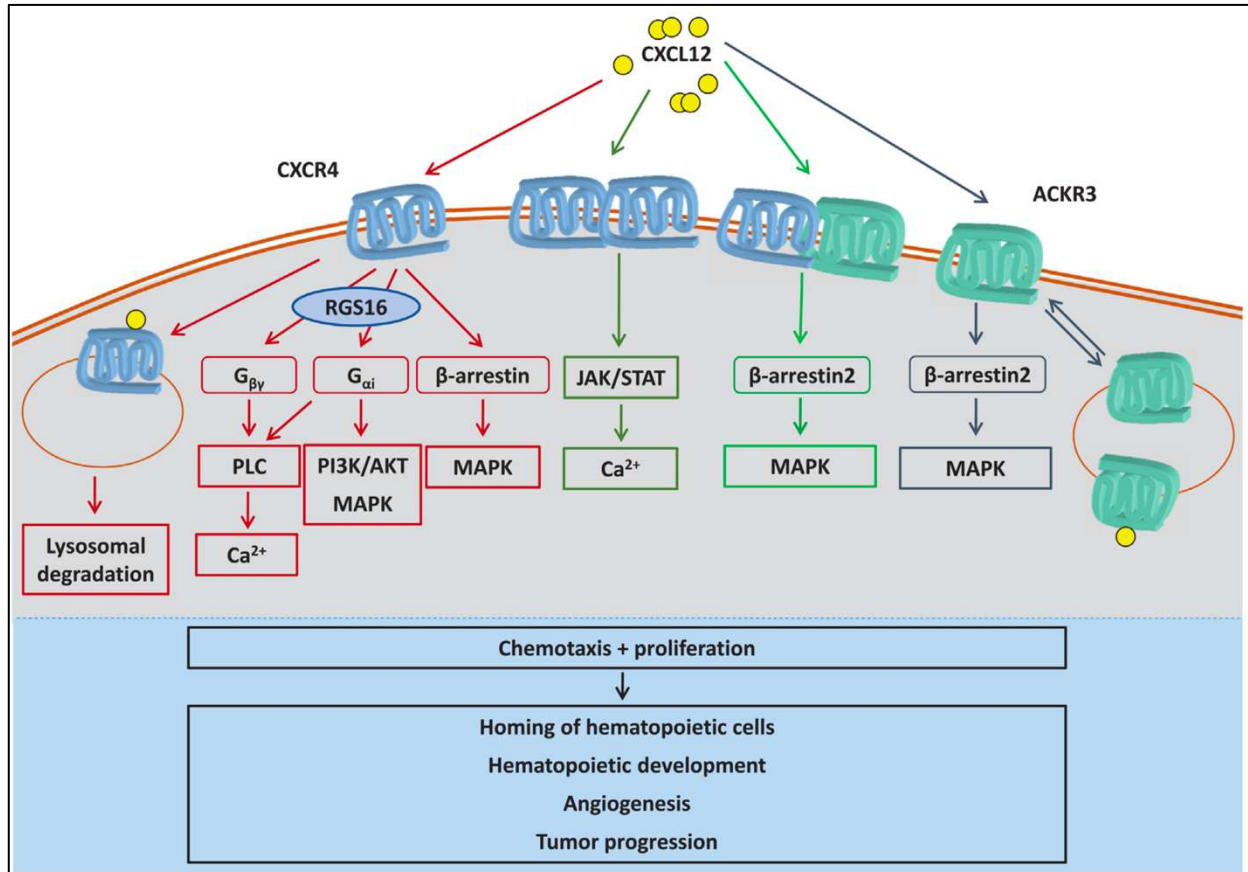


Figure 26 La signalisation dépendante de CXCL12

CXCL12 peut entraîner une signalisation intracellulaire en se liant à des formes mono- ou dimériques de CXCR4, des hétérodimères CXCR4-ACKR3 ou à des monomères de ACKR3. CXCR4 active une signalisation associée aux protéines G, régulée négativement par RGS16. ACKR3 fonctionne comme récepteur scavenger de CXCL12 mais peut aussi entraîner une signalisation par la β -arrestine. La formation d'un complexe CXCR4-ACKR3 fait basculer la signalisation CXCL12-dépendante de la protéine G vers la β -arrestine. L'interaction de CXCL12 avec une forme dimérique de CXCR4 induit la signalisation JAK/STAT. Si CXCR4 est dégradé rapidement après internalisation, ACKR3 est en permanence recyclé à la membrane indépendamment de la liaison avec le ligand, ce qui permet la régulation et la dégradation du CXCL12 extracellulaire. CXCL12 est connu pour induire la chimiotaxie et la prolifération de certaines cellules, jouant un rôle majeur dans certains procédés biologiques tels que l'angiogenèse, le développement hématopoïétique ou la progression des tumeurs. AKT, protein kinase B; Ca²⁺, calcium ions; G α , G protein subunit α ; G $\beta\gamma$, G protein subunit $\beta\gamma$; JAK, janus kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PI3K, phosphatidylinositide 3-kinase; PLC, phospholipase C; RGS16, regulator of G protein signalling 16; STAT, signal transducer and activator of transcription. D'après Pawig *et al.*, *Front. Immunol.*, 2015.

Une signalisation CXCR4-dépendante : ACKR3 servant de récepteur leurre, permettant la modulation de l'activité de CXCR4

L'activation de CXCL12 par CXCR4 conduit à l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K ainsi qu'à une diminution de la production de l'AMPc³⁴⁷ et à une mobilisation des ions calcium Ca²⁺ intracellulaires³⁴⁸. La voie PI3K/PTEN activée par CXCR4 est associée dans la mobilisation des protéines de remodelage du cytosquelette, permettant ainsi le réarrangement, la polarisation puis la migration cellulaire en direction du gradient de CXCL12^{349,350}. De manière plus générale, la signalisation de CXCR4 dépend de la durée de stimulation avec ses ligands, de l'efficacité de liaison des protéines associées, ainsi que de la présence d'autres récepteurs avec lesquels CXCR4 peut s'hétéro-dimériser (tels que CCR2, CCR5, CXCR4 ou ACKR3) et de leurs ligands respectifs³⁵¹. Il peut aussi y avoir une mobilisation des β -arrestines *via* l'axe CXCL12/CXCR4 qui permet à CXCR4 d'être internalisé puis dégradé. CXCR4 peut former des dimères et interagir avec des formes mono ou dimériques de CXCL12, ce qui entraîne une activation de la voie JAK/STAT3 indépendamment des protéines G³⁵². ACKR3 peut agir en tant que scavenger, permettant la régulation du gradient extracellulaire de CXCL12 pour réguler la biodisponibilité de CXCL12 et la migration de cellules CXCR4³²². Dans le cas de cellules cancéreuses, le contrôle du gradient de CXCL12 par les cellules ACKR3⁺ permet de promouvoir la prolifération des cellules CXCR4³⁵³. De même, ACKR3 permet une régulation de la concentration de CXCL12 qui forme des dimères en concentration élevée ; la forme dimérique de CXCL12 inhibant la migration CXCR4-dépendante en contrôlant le gradient³⁵⁴ ;

Une signalisation propre à ACKR3

Contrairement à CXCR4, ACKR3 n'est pas nécessairement dégradé après activation. Il cycle en permanence entre la membrane plasmique et les compartiments intracellulaires sans être dégradé, qu'il soit lié ou non à un ligand. C'est ce qui lui a valu sa fonction de « scavenger »³²⁹. L'internalisation d'ACKR3 est associée au recrutement de la voie β -arrestine qu'elle soit induite ou non par le ligand^{182,327,355,356}. Il a également été montré que l'AMD3100, un antagoniste de CXCR4³⁵⁷ avait des propriétés agonistes sur ACKR3 à des doses non physiologiques supérieures à 10mM, en induisant le recrutement de la β -arrestine³⁵⁸. ACKR3 est capable de lier l'adrénomédulline (*Adm*), une hormone peptidique critique pour le développement vasculaire et lymphatique cardiaque³⁵⁹. Les souris sur-exprimant l'*Adm*, présentent une hypertrophie cardiaque similaire à celle observée chez les animaux *Ackr3*^{-/-}. Il a d'ailleurs été montré dans un modèle d'inactivation d'*Ackr3* et/ou d'*Adm*, qu'ACKR3 pouvait moduler la signalisation médiée par l'*Adm* au cours du développement, *via* son activité

scavenging dans le coeur³²⁴. Toutefois, l'expression d'ACKR3 dans les vaisseaux lymphatiques de souris adultes et son activité scavenging ne semble pas jouer un rôle important dans la lymphangiogenèse³⁶⁰.

Il a été montré que le TC14012, un peptide synthétique, agoniste inverse de CXCR4 et agoniste d'ACKR3, pouvait recruter la β -arrestine 2³²⁷ et activer les voies de signalisation associées aux MAPK^{182,355}. Par ailleurs, ACKR3 peut interagir avec la Connexin-43 et inhiber les communications intercellulaires passant par les jonctions communicantes. Cette interaction nécessite CXCL12 ou CXCL11 mais est indépendante des récepteurs CXCR4 et CXCR3³³¹. Récemment, il a été montré que ACKR3 est un régulateur critique de la vasculogenèse et de la spécification artérielle post-natal *via* la signalisation Notch. Cet effet sur la vasculogenèse et la différenciation endothéliale serait associée à l'activation de l'expression d'ACKR3 sur les cellules souches mésenchymateuses par le VEGF et le PDGF au travers l'activation des voies de signalisation PI3K médiées par le récepteur du PDGF³⁶¹.

Une signalisation basée sur une coopération de CXCR4 et ACKR3, formant des hétérodimères :

Les deux récepteurs peuvent former des hétéro-oligomères CXCR4- ACKR3^{330,339,362}. Au sein de ces hétérodimères, ACKR3 peut moduler la chimiotaxie des lymphocytes T en agissant d'une part comme un modulateur allostérique de CXCR4 en modulant la signalisation dépendante des protéines G en aval de CXCR4, d'autre part *via* son activité scavenging en régulant le gradient de CXCL12³³⁰. Il a également été montré que cet hétérodimère potentialise l'activation des β -arrestines avec une stimulation accrue de la cascade ERK1/2 et une activation de p38, MAPK et SAPK^{339,362}.

Une signalisation en parallèle CXCR4 et ACKR3, avec certains mécanismes activés *via* CXCR4 et d'autres activés *via* ACKR3

Il est possible d'avoir au sein de cellules exprimant les deux récepteurs une activation simultanée ou différentielle des deux récepteurs, ayant chacun leur mécanisme d'action spécifique. Ainsi, la signalisation CXCL12- ACKR3 permet la survie et l'adhésion des CPEs en culture alors que la signalisation CXCL12-CXCR4 permet leur migration et leur prolifération³⁶³. Un effet similaire a été constaté dans des cellules progénitrices rénales³⁶⁴.

Une signalisation redondante par CXCR4 et ACKR3 ayant le même effet mais passant par différents mécanismes

Enfin, certains travaux ont montré qu'il pouvait y avoir une activation de CXCR4 et/ou ACKR3 ayant pour finalité les mêmes effets biologiques. Ainsi, il peut y avoir une migration cellulaire β -arrestine-dépendante associée à l'activation de CXCR4 comme ACKR3^{182,365,366}.

Ainsi, la signalisation CXCL12-CXCR4-ACKR3 est complexe et peut entraîner l'activation de nombreux mécanismes cellulaires au sein d'une grande diversité de types cellulaires. Le rôle de cet axe a été particulièrement étudié dans le cadre de nombreuses pathologies.

C. L'axe CXCL12-CXCR4/ACKR3 en contexte pathologique

Au-delà de son rôle dans le développement embryonnaire et le maintien de l'homéostasie, CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et ACKR3 sont impliqués dans de nombreuses pathologies. Cet axe peut présenter un effet bénéfique, délétère ou parfois ambivalent³⁶⁷ (Figure 26).

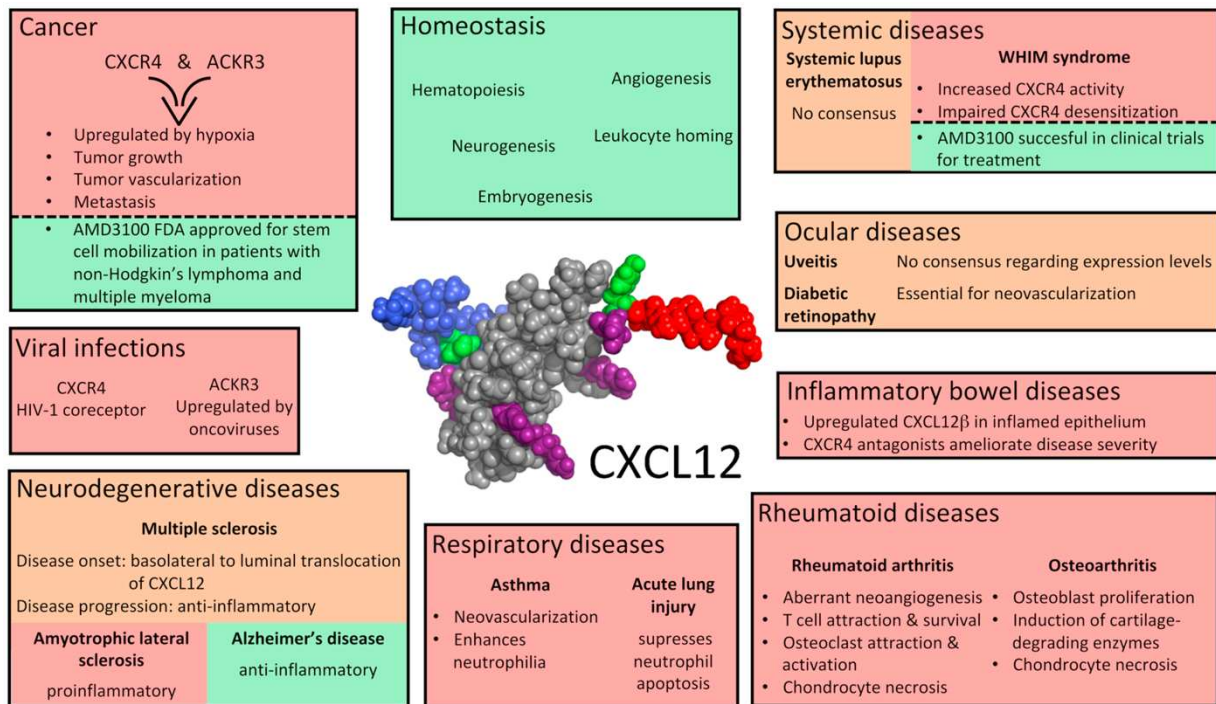


Figure 27 Les rôles de CXCL12 en contexte pathologique

Synthèse des implications de CXCL12, CXCR4 et ACKR3 dans différentes pathologies. La couleur rouge indique un effet délétère ; le vert indique un effet protecteur dans la maladie. La couleur orange indique une dualité de l'effet ou une absence de consensus vis-à-vis de la contribution de CXCL12. La structure 3D de CXCL12 présentée ici est disponible sur PDB avec le numéro 2KEC (Veldkamp et al., *Protein Sci.*, 2009.). D'après Janssens et al., *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2018.

(1) Infections virales

A l'origine, CXCR4 a été principalement étudié en tant que co-récepteur d'entrée du VIH dans les cellules CD4⁺ en raison de sa capacité de liaison avec les gp120³⁶⁸. Avec CCR5 comme second co-récepteur d'entrée du VIH³⁶⁹, cela a abouti à la classification des souches du VIH en fonction du tropisme du virus aux récepteurs (R5, X4 et R5/X4)³⁷⁰. Si les souches R5 sont fréquentes peu de temps après l'infection, les souches X4 sont de plus en plus fréquentes à un stade avancé et sont associées à une progression vers le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Ce changement de tropisme pourrait être lié à une surexpression de CXCR4 provoquée par l'IL-4 ou l'IL-7^{371,372} ou bien la dexaméthasone, utilisée comme immunosuppresseur dans un

grand nombre de pathologies³⁷³. La contribution de CXCL12 dans ce contexte est double : d'une part il y a compétition directe entre CXCL12 et gp120 pour la liaison avec CXCR4 et d'autre part la liaison de CXCL12 à CXCR4 entraîne l'internalisation de ce dernier et promeut une diminution de la disponibilité membranaire du récepteur. En particulier, il a été montré que l'isoforme CXCL12 γ permet la meilleure inhibition d'infection VIH *in vitro*²⁹⁵.

Ce n'est pas la seule infection virale où CXCL12 et ses récepteurs sont impliqués. Ainsi, l'herpesvirus humain de type 8 (HHV8) contient un gène codant pour une protéine similaire à une CK appelée vMIP-II (viral macrophage inflammatory protein II) puissant antagoniste de CXCR4³⁷⁴. Par ailleurs, une augmentation de l'expression de ACKR3 et de CXCL12 dans un certain nombre de cancers provoqués par des virus tels que HHV-8, le papillomavirus humain (HPV) ou le virus d'Epstein-Barr (EBV) a été associée à la promotion de la survie, la prolifération et l'adhésion cellulaire^{375,376}.

(2) Syndrome WHIM

Le syndrome WHIM (Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, Myelokathexis) est une maladie génétique héréditaire à transmission autosomique dominante liée à une mutation dans la séquence de *Cxcr4* associée à une troncation de la partie C-terminale du récepteur entraînant ainsi un gain de fonction de CXCR4 en réponse à CXCL12³⁷⁷. Ce syndrome est caractérisé par une susceptibilité sélective et chronique à l'infection par le Papillomavirus (W, "Warts"), une hypogammaglobulinémie (H), des infections bactériennes à répétition (I) et une neutropénie associée à une rétention anormale de neutrophiles matures dans la moelle osseuse (M, "Myelokathexis"). Ce syndrome est hétérogène par ses manifestations cliniques et ses bases génétiques. En effet, il existe deux formes de ce syndrome : une première, présentant une mutation dans un allèle de *Cxcr4* qui aboutit à une délétion du domaine C-terminal de la protéine (*Cxcr4*^{wt/1013}) associée à la perte des sites de phosphorylation entraînant ainsi une diminution de la désensibilisation de CXCR4³⁷⁸⁻³⁸⁰; et une seconde, caractérisée par un génotype sauvage de *Cxcr4* (*Cxcr4*^{wt/wt})³⁸¹. Malgré cette hétérogénéité génétique, il a été observé dans les cellules des patients un gain de fonction de CXCR4 qui se manifeste par une activation accrue et soutenue du récepteur qui se traduit par un défaut de désensibilisation et d'internalisation de CXCR4. Chez les patients porteurs d'une mutation de CXCR4 (*Cxcr4*^{wt/1013}) ces défauts sont associés à une augmentation de l'activité de la protéine G α i et de la signalisation β -arrestine³⁸². Un défaut d'expression de la kinase GRK3 pouvant expliquer la perte de phosphorylation et le défaut de désensibilisation de CXCR4 a été mis en évidence les patients présentant un génotype sauvage de *Cxcr4* (*Cxcr4*^{wt/wt})³⁸⁰. Les anomalies observées chez les patients ont été retrouvées

chez les souris *Cxcr4*⁺¹⁰¹³ modélisant la pathologie, associées à une altération de la thymopoïèse et du développement des lymphocytes B³⁸³.

(3) CXCL12/CXCR4/ACKR3 dans le cancer

En raison de son expression dans de nombreux type de cellules cancéreuses, le rôle de l'axe CXCL12-CXCR4/CXCR7 dans différents cancers a été étudié de près^{321,384}. Ainsi, l'activation de cet axe permet la régulation de la migration, prolifération des cellules mais également l'angiogenèse tumorale et l'induction de métastases. L'expression de CXCL12 et plus particulièrement de CXCL12 γ est liée à une augmentation de la dissémination métastatique vers la moelle et la cavité pleurale dans le cancer du sein²⁹⁶. L'expression de ACKR3 et CXCR4 est augmentée dans les cancers du foie, du colon, du sein, du pancréas, de la prostate ou des ovaires ; cette augmentation est bien souvent associée à une forme agressive de cancer et est corrélée avec la taille de la tumeur, l'état de dissémination métastatique et le mauvais pronostic de survie du patient^{362,385-387}. En particulier, l'expression de ACKR3 et/ou CXCR4 entraîne une augmentation de la mobilité des cellules tumorales *via* une induction d'expression de l'EGFR et la MMP9^{388,389}. La régulation de ACKR3 par l'IL-8 promeut la prolifération cellulaire et la croissance des tumeurs *via* la signalisation EGFR³⁹⁰. Cette expression contribue aussi directement à la résistance des cellules, en limitant leur apoptose par l'expression de BCL-2 *via* l'activation de ERK en aval de CXCR4 et ACKR3³⁹¹.

Inversement, l'inhibition de CXCR4 ou ACKR3 permet de renforcer l'effet du traitement par chimiothérapie dans certains cancer, suggérant que CXCR4 et ACKR3 participent à la résistance aux traitements^{392,393}. Enfin, l'expression différentielle ou concomitante de CXCR4 et ACKR3 peut informer sur les sites de progression métastatique de certaines tumeurs cérébrales. Une expression de CXCR4 favorisera une diffusion de neuroblastome vers le foie ou les poumons, ACKR3 entrainera une diffusion vers le foie ou les glandes surrénales tandis qu'une expression concomitante de CXCR4 et ACKR3 entraînera plutôt une invasion de la moelle³⁹⁴.

Dans le cancer colorectal, CXCL12, CXCR4 et ACKR3 sont impliqués dans l'angiogenèse tumorale mais ont des effets potentiellement contradictoires. En effet, si le blocage de CXCL12 augmente l'angiogenèse tumorale lors de métastase vers le foie, le blocage de CXCR4 ou ACKR3 réduit la croissance tumorale, suggérant une contribution des autres ligands de CXCR4 et ACKR3³⁹⁵.

Par ailleurs, CXCR4 et ACKR3 agissent directement sur l'environnement de la tumeur (Figure 27). Ils contribuent à la régulation de l'inflammation en recrutant des lymphocytes T régulateurs anti-inflammatoires³⁹⁶ ou des macrophages aux propriétés pro-angiogéniques³³⁵. CXCR4 améliore la survie des cellules myéloïdes suppressives entraînant un effet immunomodulateur notamment en régulant les populations de lymphocytes T cytotoxiques³⁹⁷.

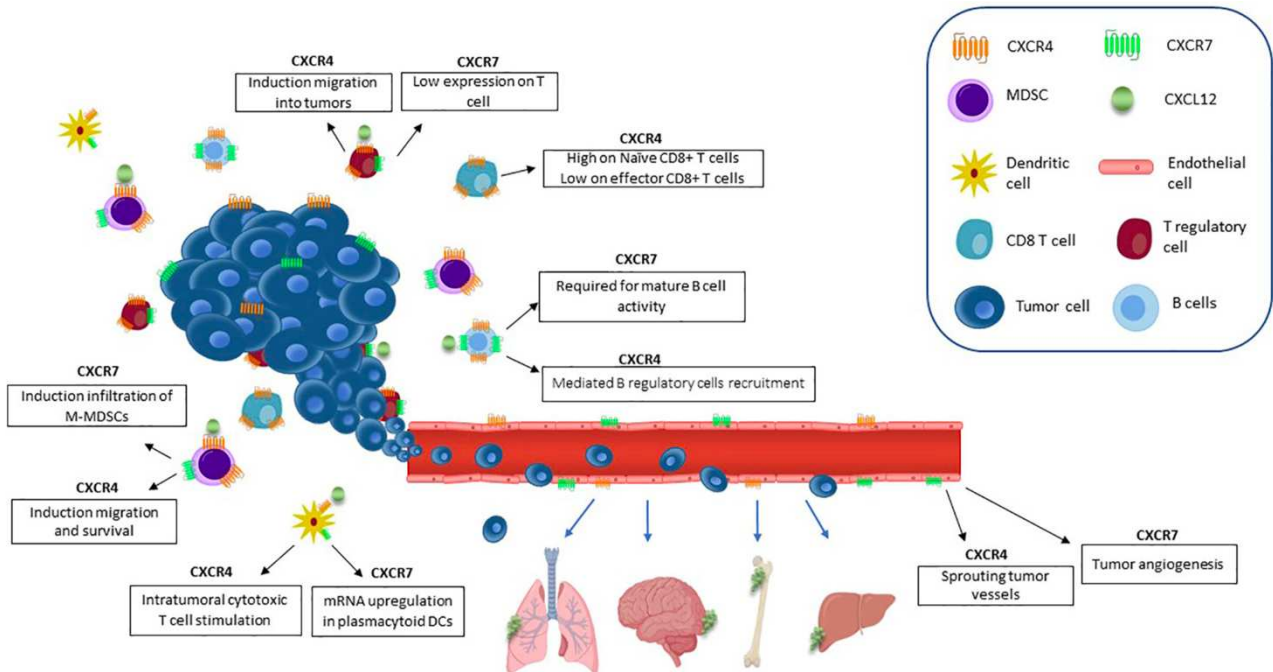


Figure 28 L'axe CXCL12/CXCR4-ACKR3 dans le microenvironnement tumoral.

CXCL12 est responsable du recrutement de populations de cellules suppressives au sein de la tumeur. CXCL12 induit des changements de perméabilité vasculaire et améliore la migration intra tumorale. L'expression de ACKR3 par certaines cellules endothéliales promeut l'angiogenèse *via* la sécrétion de facteurs angiogéniques tels que le VEGF. CXCR4 et ACKR3 induisent la migration et survie des cellules myéloïdes suppressives (MDSCs). CXCR4 permet le recrutement de lymphocytes B et T régulateurs et ACKR3 est nécessaire à la différenciation des lymphocytes B. Les cellules dendritiques expriment également CXCR4 et ACKR3, leur permettant de stimuler les lymphocytes T. D'après *Santagata et al., Front. Oncol., 2021*.

L'axe CXCL12-CXCR4/ACKR3 intervient donc à de nombreux niveaux du développement tumoral, qu'il s'agisse du développement de la tumeur directement, de la modulation de l'inflammation environnante ou de l'architecture de la vascularisation autour de la tumeur. Le rôle de ACKR3 dans le développement tumoral semble clair, bien que les mécanismes d'actions restent partiellement inconnus au niveau moléculaire. Il en va de même pour le rôle qu'occupe ACKR3 au niveau de la domiciliation et de la mobilisation des cellules souches cancéreuses³⁹⁸.

(4) Maladies inflammatoires

Il a été démontré que les taux de CXCL12 dans le liquide synovial étaient directement liés à la sévérité de l'atteinte structurelle chez les patients souffrant d'ostéoarthrite du genou³⁹⁹. De plus, CXCL12 induit la synthèse de collagène de type I et la prolifération des ostéoblastes issus de patients souffrant d'ostéoarthrite. Il apparaît également que l'expression de CXCL13 est

augmentée dans ces cellules, et que celle de CXCR4 est diminuée⁴⁰⁰. CXCL12 est également impliqué dans l'arthrite rhumatoïde où une augmentation de sécrétion de CXCL12 et notamment de l'isoforme CXCL12 γ par les synoviocytes au niveau de l'endothélium atteint entraîne une angiogenèse et une inflammation soutenue notamment en contribuant à l'accumulation de lymphocytes T CD4⁺CXCR4⁺ dans le liquide synovial⁴⁰¹⁻⁴⁰³. En particulier, CXCL12 participe à l'inflammation pulmonaire dans le cadre d'hyperréactivité des voies respiratoires telles que l'asthme ou les allergies affectant les voies respiratoires. L'expression pulmonaire de CXCL12 est augmentée dans des modèles d'atteinte pulmonaire (pneumopathie induite par LPS ou par instillation d'ovalbumine) et est associée au recrutement de neutrophiles et éosinophiles au niveau des lésions^{404,405}.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, essentiellement représentées par la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (RCH) sont liées à un déséquilibre de recrutement des cellules immunitaires⁴⁰⁶. Dans ce contexte, il a été rapporté une augmentation de l'expression de CXCL12 β au niveau de l'épithélium endommagé sans changement d'expression des autres isoformes, une augmentation d'expression de CXCR4 dans l'épithélium et au niveau des lymphocytes T infiltrant le tissu et enfin une augmentation de ACKR3 dans les lymphocytes T circulants uniquement^{407,408}.

(5) Pathologies fibrotiques

Dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par administration de bléomycine, CXCL12 et CXCR4 apparaissent nécessaires au recrutement de fibrocytes CD45⁺CXCR4⁺Col11⁺⁴⁰⁹. De plus, CXCL12 promeut la prolifération et la migration de fibroblastes pulmonaires primaires humains en culture⁴¹⁰, et l'inhibition de CXCR4 par l'AMD3100 atténue les effets délétères associés. Enfin, les patients souffrant de fibrose pulmonaire idiopathique présentent une infiltration augmentée de cellules CXCR4⁺ mais il s'agit de cellules épithéliales et non de cellules immunitaires⁴¹¹. Cela suggère une contribution de CXCL12 et CXCR4 *via* les fibroblastes et fibrocytes plutôt qu'une contribution inflammatoire dans ce contexte. De plus, ACKR3 aurait un effet plutôt protecteur dans ce contexte, en limitant la transition des cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses induite par le TGF β et limitant ainsi le dépôt de collagène dans le tissu⁴¹². ACKR3 est également exprimé à la surface des cellules endothéliales pulmonaires dans des conditions d'homéostasie et son expression diminue en condition pathologique. L'administration d'un agoniste de ACKR3, le TC14012, limite la fibrose pulmonaire et augmente la réparation⁴¹³.

CXCL12 est également impliqué dans la fibrose hépatique. Les cellules étoilées du foie sont des cellules périvasculaires et précurseurs des myofibroblastes. Elles contribuent au développement de la fibrose hépatique et sont partiellement responsables de l'infiltration et l'activation de macrophages ainsi que de l'angiogenèse pathologique à travers leur sécrétion de CXCL12⁴¹⁴. Elles peuvent également se contracter en réponse à une sécrétion de CXCL12, contribuant ainsi au développement de la fibrose hépatique et de l'hypertension portale associée⁴¹⁵. Par ailleurs, des travaux de Rafii *et coll.* indiquent une expression différentielle de ACKR3 et CXCR4. En effet, l'expression augmentée d'ACKR3 est inversement proportionnelle à celle de CXCR4 dans les cellules endothéliales sinusoidales du foie (LSECs) après injection de CCL₄ ou ligature de la voie biliaire, deux modèles d'atteintes hépatiques sévères⁴¹⁶. Il existe une coopération entre CXCR4 et ACKR3 dans les LSECs. Après une lésion hépatique aiguë, l'activation de la voie ACKR3-Id1 dans les LSEC stimule la production de facteurs angiocrines. En revanche, les blessures chroniques provoquent la suractivation de FGFR1 dans les LSEC qui perturbe la voie CXCR7-Id1 et favorise une réponse angiocrine pro-fibrotique induite par CXCR4, provoquant ainsi la fibrose du foie⁴¹⁶.

CXCL12 est fortement exprimé par les fibroblastes, en particulier les fibroblastes dermiques. Ainsi, dans un contexte de brûlure cutanée, l'expression de CXCL12 est fortement augmentée dans les fibroblastes, ce qui conduit au recrutement dans le tissu lésé de progéniteurs CD14⁺CXCR4⁺ qui vont se différencier en fibrocytes et myofibroblastes, contribuant à la formation et au développement d'une cicatrice hypertrophique⁴¹⁷. Les mêmes observations ont été faites dans des lésions cutanées induites par les radiations, où un blocage de CXCR4 par l'AMD3100 présente des effets bénéfiques et limite la fibrose⁴¹⁸. Une étude récente comparant des fibroblastes primaires humains issus de cicatrice hypertrophique (HTS) et de sténose laryngotrachéale (LTS) montre qu'ACKR3 est plus exprimé dans les fibroblastes LTS, et que ces derniers prolifèrent et migrent plus rapidement que les fibroblastes HTS⁴¹⁹. Enfin, l'expression de ACKR3 est positivement corrélée avec la présence et la sévérité des lésions cutanées associées aux carcinome spinocellulaire et au sarcome de Kaposi^{420,421}.

(6) Pathologies d'origine ischémiques

L'expression de CXCL12 est augmentée en conditions hypoxiques, qu'il s'agisse d'une ischémie tumorale liée au développement de la tumeur ou d'une ischémie pathologique liée à une obstruction vasculaire. Sur le plan mécanistique, l'expression de CXCL12 est régulée par le facteur de transcription HIF-1 et est liée à la sévérité de l'ischémie⁴²². Ainsi, la contribution de CXCL12 a été étudiée dans le cadre de l'atteinte ischémique de différents tissus et organes.

- L'accident vasculaire cérébral

L'ischémie cérébrale ou AVC entraîne le recrutement d'un grand nombre de types cellulaires sur le site de l'ischémie. CXCL12 est exprimé par la majorité des cellules du système nerveux central et son expression est augmentée à la suite d'un AVC en périphérie de la zone atteinte. CXCL12 permet notamment le recrutement au sein de la zone ischémique de cellules progénitrices de la moelle *via* CXCR4, contribuant ainsi à l'inflammation et à l'angiogenèse⁴²³⁻⁴²⁵. En particulier, l'expression des isoformes CXCL12 α et CXCL12 β permet le recrutement de populations différentes, CXCL12 α interagissant plutôt avec les neurones et CXCL12 β permettant le recrutement leucocytaire⁴²⁶. La surexpression de CXCL12 par thérapie génique présente des effets protecteurs et améliore la réparation⁴²⁷. Suite à l'ischémie, ACKR3 est également plus exprimé en bordure de la zone atteinte chez l'Homme comme la souris mais CXCL12 module la migration *via* CXCR4 et contrôle des fonctions neuronales et vasculaires *via* ACKR3^{428,429}. Les différentes expressions spatiales peuvent aussi s'expliquer l'impact qu'exerce ACKR3 sur la régulation du gradient de CXCL12 pour permettre le recrutement adéquat des progéniteurs CXCR4⁺ au bon endroit.

- Ischémie des membres inférieurs

En raison de son implication dans le maintien et la mobilisation des cellules progénitrices endothéliales, CXCL12 a également été étudié dans des modèles ischémie du membre inférieur, modèle entre autres utilisé pour étudier l'angiogenèse et la revascularisation. Chez des patients souffrant d'ischémie du membre inférieur, il a été montré que l'ischémie aiguë est associée à une augmentation de l'expression de CXCL12, VEGF et CXCR4 alors qu'une ischémie chronique est associée à leur diminution⁴³⁰. L'augmentation d'expression de CXCL12 par l'utilisation d'un plasmide ou l'injection de fibroblastes surexprimant CXCL12 au niveau de la patte ischémique après ligature de l'artère fémorale chez la souris induit une amélioration de la néovascularisation associée au recrutement accru de cellules progénitrices endothéliales (CPEs) ainsi que la production de NO. Ces effets sont médiés par les voies VEGF et eNOS^{431,432}. L'utilisation de CPEs prétraitées avec CXCL12 potentialise d'autant plus leur capacités à promouvoir l'angiogenèse⁴³³.

Le blocage de CXCR4 par l'AMD3100 permet une revascularisation plus rapide du membre ischémique en facilitant la mobilisation des CPEs de la moelle osseuse⁴³⁴. Les CPEs de souris diabétiques présentent une expression de ACKR3 diminuée et une capacité de formation de tubes vasculaires réduite. Cette perte de fonction est récupérée par la surexpression de ACKR3 dans ces mêmes cellules. Ainsi, l'expression de ACKR3 et la signalisation ACKR3/CXCL12

permet aux CPEs de mieux résister au stress oxydatif et d'améliorer leur potentiel angiogénique dans le contexte de l'ischémie du membre inférieur liée au diabète⁴³⁵. De même, l'absence d'ACKR3 au niveau des cellules endothéliales diminue la revascularisation post-ischémique⁴³⁶. Enfin, des travaux antérieurs du laboratoire ont permis de montrer le rôle essentiel des interactions CXCL12/HS dans un modèle expérimental d'ischémie des membres inférieurs. Il a été montré dans un modèle murin de CXCL12 incapable d'interagir avec les HS, le rôle critique des interactions CXCL12/HS dans la revascularisation post-ischémique. De plus, cette étude montre que l'injection de CXCL12 γ dans le muscle ischémique permet une revascularisation plus importante que celle induite par CXCL12 α ²⁶⁴.

Partie V : L'axe CXCL12-CXCR4/ACKR3 dans l'infarctus du myocarde

CXCL12, CXCR4 et ACKR3, fortement impliqués dans un certain nombre de pathologies ischémiques, sont exprimés au sein d'une grande variété de cellules cardiaques. CXCL12 α et CXCL12 γ sont exprimés dans les cardiomyocytes, fibroblastes et cellules endothéliales^{430,437,438}. A la suite d'un IM, il y a une augmentation massive de CXCL12 α dans le myocarde infarci dû à l'hypoxie. De plus, de nombreuses études d'association de polymorphisme (GWAS) et de risque d'IM chez l'Homme soulignent le rôle important de l'axe CXCL12 α /CXCR4 dans l'IM⁴³⁹. Les souris dont les gènes *Cxcl12*, *Cxcr4* et *Ackr3* ont été invalidés (*Cxcl12*^{-/-}, *Cxcr4*^{-/-} et *Ackr3*^{-/-}) présentent toutes un phénotype létal avec des défauts majeurs du développement du système cardio-vasculaire^{267,268,339}. Ainsi, tous ces éléments témoignent de rôle important de cette CK et de ses récepteurs dans l'IM.

A. Mobilisation et recrutement des cellules inflammatoires et progénitrices

Il est connu que le recrutement des cellules de la moelle osseuse participe à la réparation du tissu cardiaque à la suite d'un IM⁴⁴⁰. CXCL12 est nécessaire et permet la chimioattraction et mobilisation des cellules progénitrices CD34⁺ chez l'Homme⁴⁴¹ et les interactions CXCL12-CXCR4 sont cruciales dans le maintien des cellules progénitrices CXCR4⁺ dans la moelle osseuse et leur libération vers la circulation¹⁸⁸.

Il est avéré que l'expression de CXCL12 augmente après l'IM, avec une augmentation du taux plasmatique circulant chez des patients avec un IM²⁹¹ comme chez la souris, mais également une augmentation de l'expression au niveau du tissu cardiaque⁴⁴². L'expression augmentée de CXCL12 dans le myocarde infarci induit donc le recrutement, la survie et la prolifération de cellules souches contribuant ainsi à la réparation cardiaque⁴⁴³.

L'injection de CXCL12 α présente des effets bénéfiques : amélioration de la fonction cardiaque, réduction de la taille d'IM, promotion de l'angiogenèse. L'effet de CXCL12 α passe autant par le recrutement de nouveaux progéniteurs que par la protection du tissu⁴⁴⁴. En culture, la stimulation par CXCL12 α de cellules endothéliales ou cardiomyocytes entraîne une activation de la voie AKT et une sécrétion de VEGF, mais il n'y a pas d'effet sur les fibroblastes⁴³⁷. Inversement, le blocage de CXCL12 inhibe l'angiogenèse et le processus de réparation tissulaire⁴⁴⁵. De même, CXCL12 qui est positivement régulé par l'apoptose dans les plaques d'athérosclérose, se lie aux plaquettes et permet également le recrutement de cellules

progénitrices des CMLs CXCR4⁺, ayant également un rôle protecteur en limitant le développement des lésions⁴⁴⁶.

B. Effet direct sur les cardiomyocytes

S'il présente un effet protecteur à faible et moyenne dose, CXCL12 α induit l'apoptose des cardiomyocytes selon un mécanisme médié par TNF- α et indépendant du stress oxydatif lorsqu'il est exprimé à très forte dose⁴⁴⁷. Cela pourrait faire le lien avec l'apoptose constatée dans l'hypoxie, contexte où CXCL12 est fortement augmenté. Il a également été montré que seule la forme monomérique présentait un caractère de cardioprotection, expliquant probablement les résultats obtenus décrits plus haut⁴⁴⁸.

Par ailleurs, l'inactivation de CXCL12 dans les cardiomyocytes n'impacte pas la fonction cardiaque basale, mais présente un effet protecteur en limitant la dilatation ventriculaire après l'IM⁴³⁸. L'effet inverse est observé dans un modèle de rat transgénique présentant une surexpression de CXCL12 dans les cardiomyocytes. La surexpression de CXCL12 dans les cardiomyocytes corrèle avec l'intensité de la fibrose interstitielle et du recrutement des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ Th1, connus pour contribuer à l'aggravation de l'inflammation et à l'augmentation de la fibrose *via* l'inhibition des métalloprotéinases^{449,450}. Ainsi, l'expression de CXCL12 par les cardiomyocytes pourrait contribuer à la régulation de la migration de ces lymphocytes dans le myocarde ischémique.

CXCR4 et ACKR3 jouent également un rôle dans le recrutement ou la différenciation des progéniteurs cardiaques (CSCs, cardiac stem cells) et des hiPSC-CM (cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites). Les CSCs expriment CXCR4 et ACKR3 et leur expression et coopération est nécessaire à la régulation de la migration des cellules. La stimulation par CXCL12 induit l'activation de CXCR4 et ACKR3 en activant respectivement les voies Mek/Erk et PI3K/Akt, avec des interactions entre les deux voies de signalisation. En particulier une induction de Raf-1 par phospho-AKT, entraîne un blocage de la voie ERK associée à CXCR4 et donc une inhibition de la migration⁴⁵¹. Par ailleurs, CXCR4 et ACKR3 sont exprimés au cours de la différenciation des hiPSC en cardiomyocytes. L'extinction de *Cxcr4* abolit l'expression membranaire d'ACKR3 suggérant une contribution de CXCR4 dans le trafficking membranaire de ACKR3. Tandis que l'extinction de *Cxcr4* retarde le début de la contraction spontanée des cellules, celle d'*Ackr3* augmente la force de contraction. L'extinction de l'un ou l'autre entraîne des retards de différenciation ainsi que des altérations de transport

du calcium et de réponse bêta-adrénergique. Cela suggère deux rôles différents mais nécessaire de CXCR4 et ACKR3 au cours de la cardiogenèse⁴⁵².

C. La dualité de la contribution de CXCR4

A ce jour, les études analysant le rôle de l'axe CXCL12/CXCR4 dans l'IM ont fait état d'un rôle cardioprotecteur mais aussi délétère de CXCR4 sur la fonction et le remodelage cardiaque post-ischémique⁴³⁹. L'expression de CXCR4 dans les cardiomyocytes ne contribue ni au remodelage ni au recrutement des CSMs, mais l'expression ventriculaire de CXCL12 semblerait corrélée à l'expression de CXCR4 dans les cardiomyocytes⁴⁵³. Dans un modèle d'expression diminuée de CXCR4, les souris hétérozygotes *Cxcr4*^{+/-}, la structure cardiaque est préservée avec une limitation de la nécrose et de la désorganisation structurelle des cardiomyocytes. Néanmoins, ces animaux *Cxcr4*^{+/-} présentent des défauts de vascularisation à l'état basal et après l'IM⁴⁵⁴. Ces animaux présentent une inflammation plus réduite, avec un enrichissement des cellules GR-1^{lo} (anti-inflammatoires, réparateur et associé à la sécrétion de collagène) par rapport au GR-1^{hi} (pro-inflammatoires et délétères) ainsi qu'une accumulation de lipides et plus particulièrement de phosphatidylsérine pour lesquels il a été démontré un effet protecteur sur les cardiomyocytes⁴⁵⁵. Cela suggère un rôle double de CXCR4, avec une contribution nécessaire au bon développement vasculaire mais également un effet dans le recrutement de cellules immunitaires pro-inflammatoires.

Le blocage de CXCR4 par l'AMD3100 présente aussi un effet ambivalent. En effet, une administration aiguë d'AMD3100 présente des effets bénéfiques mais une infusion continue est délétère, avec une hypertrophie ventriculaire exacerbée et une forte diminution du recrutement des progéniteurs endothéliaux⁴⁵⁶. Dans le cas d'un blocage aigu de CXCR4, on constate une préservation de la fonction cardiaque, une limitation de l'apoptose et de la fibrose. L'AMD3100 permet également d'améliorer la mobilisation et le recrutement de cellules CXCR4⁺ et de CPEs depuis la moelle osseuse après IM mais n'est pas suffisant pour induire leur mobilisation à l'état basal, suggérant l'intervention d'autres facteurs⁴⁵⁷. Une étude plus détaillée indique que l'inhibition de CXCR4 induit une expression de eNOS dans la moelle osseuse. Cette expression est nécessaire au recrutement dans le cœur de cellules progénitrices endothéliales exprimant eNOS mais ne module pas le recrutement des cellules CXCR4⁺. Si l'expression de eNOS par ces CPEs n'influe pas sur leur recrutement dans le tissu cardiaque, elle est nécessaire pour la réparation cardiaque⁴⁵⁸. Par ailleurs, il a été démontré que le blocage de CXCR4 par un autre antagoniste de CXCR4, POL5551, améliore la fonction cardiaque en stimulant l'angiogenèse et

réduisant la taille de l'IM *via* la mobilisation et l'activation des lymphocytes T régulateurs d'origine splénique⁴⁵⁹ Enfin, une surexpression totale de CXCR4 par l'utilisation d'adénovirus est délétère et associée à une apoptose accrue, une hypertrophie ventriculaire et une inflammation plus importante. Ces effets sont abolis par l'AMD3100⁴⁶⁰.

D. Contributions d'ACKR3

Au niveau du cœur, ACKR3 est le récepteur à 7 domaines transmembranaires le plus exprimé, avec une expression dans les cardiomyocytes, les fibroblastes, les cellules endothéliales, les CMLs ainsi que certaines cellules inflammatoires⁴⁶¹.

L'ablation constitutive de ACKR3 dans l'endothélium (modèle *Tie2-CRE-Ackr3*) est délétère avec une mortalité périnatale importante et des défauts de développement du système cardiovasculaire similaires à ceux observés dans les modèles *Ackr3*^{-/-} totaux³³⁹. Dans un autre modèle d'inactivation d'ACKR3 inducible dans l'endothélium (modèle *Cxcr7^{fl/fl}Cdh5-Cre*), on observe après IM une surmortalité, une fonction cardiaque dégradée associée à une taille d'IM augmentée et une angiogenèse réduite. Inversement, la surexpression d'ACKR3 *via* un adénovirus offre une protection cardiaque en préservant la fonction cardiaque et en réduisant la taille d'IM. L'activation de ACKR3 par l'agoniste TC14012 *in vivo* réduit elle aussi la taille d'IM suggérant un rôle de l'activation d'ACKR3 dans ces processus⁴³⁶. Ces effets observés *in vivo* sont compatibles avec ceux observés *in vitro* concernant l'activation d'ACKR3 et ses conséquences fonctionnelles sur l'angiogenèse. En effet, l'activation d'ACKR3 par CXCL12 ou le TC14012 promeut la prolifération et l'angiogenèse de cellules endothéliales murines *via* l'activation des voies ERK et PI3K/Akt⁴³⁶. Ces résultats sur le rôle pivot d'ACKR3 dans l'angiogenèse sont également confortés par des résultats montrant que CXCL12 et le TC14012 stimulent l'angiogenèse de manière ACKR3-dépendante *in vitro* et *in vivo* *via* l'activation des PI3K/Akt et inhibent l'apoptose des cellules endothéliales^{462,463}. De plus, il a été montré que l'activation d'ACKR3 *in vivo* *via* l'injection du TC14012 après l'IM, préserve la fonction cardiaque, en stimulant l'angiogenèse et en limitant la taille d'IM⁴⁶³.

Dans un modèle expérimental d'IM chez des souris invalidées pour *Cxcl12* dans les CMLs (SM22CRE-*Cxcl12^{lox/lox}*), on observe des retards de croissance ainsi que des défauts de développement du système cardiovasculaire similaires à ceux décrits dans les modèles *Cxcl12*^{-/-}⁴⁶⁴. Les animaux développent une altération de la fonction cardiaque associée à une hypertrophie cardiaque progressive avec une fibrose cardiaque interstitielle et périvasculaire augmentée. Une altération de la structure des artères, avec des artères dilatées aux parois plus

finies, est aussi observée. L'analyse transcriptomique a révélé l'activation de mécanismes associés à l'hypertrophie cardiaque comme la synthèse de collagène et la réorganisation de la matrice extracellulaire. Contrairement à CXCR4, il a été observé une diminution de l'expression d'ACKR3 dans les cellules endothéliales des artères coronaires ainsi qu'une diminution des voies de signalisation AKT et ERK1/2 dans ce modèle. De manière intéressante, il a été montré que l'activation d'ACKR3 dans ce modèle SM22CRE-*Cxcl12*^{flox/flox} atténuait les effets délétères observés et restaurait une activation des voies ERK, suggérant que l'activation d'ACKR3 permet d'atténuer la progression de l'hypertrophie cardiaque *via* l'activation des voies de signalisation ERK⁴⁶⁴.

Il a été démontré que ACKR3 est exprimé par les macrophages de type M1 mais pas M2 sans modulation d'expression de CXCR3 ou CXCR4 au cours de leur différenciation à la fois dans des modèles de différenciation *in vitro* ou *in situ*^{465,466}. Dans ces macrophages, la chimiotaxie et production d'IL-1 β et IL-6 est ACKR3-dépendante. Il y a une activation des voies ACKR3-dépendantes (ERK) mais pas CXCR4-dépendantes (pas de MAPK ou JNK). *In vivo*, l'inhibition d'ACKR3 par l'utilisation d'un adénovirus codant pour un shARN dirigé contre ACKR3 préserve la fonction cardiaque. Cet effet bénéfique est associé à une diminution de la taille d'IM et du recrutement de macrophages de type M1 dans le cœur avec une réduction d'expression de l'IL-1 β et de l'IL-6⁴⁶⁶.

D'autre part, la délétion spécifique de ACKR3 dans les cardiomyocytes entraîne une dilatation excessive du cœur et une dysfonction systolique majeure après IM. En revanche, il semblerait que la délétion de ACKR3 dans les fibroblastes (modèle *Col1a2-CreERT2 x Cxcr7flox/flox*) n'entraîne pas d'effet majeur sur la fonction cardiaque après IM sans que l'on n'ait de données précises sur les éléments histologiques associés⁴⁶¹.

Certaines études peuvent parfois indiquer des résultats différents, voire contradictoires. Cela peut en partie s'expliquer par la multitude de réponse des différents types cellulaires à CXCL12, l'existence de plusieurs isoformes et l'importance des facteurs dose et temps.

E. Le potentiel thérapeutique de l'axe CXCL12-CXCR4/ACKR3 dans l'infarctus du myocarde

En raison du rôle central de CXCL12 et ses récepteurs dans le développement cardiaque et le remodelage post-IM, de nombreuses études ont été réalisées pour déterminer son potentiel thérapeutique dans l'IM.

(1) Approches expérimentales

Tous les travaux visant à augmenter l'expression de CXCL12 α par un apport exogène ou en stimulant la sécrétion endogène de CXCL12 α , qu'il s'agisse de protéine recombinante, de vecteur viral, de plasmide ou de stratégies cellulaires basées sur la modulation de la sécrétion de CXCL12 par certaines cellules, indiquent un effet bénéfique avec une fonction cardiaque préservée, une angiogenèse accrue et une limitation de l'apoptose et de la fibrose. Inversement, une neutralisation de CXCL12 α *via* un anticorps neutralisant présente les effets inverses⁴⁴⁵.

Ainsi, une administration systémique, intra-cardiaque ou continue *via* un hydrogel, avant ou après IM, limite l'étendue de la cicatrice, protège les cardiomyocytes de l'apoptose, augmente l'angiogenèse, préserve la fonction cardiaque, et atténue l'hypertrophie et la dilatation cardiaque dans des modèles expérimentaux d'IM chez la souris, le rat et le mouton^{437,467,468}. De même, l'administration intra-cardiaque de particules adénovirales pour surexprimer CXCL12 α entraîne un recrutement de cellules souches depuis la moelle et préserve la fonction cardiaque tout en limitant la fibrose^{457,469}. Une dernière approche est l'injection systémique ou tissulaire de cellules modifiées pour surexprimer CXCL12 α à l'aide de lentivirus, plasmides ou adénovirus. Ainsi, l'injection systémique de cellules souches mésenchymateuses surexprimant CXCL12 α permet de limiter les dommages cardiaques tout en améliorant la revascularisation²⁸⁵. L'injection en bordure de l'IM de fibroblastes cardiaques ou de myoblastes squelettiques chacun sur-exprimant CXCL12 α améliore la fonction cardiaque et d'améliorer le remodelage post-IM chez le rat^{470,471}.

D'autres études s'intéressent plus à des modulations d'expression ou d'activité du récepteur plutôt que du ligand, Les études se sont toutes focalisées sur CXCR4. Ainsi la surexpression de CXCR4 présente des effets délétères associés à une inflammation et une apoptose non contrôlées conduisant à une cicatrice plus importante et une fonction cardiaque fortement diminuée⁴⁶⁰. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus chez les souris *Cxcr4*^{+/-} qui présentent une fonction et un remodelage cardiaque post-IM améliorés⁴⁵⁴. En revanche, l'inhibition pharmacologique de CXCR4 par l'utilisation de l'antagoniste AMD3100 présente des effets contradictoires en fonction de la cinétique d'inhibition ponctuelle ou chronique. Ainsi, une administration chronique ou une diffusion continue d'AMD3100 présente des effets délétères avec une fibrose augmentée, une dysfonction cardiaque et une réduction de recrutement de CPEs. Inversement, une injection unique d'AMD3100 peu de temps après l'IM

améliore la survie des animaux ainsi que la fonction cardiaque, limite le développement de la cicatrice et de la fibrose et améliore le recrutement des CPEs^{456,472,473}.

(2) Approches thérapeutiques cliniques

Étant donné les effets bénéfiques majoritaires relevés dans les différents protocoles expérimentaux, la modulation de la voie CXCL12-CXCR4 a été mise en œuvre dans le cadre d'essais cliniques.

L'utilisation d'un plasmide codant pour CXCL12 (JVS-100 ou ACRX-100) par voie endomyocardique a validé les critères d'efficacité et d'innocuité en présentant une amélioration de la qualité de vie et du test de marche en six minutes (6MWT) chez des patients ayant souffert d'un IM (NCT01082094)⁴⁷⁴. L'essai randomisé contrôlé de phase II STOP-HF (NCT01643590), incluant des patients souffrant d'insuffisance cardiaque consécutive à un IM et présentant une fraction d'éjection inférieure à 40%, n'a pas montré d'effet significatif global en comparant les patients traités avec le JVS-100 et ceux ayant reçu le placebo. Cependant, une amélioration de la fonction cardiaque chez les patients traités, lorsque l'on ne s'intéresse qu'au tiers présentant initialement la fraction d'éjection la plus basse (LVEF <26%), souligne le potentiel thérapeutique de CXCL12 dans l'IM et l'insuffisance cardiaque qui s'en suit⁴⁷⁵.

L'essai SITAGRAMI (Sitagliptin Plus Granulocyte-colony Stimulating Factor in Acute Myocardial Infarction, NCT00650143) utilisant le G-CSF ainsi qu'un inhibiteur de DPPIV (Sitagliptin) afin de stimuler le recrutement de cellules souches au sein du cœur comme cela a été montré dans des modèles animaux⁴⁷⁶. Malheureusement, si les résultats de l'étude montrent une faisabilité et une sécurité satisfaisante⁴⁷⁷, le traitement se révèle sans effet à 12 mois⁴⁷⁸ et à plus long terme⁴⁷⁹.

L'essai de phase II CATCH-AMI (CXCR4 Antagonism for Cell mobilization and Healing in Acute Myocardial Infarction, NCT01905475) a commencé en 2012. L'objectif était d'utiliser le Balixafortide (POL6326) un antagoniste de CXCR4, déjà employé dans des études pour traiter les formes métastatiques de cancer du sein⁴⁸⁰, pour stimuler le recrutement de cellules souches au niveau du cœur pour en améliorer la fonction. Cette étude a été arrêtée en cours en raison de l'absence d'amélioration significative suffisamment importante par rapport aux standards initialement fixés.

2. Hypothèse et objectifs

L'axe CXCL12/CXCR4/ACKR3 joue un rôle essentiel dans le développement du système cardiovasculaire et module des processus physiopathologiques majeurs tels que l'inflammation, l'angiogenèse ou la fibrose, en particulier dans un contexte d'ischémie tissulaire⁴³⁹. Chez la souris, 3 isoformes de CXCL12 (α , β et γ) ont été identifiées. En plus de la liaison à ses récepteurs, CXCL12 interagit avec les HS de la matrice extracellulaire. Ces interactions CXCL12/HS, contribuent à l'activité biologique de CXCL12 en dictant notamment l'amplitude et l'efficacité de la réponse à la CK^{259,287}. Des travaux antérieurs réalisés au laboratoire ont révélé un rôle essentiel des interactions CXCL12/HS dans la croissance et le remodelage vasculaire post-ischémique dans un modèle expérimental d'ischémie critique du membre inférieur chez une souris exprimant CXCL12 dépourvu de ces sites d'interaction avec les HS (*Cxcl12*^{gagtm/gagtm}). De plus, nous avons montré également que l'isoforme CXCL12 γ , qui présente une affinité accrue pour les HS, possède une efficacité supérieure à celle de CXCL12 α pour initier le processus de revascularisation post-ischémique²⁶⁴. Au cours de l'IM, l'axe CXCL12 α /CXCR4 est rapidement activé et ses effets ont été particulièrement décrits. Ainsi, l'isoforme CXCL12 α *via* CXCR4 régule, en particulier, la survie des cardiomyocytes, l'angiogenèse et le recrutement des cellules inflammatoires. A l'inverse, le rôle de l'isoforme CXCL12 γ reste totalement méconnu.

Ainsi l'ensemble de ces résultats, nous ont amené à penser que CXCL12 γ , isoforme le plus affin pour les HS en raison de sa très longue extrémité C-terminale comportant 4 motifs de liaisons aux HS supplémentaires par rapport à l'isoforme α , pourrait jouer un rôle majeur dans la fonction et le remodelage cardiaque post-IM.

Mon projet de thèse s'est articulé autour de 3 axes principaux :

- évaluer l'importance des interactions CXCL12/HS dans la fonction et remodelage cardiaque post-ischémique.
- déterminer plus spécifiquement le rôle de CXCL12 γ
- analyser la contribution des récepteurs CXCR4 et ACKR3 dans les effets médiés par CXCL12 γ .

3. Résultats

CXCL12 γ isoform controls cardiac remodeling and function after acute myocardial infarction

CXCL12 est la seule CK CXC à subir un épissage alternatif, aboutissant à la formation de 3 isoformes fonctionnelles (α , β , γ) chez la souris¹²⁴. CXCL12 participe à de nombreux processus physiologiques tels que la mobilisation et le recrutement des cellules hématopoïétiques depuis la moelle osseuse⁴⁴¹, la chemoattraction, le trafic et la transmigration des leucocytes^{481,482}. CXCL12 est également impliquée dans de nombreuses cancers, infection virale, maladies inflammatoires, ainsi que les maladies cardiovasculaires⁴⁸³. CXCL12 exerce ses fonctions par sa liaison aux récepteurs CXCR4 et ACKR3^{300,320} et a également la capacité d'interagir avec les GAGs et en particulier les HS¹²⁴. Ces derniers sont des régulateurs critiques de l'activité de CXCL12. Les isoformes de CXCL12 présentent une capacité distincte à interagir avec les HS via leur motif canonique BBXB^{259,286,287}. CXCL12 γ est l'isoforme qui présente l'affinité la plus élevée pour les HS, en raison de la présence de 4 domaines BBXB supplémentaires situés dans sa longue extrémité C-terminale^{259,286}. Des mutations dans ces domaines affectent les interactions CXCL12/HS sans modifier la structure 3D de la CK et ses interactions avec le récepteur^{259,261}. La capacité haptotactique de CXCL12 est d'ailleurs déterminée plutôt par sa capacité d'interaction avec les GAGs⁴⁸⁴. Il a d'ailleurs été montré que CXCL12 γ permettait un meilleur recrutement in vitro de cellules CXCR4⁺ par rapport à CXCL12 α ^{259,286}. Nous avons précédemment révélé un rôle essentiel des interactions CXCL12/HS dans le remodelage vasculaire post-ischémique dans un modèle expérimental d'ischémie critique du membre inférieur chez une souris exprimant CXCL12 dépourvue de ces sites d'interaction avec les HS (*Cxcl12^{gagtm/gagtm}*). De plus, nous avons montré que l'isoforme CXCL12 γ présentait une capacité pro-angiogénique supérieure à l'isoforme CXCL12 α ²⁶⁴. Plus récemment, dans un modèle sévère de lésion du muscle squelettique, l'absence de liaison CXCL12/HS est associée à une persistance de dommages, une augmentation de la fibrose et à l'infiltration de lipides, suggérant un rôle majeur de ces interactions dans la réparation tissulaire²⁶⁵.

Des études sur des modèles expérimentaux d'IM ont montré l'implication de l'axe CXCL12 α /CXCR4/ACKR3 dans la réponse à l'IM⁴³⁹. Ces études ont révélé un rôle cardioprotecteur mais aussi délétère de CXCL12 dans le remodelage cardiaque post-ischémique et se sont concentrées uniquement sur les effets de l'isoforme CXCL12 α . Le rôle des interactions CXCL12/HS et de l'isoforme CXCL12 γ dans la réponse à l'IM était inconnu. Nous

avons donc émis l'hypothèse que les interactions CXCL12/HS et CXCL12 γ pourraient jouer un rôle essentiel dans le remodelage cardiaque post-ischémique.

- **Les ARNm de *Cxcl12* et d'*Ackr3* sont abondamment exprimés dans le cœur de la souris et augmentés de manière transitoire et précoce après IM.**

Dans un premier temps, nous avons analysé les niveaux d'expression des isoformes de *Cxcl12* et de ses récepteurs *Cxcr4* et *Ackr3* dans le cœur avant et après induction d'un IM par ligature permanente de l'artère descendante antérieure gauche. Nous avons observé que les ARNm de *Cxcl12 γ* et *Ackr3* étaient abondamment exprimés dans le cœur sain de la souris. L'IM induit une augmentation transitoire et différentielle des niveaux d'ARNm des isoformes de *Cxcl12* et des récepteurs dans le cœur. L'expression concomitante de *Cxcl12 γ* et d'*Ackr3* dès le premier jour après l'IM suggère un rôle majeur de l'axe CXCL12 γ /ACKR3 dans le myocarde infarci.

- **Les interactions CXCL12 γ /HS jouent un rôle déterminant dans la régulation de la fonction cardiaque et la revascularisation post-ischémique après IM.**

Dans un deuxième temps, nous avons montré chez les souris *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* que la perturbation des interactions CXCL12/HS engendrait une réduction significative de la fonction cardiaque associée à une augmentation de la taille de l'infarctus, une réduction significative de la fibrose et de la vascularisation post-ischémique. Dans un deuxième temps, afin d'analyser la fonction spécifique de CXCL12 γ dans l'IM, nous avons généré un modèle de souris dans lequel le gène *Cxcl12 γ* est dépourvu de ses domaines de liaison aux HS dans sa partie C-terminale (*Cxcl12 γ ^{$\Delta 4/\Delta 4$}*). Nous avons observé un phénotype identique à celui des souris *Cxcl12^{gagtm/gagtm}*. A l'inverse, dans un modèle « gain de fonction » basé sur l'administration sous guidage échocardiographique d'un adénovirus codant pour CXCL12 γ , nous avons montré que l'expression de CXCL12 γ dans le cœur infarci de souris sauvages améliore la fonction cardiaque et promeut l'angiogenèse, et ce de manière HS-dépendant. Enfin, nous avons montré que l'expression exogène de CXCL12 γ dans les souris *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* et *Cxcl12 γ ^{$\Delta 4/\Delta 4$}* corrigeait le phénotype cardiaque délétère observé chez ces souris, démontrant ainsi le rôle critique des interactions CXCL12 γ /HS dans la fonction et le remodelage cardiaque post-IM.

- **L'action de CXCL12 γ dans la revascularisation est indépendante de la réponse immunitaire.**

L'expression augmentée, simultanée et précoce de CXCL12 γ et ACKR3 après induction de l'IM, suggérait un rôle important de cet axe dans la réponse à l'IM. Nous avons ensuite montré que l'activation d'ACKR3 *in vivo*, contrairement à celle de CXCR4, réduisait de manière significative les lésions cardiaques post-ischémiques via une augmentation de la vascularisation post-ischémique, en miroir des phénotype observés chez nos souris mutantes renforçant ainsi notre hypothèse sur le rôle de l'axe CXCL12 γ / ACKR3 dans la réponse à l'IM. Il a été montré que CXCL12 pouvait favoriser la revascularisation post-ischémique via son effet sur la mobilisation et le recrutement de cellules progénitrices et inflammatoires dans le myocarde infarcté^{264,437,454}. L'analyse du profil inflammatoire dans le myocarde infarcté des souris *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* et *Cxcl12 γ ^{$\Delta\Delta/\Delta\Delta$}* , nous a permis d'exclure un rôle des cellules inflammatoires et nous a amené à étudier la contribution des cellules cardiaques résidentes dans les effets médiés par CXCL12 γ .

- **L'activation par CXCL12 γ des fibroblastes cardiaques exprimant ACKR3 induit des effets pro-angiogéniques.**

L'analyse des données de SingleCell-RNAseq de la fraction non-cardiomyocytaire de cœurs ischémiques murins nous a permis d'identifier une sous-population de fibroblastes exprimant *Ackr3* et présentant une signature « angiogénique ». Les fibroblastes cardiaques présentent une grande plasticité phénotypique au cours des phases consécutives à l'IM et dirigent la réponse réparatrice notamment en adoptant un phénotype « angiogénique »⁴⁸⁵. Nous avons émis l'hypothèse que CXCL12 γ pouvait promouvoir la revascularisation post-ischémique au travers l'activation d'ACKR3 dans les fibroblastes cardiaques. L'analyse des milieux conditionnés de fibroblastes cardiaques primaires stimulés avec CXCL12 α ou CXCL12 γ nous a permis de montrer que seule la stimulation avec CXCL12 γ promeut l'angiogenèse *in vitro*. De manière intéressante, l'inhibition d'ACKR3 mais pas celle de CXCR4 abolit les effets induits par le sécrétome des fibroblastes stimulés par CXCL12 γ montrant le rôle de l'axe CXCL12 γ /ACKR3 dans les effets pro-angiogéniques médiés par ces fibroblastes. Enfin, l'analyse détaillée du sécrétome indique que la stimulation par CXCL12 γ module l'expression de plusieurs facteurs pro-angiogéniques.

CXCL12 γ isoform controls cardiac remodeling and function after acute myocardial infarction

Vincent Duval¹, Paul Alayrac¹, Stéphane M. Camus¹, Clément Cochain^{2,3}, Mathilde Lemitre¹, Jose Vilar¹, Philippe Bonnin⁴, Karl Balabanian⁵, Fernando Arenzana-Seisdedos⁶, Jean-Sébastien Silvestre^{1*} and Angélique Levoye^{1,7*}

¹ Université de Paris, PARCC, INSERM, F-75015 Paris, France

² Institute of Experimental Biomedicine, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany

³ Comprehensive Heart Failure Center Würzburg, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany

⁴ Université de Paris, INSERM, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, F-75015 Paris, France

⁵ Université de Paris, INSERM, Institut de Recherche Saint Louis, EMiLy, INSERM U1160, F-75010 Paris, France

⁶ Institut Pasteur, F-75015 Paris, France

⁷ Université Sorbonne Paris Nord, F-93022 Bobigny, France

* Correspondance to : Jean-Sébastien Silvestre, Université de Paris, PARCC, INSERM, F-75015 Paris, France, e-mail : jean-sebastien.silvestre@inserm.fr or Angélique Levoye, Université de Paris, PARCC, INSERM, F-75015 Paris, France and Université Sorbonne Paris Nord, F-93022 Bobigny, France, e-mail : angelique.levoye@inserm.fr

Abstract

The chemokine CXCL12 plays a prominent role in the regulation of cardiac function and remodeling following myocardial infarction. Heparan sulfate (HS) proteoglycans are instrumental components of chemokine-related activities. However, the impact of CXCL12/HS interactions on the healing response within the ischemic myocardium remains unexplored. Here, we show that CXCL12/HS interactions control CXCL12-dependent effect on post-ischemic cardiac function and remodelling. The disruption of these interactions leads to reduction of vascularization and deterioration of cardiac function. The CXCL12 γ isoform harbors an unchallenged affinity for HS due to the presence of four additional HS-binding motifs in the carboxy-terminal domain. Of note, mutant mice, in which the *Cxcl12 γ* gene lacks the supplementary HS binding domains, also show cardiac dysfunction and reduced angiogenic process. Administration of adenovirus expressing CXCL12 γ restores the defective cardiac phenotype. Finally, we reveal that CXCL12 γ directs the pro-angiogenic potential of ACKR3 receptor expressing cardiac fibroblasts. Hence, CXCL12 γ /HS interactions are instrumental in the control of post-ischemic cardiac angiogenesis and function.

Introduction

CXCL12, also known as SDF-1 (Stromal cell Derived Factor-1), is a chemotactic cytokine, belonging to the CXC subgroup of chemokines. CXCL12 is the only CXC chemokine with differential mRNA splicing and six distinct splice variants have been identified in humans (CXCL12 α to ϕ) and three (CXCL12 α to γ) in mice^{1,2}. In addition, CXCL12 is highly conserved with around 90% homology between mice and human at both mRNA and protein levels². Although several isoforms of CXCL12 have been described, most studies focus solely on the effect of CXCL12 α isoform. CXCL12 plays a major role in numerous physiological processes such as the homing and egress of hematopoietic cells towards and from the bone marrow³, the chemoattraction, trafficking and transmigration of leukocytes^{4,5}, and organogenesis^{6,7}. The functions of CXCL12 extend beyond homeostasis, as it is also implicated in tumorigenesis and metastatic spreading in various types of cancer⁸. CXCL12 is entailed in systemic inflammatory diseases such as multiple sclerosis⁹, rheumatoid arthritis where it has pro-inflammatory and pro-angiogenic effects¹⁰ as well as in airway hyper-reactivity through attraction of leukocytes and stimulation of fibrosis and angiogenesis¹¹. CXCL12 is also instrumental in the regulation of tissue remodelling specifically in a context of ischemic tissue injury, including hindlimb, brain or heart¹²⁻¹⁵. CXCL12 fulfils its biological functions by binding to its cognate receptors CXCR4 and CXCR7^{16,17}. CXCR4 and CXCR7 are expressed on many cell types, including hematopoietic cells, inflammatory cells, endothelial cells, and their expression are up-regulated in a variety of pathologic conditions related to inflammation or ischemia¹⁸. In contrast to CXCR4, CXCR7 does not activate heterotrimeric G-proteins. Instead, CXCR7 has been shown to trigger the β -arrestin pathway¹⁹, can act as a scavenger receptor for CXCL12^{20,21} and modulate CXCR4-related functions²². This uncommon signaling explains why CXCR7 was renamed atypical chemokine receptor (ACKR) 3²³.

Mice lacking *Cxcl12* and *Cxcr4* show mild to severe hematopoietic defects, defective neurogenesis and subsequently lethal phenotype^{7,24}. Animal models with *Cxcl12*, *Cxcr4* or *Ackr3* deficiency also exhibit abnormal vascular and cardiac development underlining the value of the CXCL12/CXCR4/ACKR3 system in cardiogenesis^{6,7,25-28}. Of note, CXCR4 and ACKR3 are also essential for the regulation of cardiac remodelling, notably after myocardial infarction²⁹⁻³¹.

Important interaction partners for CXCL12, other than their receptors, are glycosaminoglycans (GAGs) such as heparin and heparan sulfate (HS). GAGs are critical components of the haptotactic activity of chemokines because the chemokine–GAG interaction is indispensable in

the formation of chemokine gradients³². Very often, the spatial proximity or overlapping of both receptor-binding and GAG-binding domain confuse the specific contribution of each domains. Nevertheless, for CXCL12, the clear separation between the receptor-binding domain and the HS-binding site structure allows the determination of their specific contribution to the chemokine-related effects³³. In this line of reasoning, CXCL12 isoforms display distinct ability to interact with GAG which promotes biological effects of different magnitude^{34, 35}. Specifically, CXCL12 β and CXCL12 γ encompass the entire 68 amino acid sequence of CXCL12 α , including the receptor-binding domain and the core HS-binding BBXB domain, which is supplemented with an additional 4 and 30 amino acid C-terminal tail encoding 1 and 4 supplementary BBXB motifs, respectively³⁶. Consequently, while CXCL12 α and CXCL12 β display similar affinities for HS or heparin in the same range of magnitude, the synergistic contribution of the core HS-binding BBXB domain and the 4 additional C-terminal BBXB domain increases CXCL12 γ affinity to HS by around 10-fold^{37, 38}. It was previously reported that charge neutralization within both the core and C-terminal BBXB domains greatly impeded HS-binding ability of CXCL12 without changing neither the 3D structure of the protein nor its receptor-binding affinity^{39, 40}. Hence, the haptotactic ability of CXCL12 is rather determined by its ability to interact with HS than by downstream receptor-associated signalling⁴¹. On the same note, we previously reported that CXCL12 ability to bind GAG was required for activation of post-ischemic revascularization in experimental model of hindlimb ischemia, and that the CXCL12 γ isoform showed higher pro-angiogenic potential when compared to other CXCL12 isoforms¹⁵.

However, the role of CXCL12/HS interactions and that of CXCL12 γ in the regulation of the healing response after myocardial infarction remains unexplored. In the present study, we therefore examined the effects of CXCL12/HS interactions and CXCL12 γ in the ischemic myocardium. We show, for the first time, that CXCL12 γ is a major determinant of HS-dependent effects of CXCL12 and that CXCL12 γ /HS interactions regulate cardiac function and remodelling. We also reveal that CXCL12 γ , likely through ACKR3-related activation of cardiac fibroblasts, fosters angiogenesis, limits adverse ventricular remodelling and improves cardiac function following MI.

Results

***Cxcl12 γ* and *Ackr3* mRNA levels are abundantly expressed in the murine heart and are up-regulated after acute myocardial infarction.**

In order to evaluate the role of Cxcl12 isoforms in cardiac homeostasis, we determined mRNA levels of *Cxcl12* α , β and γ and their receptors, *Cxcr4* and *Ackr3*, in the cardiac tissue of sham-operated animals or mice challenged with permanent ligation of the left anterior descending artery to induce acute myocardial infarction (AMI). *Cxcl12 γ* mRNA was the most abundant *Cxcl12* mRNA isoform in the healthy heart, *Cxcl12 γ* mRNA content being 10- and 100-fold higher than that of *Cxcl12 α* and *Cxcl12 β* , respectively (Fig. 1a). AMI induced a transient, differential and time-dependent up-regulation of *Cxcl12* isoforms in the infarcted heart. In contrast to *Cxcl12 α* and *Cxcl12 β* mRNA levels which peaked at day 5 after the onset of ischemia, *Cxcl12 γ* mRNA levels were up-regulated as early as day 1 after AMI and returned to basal levels by day 3 (Fig. 1b-d). Using RNA *in situ* hybridization assay, we confirmed the upregulation of *Cxcl12 γ* and *Cxcl12 α* mRNA levels in the infarcted myocardium at day 1 and 5 after the induction of AMI, respectively (Fig. 1e).

Regarding Cxcl12 receptors, *Ackr3* expression was superior to that of *Cxcr4* in murine heart as *Ackr3* mRNA levels were 15-fold higher when compared to *Cxcr4* mRNA levels in the cardiac tissue at steady state (Fig. 1f). After AMI, *Cxcr4* mRNA levels were up-regulated by 8.0-, 6.0- and 6.5-fold at 5, 7 and 10 days, respectively (Fig. 1g). In contrast, *Ackr3* mRNA levels were increased by 2.5-fold at day 1 after AMI (Fig. 1h). Together, these results indicate that *Cxcl12 γ* and *Ackr3* mRNA levels are pre-eminent in the healthy heart and are up-regulated as early as day 1 after AMI suggesting a major role for CXCL12 γ /ACKR3 axis in the injured cardiac tissue.

Suppression of CXCL12/HS interactions impairs cardiac function and remodelling after acute myocardial infarction.

We first addressed the role of CXCL12/HS interactions in cardiac function and remodelling after AMI. We used mice carrying *Cxcl12* gene mutations that preclude interactions of all the CXCL12 isoforms with HS (*Cxcl12^{gagtm/gagtm}*)¹⁵. Baseline cardiac function as well as collagen content, capillary density, and cardiomyocyte size were similar in *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* mice and their wild-type (WT) littermates (Supplementary Fig.1 a-d). CXCL12/HS disruption did not impact mice survival following AMI compared to littermate controls (Fig. 2a). Whereas cardiac

function was comparable in sham-operated animals, *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* mice showed a significant reduction in left ventricle ejection fraction after AMI when compared to WT animals (Fig. 2b). These effects were associated with an increase in infarct size (Fig. 2c), a significant reduction in interstitial fibrosis (Fig. 2d) and capillary density (Fig. 2e) without any modifications in cardiomyocyte size (Fig. 2f). Hence, CXCL12/HS interactions play a critical role in cardiac remodeling and function after AMI.

Cxcl12 γ isoform is instrumental in the regulation of cardiac function and remodelling after acute myocardial infarction.

The predominant expression of *Cxcl12 γ* in the heart as well as the critical role of CXCL12/HS interaction in post-ischemic cardiac remodelling prompted us to analyse the specific function of CXCL12 γ in the infarcted myocardium. Indeed, CXCL12 γ is formed by a protein core shared by all CXCL12 isoforms, extended by a highly cationic carboxy-terminal domain that encompass four additional BBXB HS-binding motifs³⁸. As a consequence, CXCL12 γ displays unchallenged potential to interact with HS³⁹. To specifically determine the contribution of CXCL12 γ /HS interactions, we have engineered a new mouse model in which the *Cxcl12 γ* gene lacks the additional HS binding domains within the C-terminal tail (*Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice) (Fig. 3a-b). *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice or littermate controls were then challenged with AMI. In sham-operated *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice, cardiac function, interstitial fibrosis and capillary density were similar to that of WT littermates (Supplementary Fig.1 e-h). The survival rate of the infarcted *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice was not significantly reduced compared to their WT counterparts (Fig. 3c). In the surviving animals, left ventricle ejection fraction was decreased in *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* animals when compared to their WT littermates (Fig. 3d). Additionally, histological analysis revealed reduced interstitial collagen content (Fig. 3f) and capillary density (Fig. 3g) while infarct size (Fig. 3e) and cardiomyocyte size (Fig. 3h) remained unchanged. Together, these results indicate that CXCL12 γ plays a critical role in the regulation of post-ischemic cardiac function and remodelling.

To further substantiate the role of CXCL12 γ in cardiac remodelling, WT mice were injected with adenoviral particles carrying cDNA encoding *Cxcl12 α* (AAV2/9-Cxcl12 α), *Cxcl12 γ* (AAV2/9-Cxcl12 γ), or a control AAV2/9-GFP vector into the myocardium under echocardiographic guidance, two weeks prior the onset of MI (Fig. 4a). To confirm whether viral particles were effectively delivered into the myocardium, we performed immunohistochemical analysis using anti-GFP antibody. Histological analysis indicated the

successful infection of the myocardium with viral particles (Supplementary Fig. 2a). Injection of AAV2/9-Cxcl12 α or AAV2/9-Cxcl12 γ did not impact mice survival following MI compared to that of control mice injected with the AAV2/9-GFP vector (Fig. 4b). Interestingly, overexpression of both *Cxcl12* variants increased cardiac function (Fig. 4c), reduced infarct size (Fig. 4d), interstitial fibrosis (Fig. 4e) and cardiomyocyte size (Fig. 4g). Of note, administration of adenovirus expressing CXCL12 γ improved cardiac capillary density when compared to mice injected with control or CXCL12 α -expressing vectors (Fig. 4f). To support the role of CXCL12 γ /HS interactions, WT mice were also treated with adenoviral particles carrying cDNA encoding *Cxcl12 γ* with mutated HS binding sequences (AAV2/9-Cxcl12 γ mut) (Fig4a). Injection with AAV2/9-Cxcl12 γ mut reduced cardiac function and angiogenesis when compared to that of AAV2/9-Cxcl12 γ (Fig4c-g).

To unravel the link between disruption of CXCL12 γ /HS related signalling and the defective cardiac repair in *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* and *Cxcl12 $\gamma^{\Delta^4/\Delta^4}$* animals, we performed rescue experiments and injected AAV2/9-Cxcl12 γ or AAV2/9-GFP control vector in these mice (Fig. 5a). Injection of AAV2/9-Cxcl12 γ did not significantly impact *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* or *Cxcl12 $\gamma^{\Delta^4/\Delta^4}$* survival following AMI (Fig. 5b and 5h). Interestingly, AAV2/9-Cxcl12 γ injection enhanced left ventricle ejection fraction after AMI in both *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* and *Cxcl12 $\gamma^{\Delta^4/\Delta^4}$* animals compared to mutant mice injected with AAV2/9-GFP control vector (Fig. 5c and 5i). These effects were associated with a reduction in infarct size (Fig. 5d and 5j) and an increase in capillary density (Fig. 5f and 5l). In contrast to *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* mice, only *Cxcl12 $\gamma^{\Delta^4/\Delta^4}$* mice exhibited a significant reduction in collagen content following AAV2/9-Cxcl12 γ injection (Fig. 5e and 5k). AAV2/9-Cxcl12 γ reduced cardiomyocyte size in *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* but not in *Cxcl12 $\gamma^{\Delta^4/\Delta^4}$* animals (Fig. 5g and 5m). To reveal the role of the specific receptor involved in the effect of CXCL12 γ , it was assumed that activation of this receptor should reproduce identical effects on cardiac remodelling and function in our experimental conditions. To underscore the putative involvement of CXCR4 activation, we used *Cxcr4^{1013/wt}* mice with sustained activation of CXCR4 upon CXCL12 binding⁴² and their WT littermates. Nevertheless, CXCR4 gain of function did not impact cardiac function after AMI (Fig. 6a-f). To explore the distinct outcome of ACKR3 activation, WT mice were treated with TC14012, an ACKR3 agonist⁴³ (Fig. 6g). TC14012 treatment did not affect mice survival but induced an increase in left ventricle ejection fraction after AMI (Fig. 6h and 6i). This improvement of cardiac function was mainly associated with a significant increase in capillary density (Fig. 6j-m). Hence, activation of ACKR3 significantly reduces post-ischemic

heart injury and prevents adverse left ventricle remodelling. Altogether, these results underline that CXCL12 γ /HS interactions promote beneficial effects on cardiac remodelling likely through modulation of ACKR3 signalling in the infarcted heart.

CXCL12 γ /HS interactions do not affect post-ischemic inflammatory reaction.

We then aimed to decipher the cellular mechanisms involved in CXCL12 γ /ACKR3 interactions in the infarcted myocardium. The chemokine CXCL12 has been implicated in cardiac protection after MI through the mobilization and recruitment of inflammatory cells in the ischemic tissue^{14, 15}. We thus hypothesized that CXCL12/HS disruption could shape inflammatory reaction into the ischemic heart. Therefore, we evaluated the inflammatory cell profile within the infarcted myocardium of WT and mutant mice at different time points after MI. Before the onset of ischemia, inflammatory cell numbers were similar in both *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* and *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* animals when compared to their WT littermates (Supplementary Fig. 3). The number of T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes and macrophages was unaffected in the infarcted heart of both *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* and *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* animals in reference to their respective controls (Supplementary Fig. 3). After induction of MI, *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* mice exhibited a delayed neutrophil recruitment into the ischemic heart (Supplementary Fig. 3a). Analysis of infiltrating cells within ischemic heart of *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice also showed reduced neutrophil number at day 3 after MI (Supplementary Fig. 3b). Hence, both *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* and *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice exhibited transient dysregulation of neutrophil infiltration suggesting that CXCL12 γ /ACKR3 interaction could participate to neutrophil-dependent inflammatory reaction. To test this hypothesis, we used *Ackr3-GFP* reporter mice, and showed that the number of CD45⁺Ackr3GFP⁺ inflammatory cells in the heart peaked at day 1 and 3 after MI (Supplementary Fig. 4a-c). Interestingly, the vast majority of the CD45⁺Ackr3GFP⁺ cells were neutrophils (Supplementary Fig. 3d). To analyze directly the putative impact of CXCL12 γ and ACKR3 on neutrophil migratory properties, we evaluated neutrophil recruitment to the peritoneal cavity of *Ackr3-GFP* mice after zymosan application. Zymosan injection led to a major recruitment of CD45⁺ and neutrophils to the peritoneal cavity at 4h and 24h post-injection (Supplementary Fig. 4e-g). The number of *Ackr3GFP*⁺ neutrophils being higher at 24h after zymosan administration (Supplementary Fig. 4h-i), we evaluated neutrophil number in WT and *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice at this specific time point. Neutrophil recruitment to the peritoneal cavity was similar in WT and *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice at 24 h after zymosan application (Supplementary Fig. 4i-j). Overall, these results showed that

CXCL12 γ /ACKR3-related effects are unlikely mediated by modulation of inflammatory cell recruitment within the infarcted heart.

Identification and characterization of Ackr3-expressing cardiac fibroblast.

To identify ACKR3 expressing cells targeted by CXCL12 γ , we analyzed single cell-RNA sequencing datasets of the non-cardiomyocyte fraction from murine ischemic hearts and investigated the expression profile of CXCL12 receptors⁴⁴. Using cell-type specific markers genes, we defined different cell lineages including macrophages (Macro: *Cd68*, *Lyz2*), fibroblast (Fibro: *Col1a1*, *Col3a1*), endothelial cell (EC: *Kdr*, *Cdh5*), B cells (*Cd79a*, *Cd79b*), T cells (*Cd3d*, *Cd3g*), antigen presenting cells (APC: *H2-Ab1*, *Cd209a*), pericytes (*Pdgfrb*, *Colec11*), neutrophils (Neutro: *S100a8*, *S100a9*), natural killer cells (NK: *Nkg7*, *Ncr1*) and Schwann cells (*Kcna1*, *Plp1*) (Fig. 7a-b). Of great interest, *Ackr3* expression was detected in macrophages, endothelial cells but mostly in fibroblasts (Fig. 7c). In contrast, CXCR4 expression was mainly restricted to macrophages and was weakly expressed in cardiac fibroblasts (Fig. 7d). RNA fluorescence *in situ* hybridization of cardiac section also revealed that *Ackr3* was expressed in fibroblasts and endothelial cells in the infarcted heart (Supplementary Fig. 5a). Within the fibroblast lineage, we identified six sub-populations named F1 to F6 (Fig. 7e). Each population was differentially regulated over time after MI (Fig. 7f) and associated with a specific gene expression profile (Fig. 7g). *Ackr3* expression was restricted to three sub-populations of cardiac fibroblast noted F1, F2 and F3 (Fig. 7h). Interestingly, *Ackr3* is more abundantly expressed in the F3 sub-population which exhibited strong expression of a subset of genes such as *Cd248* and *Ly6a* (Fig. 7g). We then confirmed that ACKR3 was mainly present in cardiac fibroblasts, using flow cytometry analysis on cardiac tissue from non-operated animals (Fig. 8a). Cardiac fibroblasts, defined as CD90⁺ Sca-1⁺ MEFSK4⁺ cells⁴⁵, accounted for up to 10% of the non-cardiomyocyte cells, whereas leukocytes and endothelial cells represented 12% and 65%, respectively (Fig. 8b). Over 70% of cardiac fibroblasts expressed ACKR3 at steady state whereas only around 40% of endothelial cells and 30% of leukocytes were positive for this receptor (Fig. 8c). We also determined the expression of CD248 whose gene expression levels were specifically enriched in the F3 sub-population of fibroblasts in the single cell-RNA sequencing analysis (Fig. 7g). Around 40% of ACKR3⁺ cardiac fibroblasts expressed CD248 (Fig. 8 d, e). We then analyzed the time-dependent regulation of ACKR3⁺ cardiac fibroblast number in ischemic heart. In line with the single cell-RNA sequencing analysis regarding the F3 sub-population of cardiac fibroblasts, the proportion

of ACKR3⁺ and ACKR3⁺CD248⁺ cardiac fibroblasts remained stable over time after AMI (Figs. 8 f-g).

CXCL12 γ activation of ACKR3-expressing cardiac fibroblasts induces pro-angiogenic effects.

We first hypothesized that CXCL12 γ could modulate the number of ACKR3⁺ cardiac fibroblasts in the infarcted heart. However, the amount of ACKR3⁺ cardiac fibroblasts was similar in *Cxcl12^{gagtm/gagtm}*, *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice and WT littermates (Supplementary Fig. 6) suggesting that CXCL12/HS interactions and CXCL12 γ did not control ACKR3⁺ cardiac fibroblast content.

Pathway analysis of all genes significantly enriched within the F3 sub-population revealed a specific enrichment of genes involved in pro-angiogenic pathways (Fig. 9a), suggesting that cardiac ACKR3⁺ fibroblasts could exhibit strong pro-angiogenic potential. Furthermore, *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* and *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* displayed reduced capillary density whereas overexpression of CXCL12 γ increased capillary number in WT, *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* and *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* animals (Figs. 1-5). Similarly, TC14012-induced ACKR3 activation markedly increased capillary density (Fig. 6). Thus, the modulation of the angiogenic process appears to be a prominent hallmark of CXCL12 γ /ACKR3 signalling. We therefore speculated that CXCL12 γ pro-angiogenic effects could depend on ACKR3 activation on cardiac fibroblasts. To support this hypothesis, we generated conditioned media (CM) from primary cardiac fibroblasts isolated from healthy hearts stimulated or not with CXCL12 α (CM-CXCL12 α) or CXCL12 γ (CM-CXCL12 γ) and assessed their effects on murine endothelial cells (SVEC) proliferation, migration and vascular tube formation, three distinct steps of the angiogenic process. Using flow cytometry, we showed that ACKR3 and CXCR4 were expressed in cultured cardiac CD90⁺MEFSK4⁺ fibroblasts in our experimental conditions (Supplementary Fig. 7a-b). CM-CXCL12 γ significantly increased SVEC proliferation when compared with CM (Fig. 9b). CM-CXCL12 γ reduced wound closure when compared to CM-CXCL12 α or CM alone at 8 and 10 hours after scratching (Fig. 9c). Vascular structure formation was higher when SVEC were incubated with CM-CXCL12 γ compared to control CM (Fig. 9d). Of note, CM-CXCL12 α did not modulate the angiogenic phenotype in our experimental conditions (Fig. 9b-d). Hence, the secretome from cardiac fibroblasts stimulated with CXCL12 γ promotes endothelial cell proliferation and their ability to form vascular-like structure. To determine the role of ACKR3 receptor in these specific steps of the angiogenic process, we tested the impact of ACKR3 inhibition. Cardiac

fibroblasts were pre-treated with ACKR3 neutralizing antibodies (9C4 or 11G8 clones) or the CXCR4 antagonist (AMD3100) and then stimulated with CXCL12 γ . Inhibition of ACKR3 significantly reduced CM-CXCL12 γ -induced SVEC proliferation and vascular structure formation (Figs. 9e-f). However, the CXCR4 antagonist did not impact CM-CXCL12 γ related effects on SVEC proliferation (Fig. 9e) and endothelial tube formation (Fig. 9f). In addition, inhibition of ACKR3 or CXCR4 did not modulate CM-CXCL12 α related effects on proliferation, migration and vascular tube formation (Supplementary Fig. 7c-e). To further substantiate the pro-angiogenic potential of CXCL12 γ -treated ACKR3⁺ cardiac fibroblasts, we used a multiplex panel of mouse angiogenesis proteome profiler antibody array to measure 53 angiogenic factors from cardiac fibroblast conditioned media. Twenty-one angiogenic factors were detected, from which 7 were increased in CXCL12 γ -treated cardiac fibroblasts, including CCL2, endothelin-1, MMP3, Osteopontin and Placenta Growth Factor 2 (Fig. 9g-h). Altogether, our results reveal a crucial role for the CXCL12 γ /ACKR3 axis in cardiac fibroblast-induced pro-angiogenic effects.

Discussion

CXCL12 γ is the most abundant isoform in the heart^{1,46} with higher affinity for HS³⁹. However, the role of CXCL12 γ in post-ischemic injury was unknown. Our results unravel a major role of CXCL12 γ in the regulation of the cardiac healing response after AMI likely through its ability to interact with ACKR3 expressing cardiac fibroblast.

In order to study the specific contribution of CXCL12 γ /HS, we have engineered a new mouse model in which the *Cxcl12 γ* gene lacks the supplementary HS binding domains. *Cxcl12^{-/-}*, *Cxcr4^{-/-}* and *Ackr3^{-/-}* mice exhibit perinatal death, abnormal organogenesis and defective vascular and cardiac development^{6, 7, 24, 26-28}. In contrast, *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* animals do not present dysfunctional cardiogenesis and show normal cardiac function and structure in the adult state. This is probably due to the presence of other CXCL12 isoforms, undisrupted receptor signalling or the absence of specific ligand-binding pattern on HS structure during embryogenesis. Combining "loss of function" using *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice with "gain of function" strategy-based on CXCL12 overexpression, we showed that CXCL12 γ is a crucial actor in cardiac remodelling and particularly in post-MI vascularization. We previously showed that the sustained binding of CXCL12 γ to HS fostered angiogenesis with much higher efficiency than CXCL12 α ¹⁵. HS has also been shown to control CXCL12 activity in an isoform-specific manner³⁵. On the same note, recent studies unraveled that CXCL12 γ significantly increased metastasis to distant sites compared to the other isoforms and have highlighted a major role for GAGs in these experimental settings^{47, 48}. CXCL12/GAG interactions are essential to form chemokine concentration gradient allowing migration or local retention of cells. These interactions are also critical to protect the chemokine from degradation and to facilitate chemokine/receptor interaction^{32, 49}. Of note, cardiac dysfunction was observed in both *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* and *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* animals. In the *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* mice, the ability of all the isoforms to interact with HS was blunted whereas only that of CXCL12 γ was affected in *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* animals. Hence, CXCL12 γ isoform is a major determinant of the HS-dependent activities of CXCL12.

Cxcl12 γ and *Ackr3* mRNA were simultaneously up-regulated in WT mice at day 1 post-MI, contrary to the other CXCL12 isoforms and CXCR4, suggesting that CXCL12 γ and ACKR3 might have a mutual and concomitant role in post-ischemic cardiac remodeling. The lack of

major modulation in the immune response within the ischemic heart in both mutant mice models led us to consider the contribution of resident cardiac cells in CXCL12 γ /ACKR3 related effects. Single-cell RNA-sequencing analysis allowed us to identify ACKR3-expressing cardiac fibroblasts as a fibroblast subtype with a distinct angiogenic signature. Of note, 40% of ACKR3⁺ cardiac fibroblasts also express CD248⁺. CD248 can act as modulator of angiogenesis⁵⁰ and CD248-deficient mice displayed a specific defect of angiogenesis during muscle remodeling⁵¹. Fibroblasts are a heterogeneous population of cells exhibiting various phenotypical and functional characteristics that are influenced by the type of tissue, disease progression and pathological settings⁵². Cardiac fibroblasts present proliferative, pro-fibrotic or pro-angiogenic signatures over the course of AMI⁵³. We therefore hypothesized that ACKR3 expressing-cardiac fibroblasts might contribute to CXCL12 γ -mediated angiogenesis. Indeed, ACKR3 plays a key role in physiological and pathological angiogenesis^{27,54}. Notably, after AMI, endothelial deletion of *Ackr3* impaired heart function and cardiac remodelling through a decrease of vascularization²⁹. ACKR3 activation with TC14012 promotes endothelial cell proliferation and angiogenesis *in vitro*^{29,55}. On the same note, we showed that TC14012 improved capillary density, suggesting an important role of ACKR3 activation in ischemia induced-angiogenic response. ACKR3 expression has been reported to contribute to tumor angiogenesis through the secretion of angiogenic factors⁵⁶. Additionally, gene profiling of *Ackr3*^{-/-} mice identified defects in the expression of angiogenic factors essential for vessel protection as well as endothelial cell growth and survival²⁷. We added another cellular target to ACKR3-related pathways by demonstrating that conditioned media from cardiac fibroblast stimulated with CXCL12 γ promoted endothelial cell proliferation and vascular tube formation and that these effects were hampered by ACKR3 inhibition. Therefore, our results indicate that CXCL12 γ can act *via* ACKR3-expressing cardiac fibroblasts to promote post-ischemic vascularization. Future studies are required to decipher the signaling mechanisms induced by CXCL12 γ binding to ACKR3 in cardiac fibroblasts.

In conclusion, our findings unravel the contribution of CXCL12/HS interactions in post-ischemic cardiac remodelling and identify the pivotal role of CXCL12 γ isoform in this context. Our study also demonstrates that ACKR3⁺ cardiac fibroblasts are an instrumental component of CXCL12 γ pro-angiogenic potential. Our findings pave the way for further investigations about the specific contribution of CXCL12 γ in cardiovascular diseases and open new therapeutic perspectives for the healing response after MI.

Methods

Experimental procedures

All experiments were conducted according to the directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the University of Paris ethics committee for animal use (CEEA-34) and the National Charter on the ethics on animal experimentation from the French Minister of High Education and Research under the reference APAFIS#25961-201909121613546v3 - MESR No. 25961.03. Mice were maintained under identical standard conditions including housing, regular care, and normal chow diet in the same animal facility throughout the duration of the experiments.

Mouse models

C57BL/6J mice were obtained from Janvier (France). *Cxcl12*^{gagtm/gagtm} mice, in which the *Cxcl12* gene has been selectively mutated in critical HS binding sites, and *Ackr3-GFP* mice have been previously described^{15 21}. *Cxcr4*^{1013/WT} mice harbor heterozygous CXCR4 S338X mutation causing a distal truncation of the last 15 residues of the C-tail domain leading to a gain of receptor function upon CXCL12 engagement, as previously described⁴². To generate *Cxcl12*^{tm(cxcl12 γ)} mice (thereafter called *Cxcl12 γ* ^{Δ^4/Δ^4}) an early stop codon was inserted in exon 4 of the *Cxcl12* gene by targeted knock-in mutation to selectively prevent translation of the last 30 amino acids of CXCL12 γ protein. For this purpose, a 14.5 kb genomic DNA was used to construct the targeting vector (iTL, Fresh Meadows, USA). The stop codon insertion in exon 4 was generated by polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis. The PCR fragment carrying the mutation was then employed to replace the WT sequence using conventional sub-cloning methods. The LoxP/FRT-Neo cassette was inserted around 2.3 kb upstream of the stop codon in exon 4. The targeting vector (2.4 kb pSP72-based vector) was validated by restriction analysis and sequencing after each modification. Targeting vector was linearized by ClaI digestion and then transfected by electroporation in BA1 hybrid embryonic stem cells (C57BL/6 \times 129/SvEv). After selection with G418 antibiotic, surviving clones were expanded for PCR analysis to identify recombinant embryonic stem cell clones. Positive clones were confirmed by Southern blot analysis. Targeted BA1 (C57BL/6 \times 129/SvEv) hybrid embryonic stem cells were microinjected into C57BL/6 blastocysts. Resulting chimeras were mated with WT C57BL/6 mice to generate F1 *Cxcl12 γ* ^{Δ^4 /WT} offspring. Tail DNA was analysed by PCR to confirm the integration of the desired sequences. *Cxcl12 γ* ^{Δ^4 /WT} mice were then bred with

transgenic 129sv PGK-Cre to induced LoxP/FRT-Neo cassette excision. The offspring, that did not inherit PGK-CRE but showed deletion of the LoxP/FRT-Neo cassette, were selected, and the colony was amplified. Genotyping was performed using 5' -cccaaaggacttagtagacc-3' (forward) and 5' -gatgaggatgaggagaatggggatgaag-3' (reverse) primers. Amplicons of 299 bp and 477 bp were obtained for *Cxcl12 γ ^{WT/WT}* and *Cxcl12 γ ^{Δ / Δ}* animals, respectively.

All experiments were performed with 10 to 25 week-old male and female mice, constituting age- and littermate-matched groups without randomization. All strains were on a C57BL/6 genetic background except for *Ackr3-GFP* mice, which were maintained heterozygous on a CD-1 background.

Single-cell RNA-sequencing analysis

Author-provided gene expression matrices of single cell RNA-sequencing data from cardiac interstitial cells in sham and infarcted mice at day 3 and 7 post-infarction (Array Express E-MTAB-7376 ⁴⁴) were loaded in the Seurat v3.1.1 package in R (version 3.6.1). Briefly, cells with >5% mitochondrial transcripts or with outlier amounts of detected transcripts were considered as dead cells or multiplets, respectively, and excluded, leaving a final number of 14,401 high quality cells for analysis. Data were normalized using the “NormalizeData” function, 2000 variably expressed genes were identified using the “vst” method, and data scaled using the “ScaleData” function with default parameters. Principal component analysis was performed, and 20 principal components were employed to perform Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) and Louvain clustering. Louvain clustering was first performed using a 0.2 resolution to identify major cell populations, and cellular lineages were identified based on the expression of canonical markers as indicated in Figure 7. Note that some clusters were grouped together within cell lineages to facilitate data visualization (e.g., macrophage sub-populations). To identify sub-clusters of fibroblasts, clustering was performed with a 0.6 resolution. Fibroblast populations were subset in a new Seurat object, and marker genes of fibroblast sub-populations were identified using the “FindAllMarkers” function in Seurat with default parameters. The top 5 enriched genes per cluster (ranked by log fold change) were used to generate the plot shown in Figure 7g. Pathway analysis was also performed using the online tool metascape.org.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using Prism (v7, GraphPad Software Inc.). Mann-Whitney Test was used to compare two groups. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance was used to compare each measure from three or more independent groups. Comparisons between groups were then performed using Dunn's multiple comparisons test when the analysis of variance test was statistically significant. Matched groups were compared with either Repeated measures One-way ANOVA with Tukey correction or Wilcoxon test if samples did not pass normality tests. Two-way ANOVA test with Bonferroni correction was used when required. The log-rank (Mantel-Cox) test was used to compare survival rate. Results were expressed as mean \pm SEM. A P value <0.05 was considered significant. Sample size was not pre-determined by statistical method. Mice dying within 24 hours after coronary artery ligation surgery ($<10\%$ in all genotypes studied) were considered as purely technical failures and excluded from subsequent analysis.

Figures

Figure 1

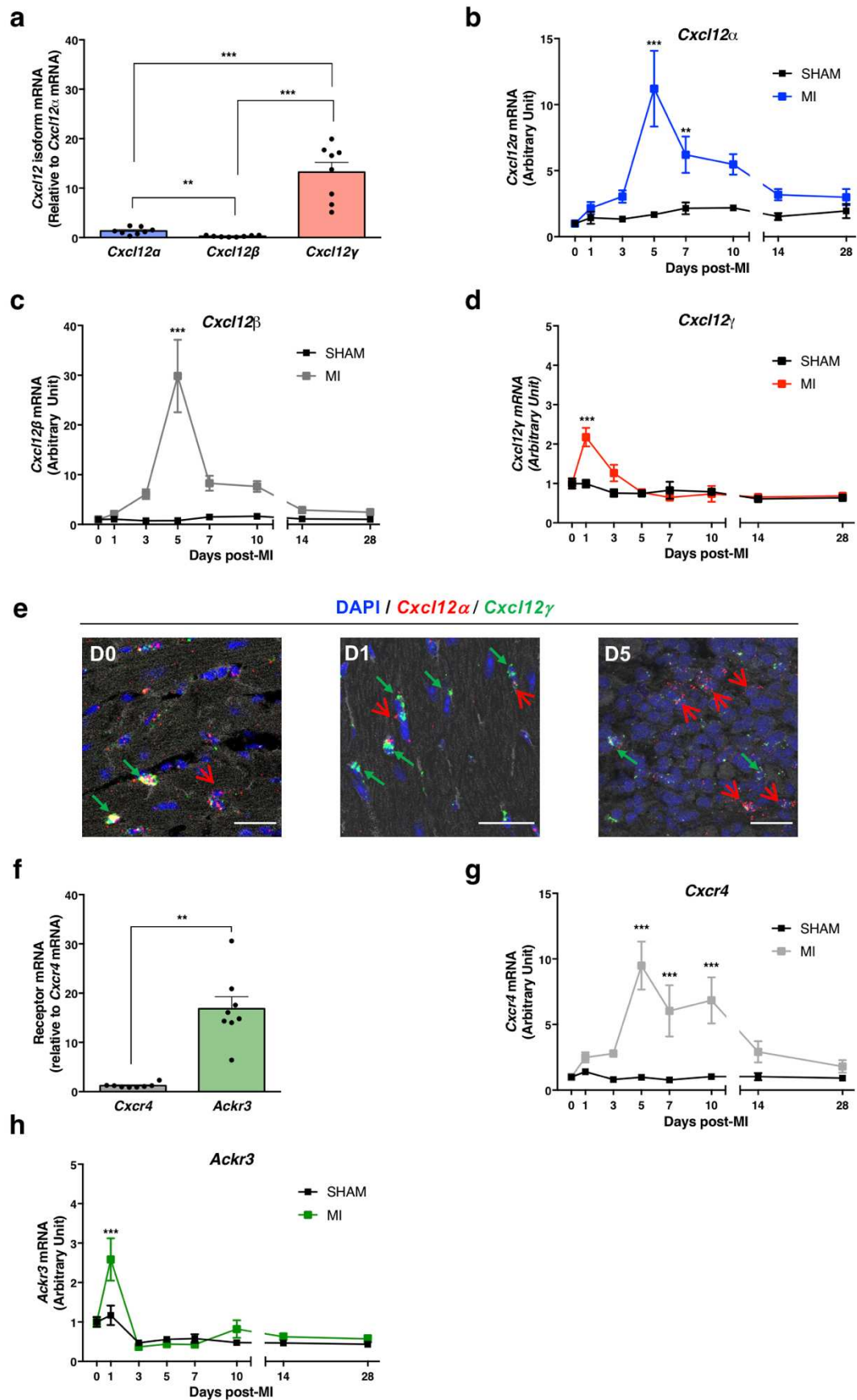


Figure 1. *Cxcl12 γ* and *Ackr3* mRNA levels are up-regulated in the infarcted heart. a) mRNA levels of *Cxcl12 β* and *Cxcl12 γ* normalized to that of *Cxcl12 α* in healthy cardiac tissue of wild-type (WT) mice (n=9). ***P<0.001. **b-d)** Cardiac *Cxcl12 α* (b), *Cxcl12 β* (c) and *Cxcl12 γ* (d) mRNA levels at different time-points after the onset of acute MI. Data represented as mean \pm SEM. **P<0.01, ***P<0.001 for sham-operated versus acute MI (n =9 at D0 and n=5 thereafter). **e)** RNA Fluorescent *In Situ* Hybridization for *Cxcl12 α* (red dots) and *Cxcl12 γ* (green dot) mRNA. Each dot indicates a *Cxcl12* mRNA molecule. 40x magnification, Scale bar 30 μ m. **f)** mRNA levels of *Ackr3* receptor were normalized to that of *Cxcr4* in healthy cardiac tissue of WT mice (n=8). **P<0.01. **g-h)** Time dependent regulation of *Cxcr4* (g) and *Ackr3* (h) mRNA levels after AMI in WT mice. Data are represented as mean \pm SEM. ***P<0.001 for sham-operated versus MI at different time points (n =9 at D0 and n=5 thereafter). P values were calculated using Repeated measures-One-way ANOVA with Tukey correction, Wilcoxon test or Two-Way ANOVA with Bonferroni correction. WT, Wild-Type; MI, myocardial infarction.

Figure 2

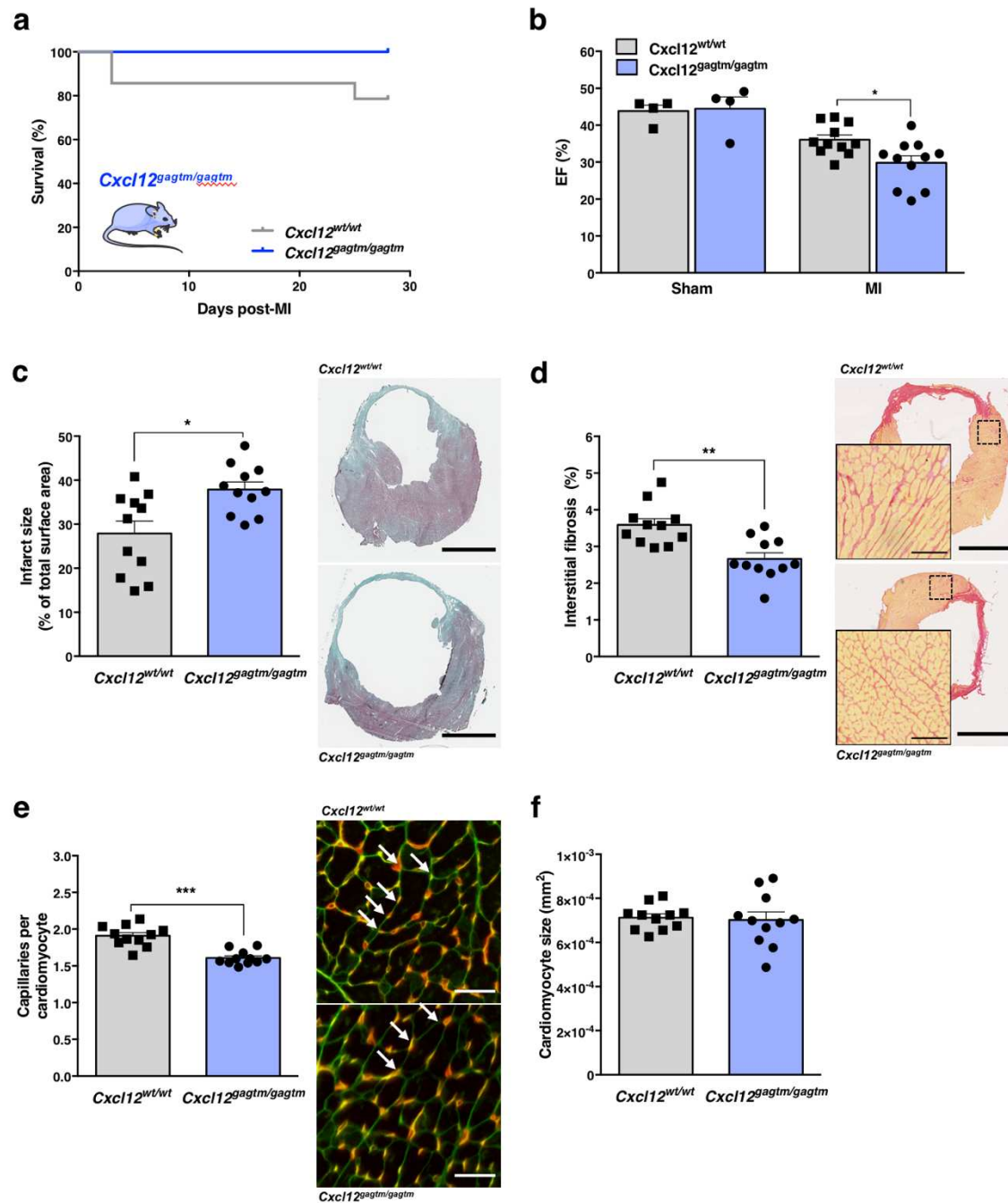


Figure 2. CXCL12/HS interaction regulates cardiac function and remodeling after acute myocardial infarction. **a)** Survival rate in *Cxcl12*^{gagtm/gagtm} mice and their WT littermates (*Cxcl12*^{wt/wt}) after MI (n=11). **b)** Quantitative evaluation of left ventricular ejection fraction (EF) in *Cxcl12*^{gagtm/gagtm} mice and control littermates (*Cxcl12*^{wt/wt}) either sham-operated (n=4 per group) or challenged with MI (n=11 per group). *P<0.05. **c)** Quantitative analysis of infarct size evaluated by Masson trichrome staining (left) and representative photomicrographs (right) in *Cxcl12*^{gagtm/gagtm} and *Cxcl12*^{wt/wt} mice (n=11/group). *P<0.05. Scale bar, 2 mm. **d)** Interstitial fibrosis evaluated by Sirius Red staining (left) and representative images (right) in *Cxcl12*^{gagtm/gagtm} and *Cxcl12*^{wt/wt} mice (n=11/group). **P<0.01. Scale bar, 100 μm. **e)** Capillary density quantification evaluated by lectin staining (left) and representative images (right) in *Cxcl12*^{gagtm/gagtm} and *Cxcl12*^{wt/wt} mice (n=11/group). ***P<0.001. Scale bar, 30 μm. **f)** Cardiomyocytes size in the 2 group of mice (n=11/group). P values were calculated using Kruskal-Wallis test or two-tailed Mann-Whitney test.

Figure 3

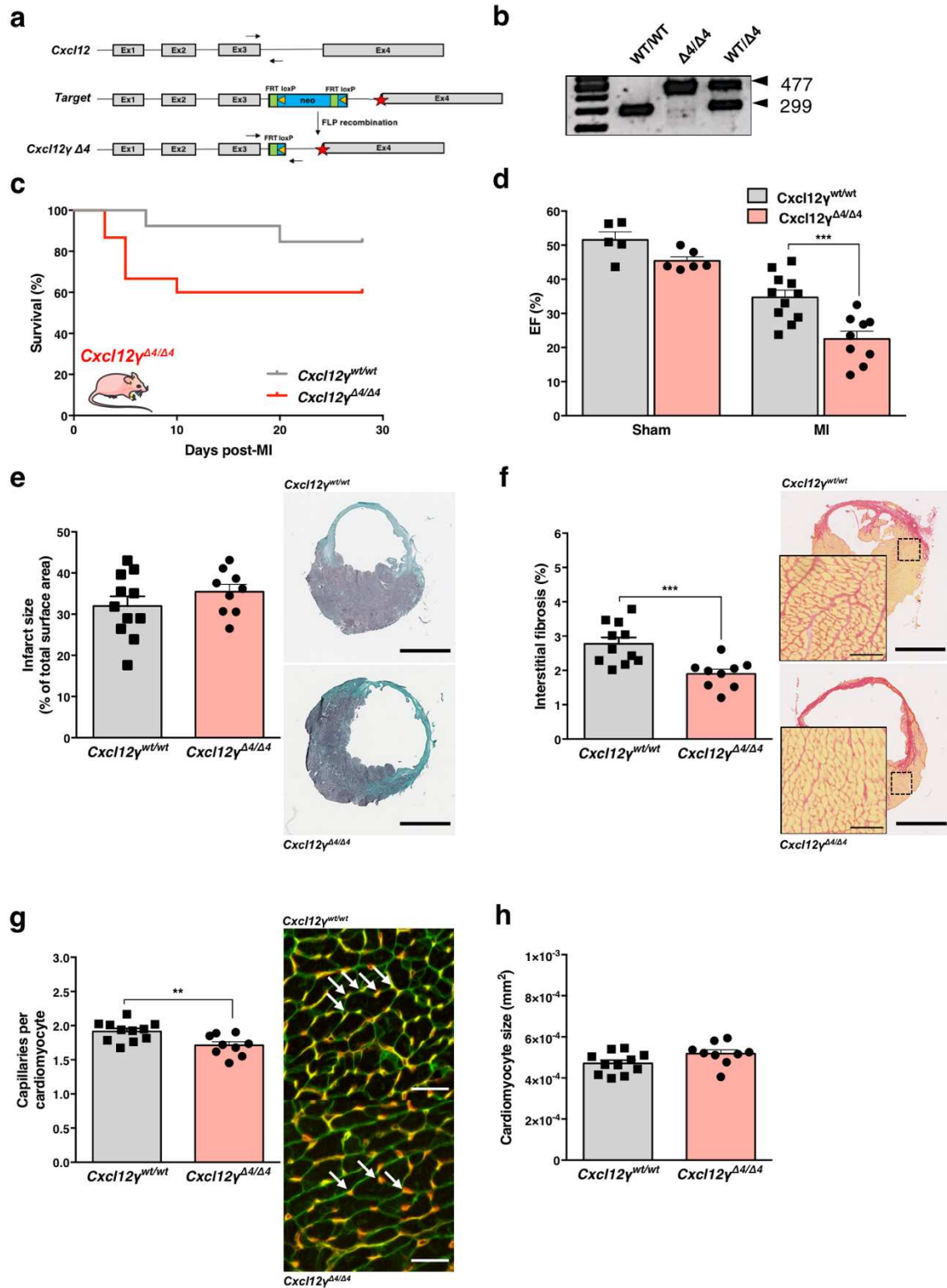


Figure 3. CXCL12 γ controls cardiac function and angiogenesis after myocardial infarction. **a)** Generation of *Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$ mice. Schematic representation of the wild-type *Cxcl12* locus, the targeted allele, and the recombined *Cxcl12* γ locus. Exons 1 through 4 are represented by grey boxes. Mutations incorporating a stop codon in the fourth exon are indicated by a red star. Yellow triangles indicate LoxP sites; green box indicates FRT site; blue box indicates the neomycin-resistance gene cassette (*neo*); arrowhead indicates primer sites used for genotyping. **b)** PCR analysis of genomic DNA from wild-type (WT/WT), homozygous ($\Delta4/\Delta4$) or heterozygous (WT/ $\Delta4$) animals. The 299 bp and the 477 bp amplicons characterize WT and mutant animals, respectively. **c)** Survival rate in *Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$ mice and their WT littermates (*Cxcl12* $^{wt/wt}$) after MI (n=11/*Cxcl12* $^{wt/wt}$ and n=9/*Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$). *P<0.05. **d)** Quantitative evaluation of left ventricular ejection fraction (EF) in *Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$ and *Cxcl12* $^{wt/wt}$ animals either sham-operated (n=4 per group) or challenged with MI (n=11/*Cxcl12* $^{wt/wt}$ and n=9/*Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$). *P<0.05. **e)** Infarct size evaluation (left) and representative images (right) in the 2 groups of mice (n=11/*Cxcl12* $^{wt/wt}$ and n=9/*Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$). Scale bar 2 mm. **f)** Interstitial fibrosis quantification (left) and representative images in *Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$ and *Cxcl12* $^{wt/wt}$ animals (n=11/*Cxcl12* $^{wt/wt}$ and n=9/*Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$). ***P<0.001. Scale bar 100 μ m. **g)** Capillary density quantification (left) and representative images (right) in the 2 groups of mice (n=11/*Cxcl12* $^{wt/wt}$ and n=9/*Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$). *P<0.05. Scale bar 30 μ m. **h)** cardiomyocyte size in *Cxcl12* $^{wt/wt}$ (n=11) and *Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$ mice (n=9). P values were calculated using Kruskal-Wallis test or two-tailed Mann-Whitney test.

Figure 4

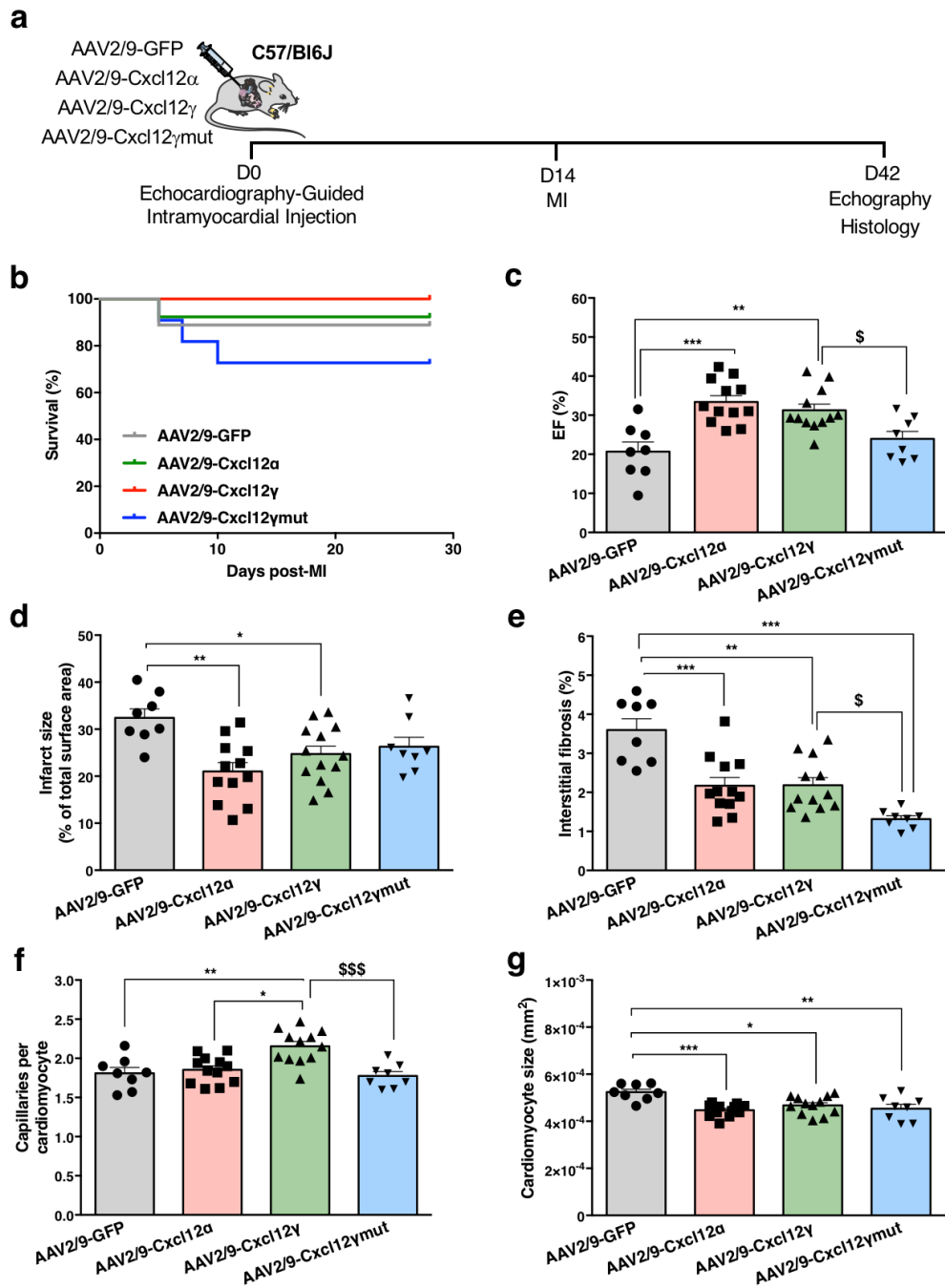


Figure 4. CXCL12 γ overexpression improves cardiac function and angiogenesis after MI.

a) Echocardiography-guided intramyocardial injections were performed in WT mice, 14 days before MI to deliver AAV expressing Cxcl12 α (AAV2/9-Cxcl12 α) or Cxcl12 γ (AAV2/9-Cxcl12 γ) or Cxcl12 γ with mutated HS binding sequences (AAV2/9-Cxcl12 γ mut) and Green Fluorescent Protein (AAV2/9-GFP) as control. **b)** Survival rate in AAV2/9-Cxcl12 α or AAV2/9-Cxcl12 γ or AAV2/9-Cxcl12 γ mut or AAV2/9-GFP treated animals after MI. **c)** Quantitative evaluation of left ventricular ejection fraction (EF) in injected mice (AAV2/9-GFP, n=8; AAV2/9-Cxcl12 α , n=12; AAV2/9-Cxcl12 γ , n=12; AAV2/9-Cxcl12 γ mut n= 8). **d-g)** Infarct size (d), interstitial fibrosis (e), cardiomyocyte size (f) and capillary density (g) were evaluated in each group of mice (AAV2/9-GFP, n=8; AAV2/9-Cxcl12 α , n=12; AAV2/9-Cxcl12 γ , n=12; AAV2/9-Cxcl12 γ mut n= 8). AAV indicates adeno-associated virus. P values were calculated using Kruskal-Wallis test. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. \$P<0.05; \$\$\$P<0.001

Figure 5

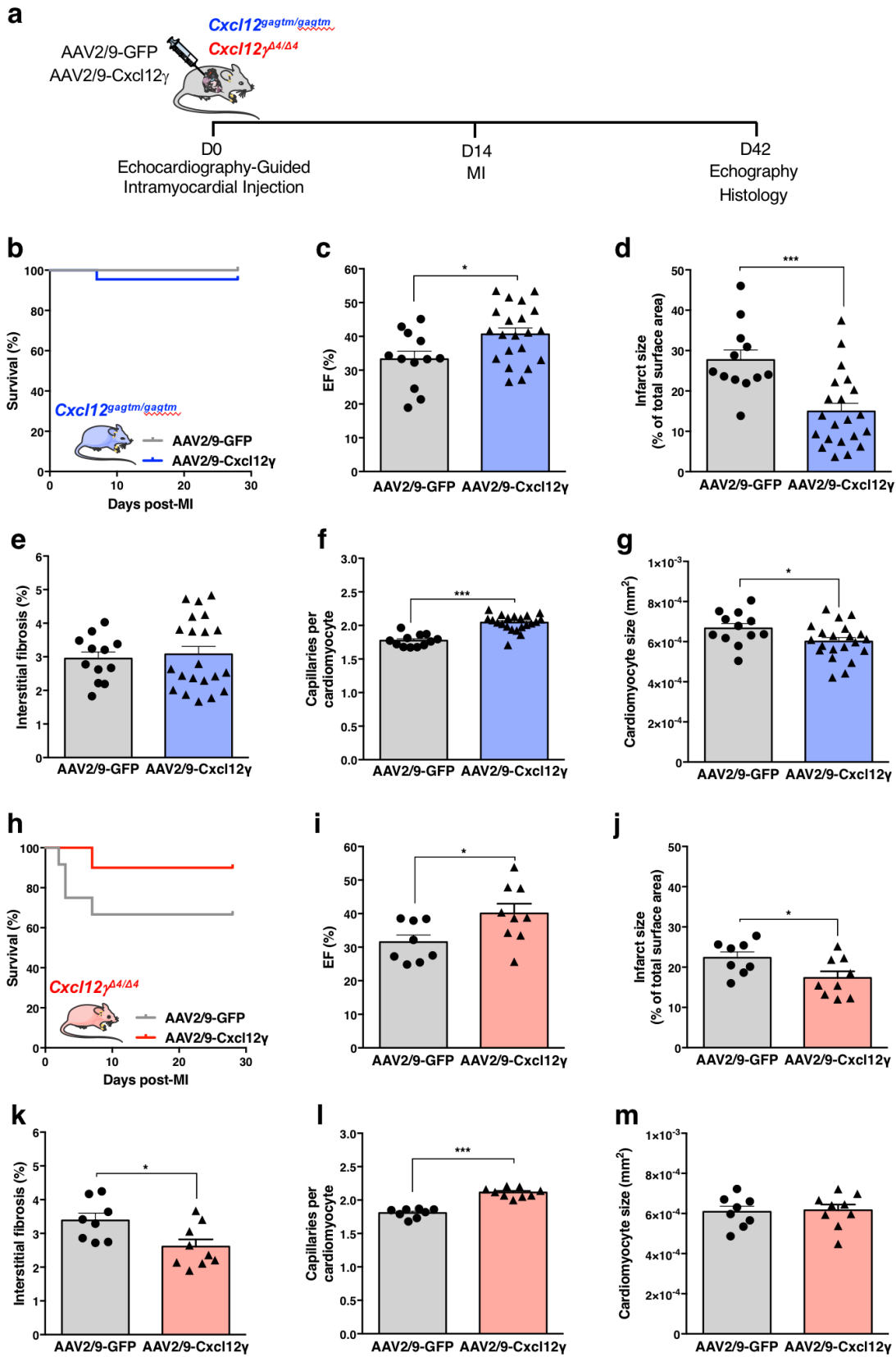


Figure 5. CXCL12 γ overexpression rescues the defective cardiac phenotype in mutant mice. **a)** Protocol of AAV injection in *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* and *Cxcl12 $^{gagtm/gagtm}$* mice. **b-c)** Rate of survival (b) and evaluation of left ventricular ejection fraction (EF) (c) in *Cxcl12 $^{gagtm/gagtm}$* injected with AAV2/9-Cxcl12 γ (n= 21) and control vector AAV2/9-GFP (n=12) at day 28 post-MI. *P<0.05, **P<0.01 vs AAV2/9-GFP. **d-g)** Evaluation of infarct size (d), interstitial fibrosis (e), capillary density (f) and cardiomyocyte size (g) in infarcted *Cxcl12 $^{gagtm/gagtm}$* mice injected with AAV2/9-Cxcl12 γ (n=21) or AAV2/9-GFP (n=12) at day 28 post-MI. *P<0.05, **P<0.01 vs AAV2/9-GFP. **h-i)** Rate of survival (h) and evaluation of left ventricular ejection fraction (EF) (i) in *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* injected with AAV2/9-Cxcl12 γ (n= 9) and control vector AAV2/9-GFP (n=8) at day 28 post-MI. *P<0.05 vs AAV2/9-GFP. **j-m)** Evaluation of infarct size (j), interstitial fibrosis (k), capillary density (l) and cardiomyocyte size (m) in infarcted *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice injected with AAV2/9-Cxcl12 γ (n=9,) or AAV2/9-GFP (n=8) at day 28 post-MI. *P<0.05, ***P<0.001 vs AAV2/9-GFP. P values were calculated using two-tailed Mann-Whitney test. AAV indicates adeno-associated virus.

Figure 6

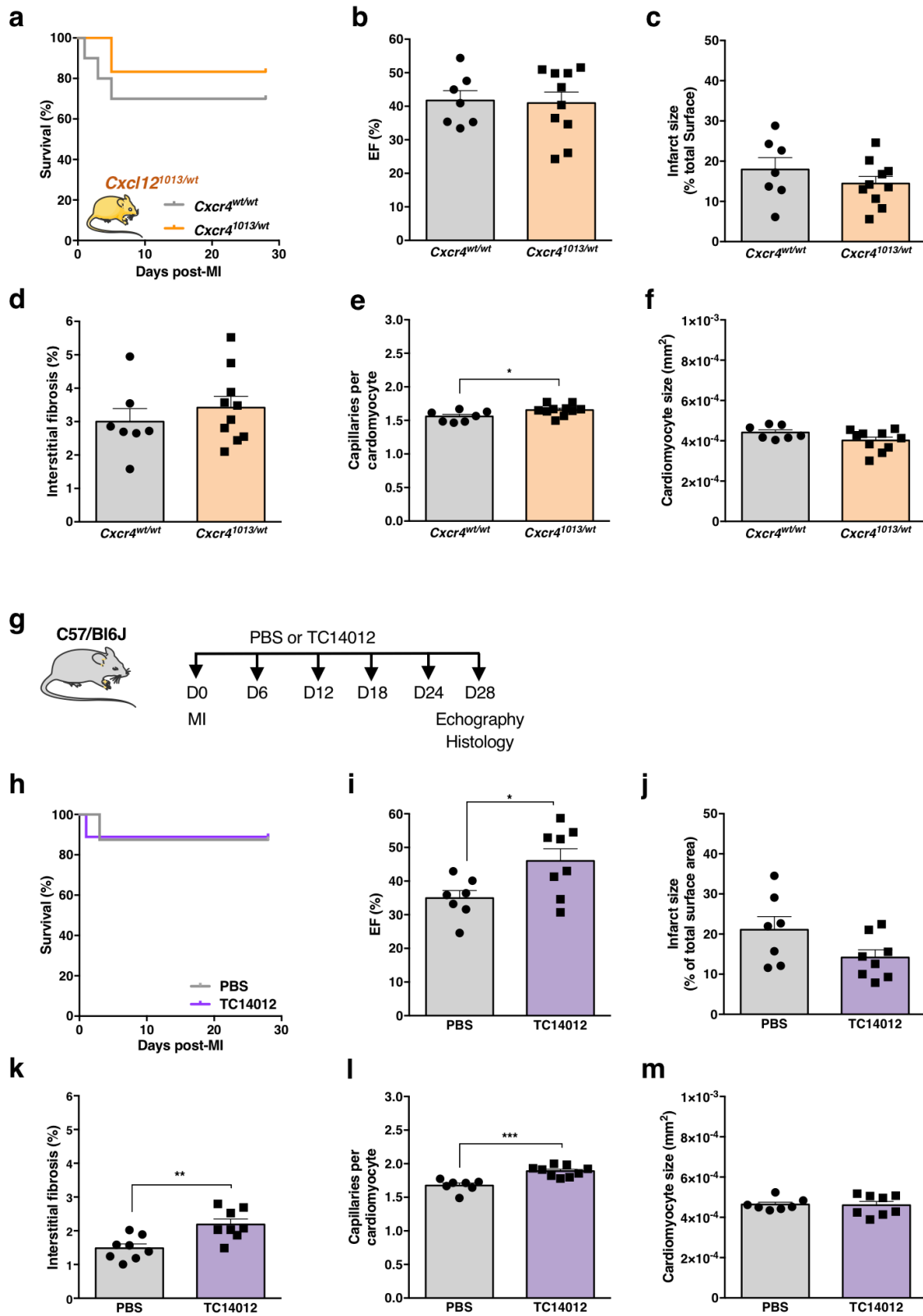


Figure 6. ACKR3 activation enhances cardiac function and angiogenesis in infarcted mice. Rate of survival **(a)** and evaluation of left ventricular ejection fraction (EF) **(b)** in *Cxcr4*^{1013/WT} and their WT *Cxcr4*^{WT/WT} littermates after AMI (*Cxcr4*^{WT/WT}, n= 7 ; *Cxcr4*^{1013/WT}, n=10). Evaluation of infarct size **(c)**, interstitial fibrosis **(d)**, capillary density **(e)** and cardiomyocyte size **(f)** in *Cxcr4*^{1013/WT} and their WT *Cxcr4*^{WT/WT} littermates at day 28 post-MI (*Cxcr4*^{WT/WT}, n= 7; *Cxcr4*^{1013/WT}, n=10). *P<0.05. P values were calculated using two-tailed Mann-Whitney test. **g)** WT mice were treated with ACKR3 agonist, TC14012, at different time points after the onset of ischemia (PBS, n=7; TC14012, n=8). Rate of survival **(h)** and evaluation of left ventricular ejection fraction (EF) **(i)** in TC14012 treated and untreated (PBS) WT animals after AMI (PBS, n=7; TC14012, n=8). Evaluation of infarct size **(j)**, interstitial fibrosis **(k)**, capillary density **(l)** and cardiomyocyte size **(m)** in TC14012 treated and untreated (PBS) WT animals at day 28 after MI (PBS, n=7; TC14012, n=8). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. P values were calculated using two-tailed Mann-Whitney test.

Figure 7

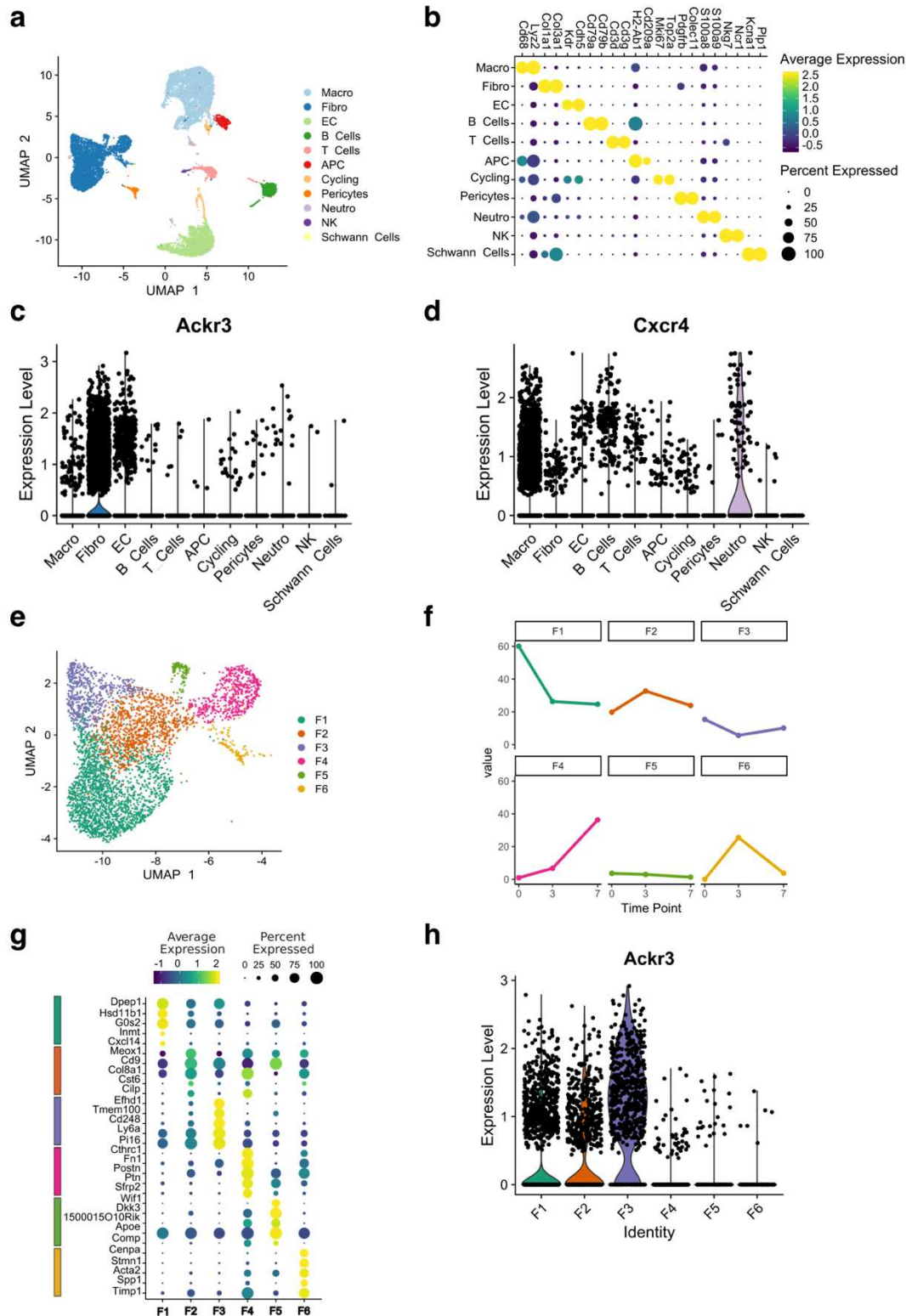


Figure. 7 Ackr3 expression features pro-angiogenic cardiac fibroblasts.

a) UMAP representation of scRNA-seq data of 14041 non-myocyte cardiac cells in the heart of sham-operated animals and of infarcted mice for 3 and 7 days. **b)** Expression level of the indicated transcripts used to identify cellular lineages. **c-d)** Violin plot showing log transformed expression of *Ackr3* (c) and *Cxcr4* (d) in each lineage. **e)** Color-coded fibroblast clusters on the UMAP plot. **f)** Proportion of fibroblast clusters according to post-MI time point. **g)** Top 5 marker genes expression dot-plot for fibroblast clusters. **h)** Violin plot showing log transformed expression of *Ackr3* in fibroblast clusters.

Figure 8

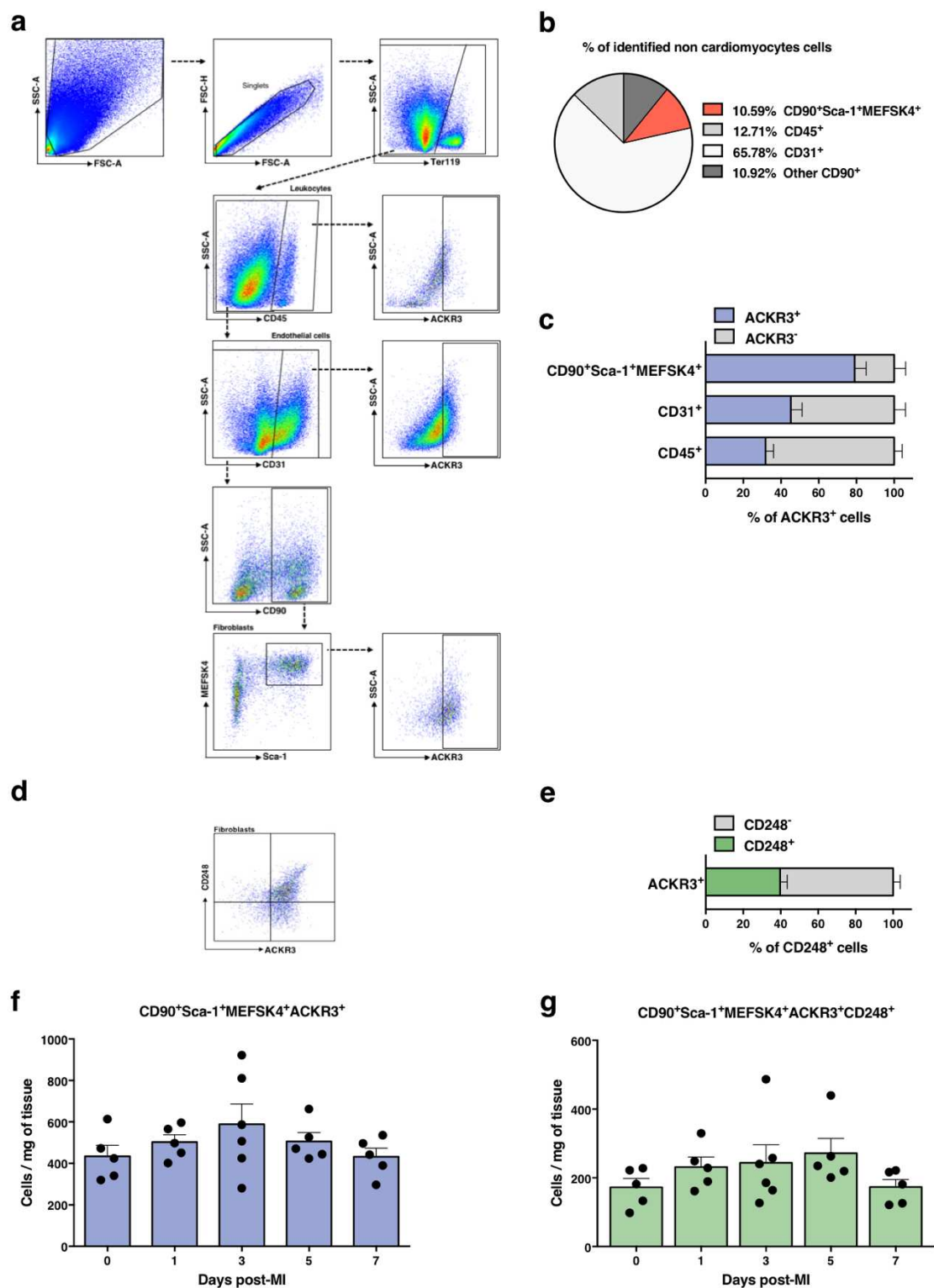


Figure 8. ACKR3 is mainly expressed in cardiac fibroblasts. **a)** Representative flow cytometry gating strategy used for isolation of cardiac fibroblasts from left ventricle of murine heart. **b)** Analysis of endothelial cells (CD31⁺), inflammatory cells (CD45⁺) and fibroblasts (CD90⁺Sca-1⁺MEFSK4⁺) proportion within the non-cardiomyocyte Ter119⁻ cell fraction. "Other" indicates Ter119⁻CD45⁻CD31⁻Sca-1⁻ cells. Data are expressed as percentage and are representative of 3 independent experiments. **c)** Percentage of ACKR3⁺ cells within the endothelial cells, inflammatory cells and cardiac fibroblasts. **d-e)** Representative dot plot of ACKR3⁺CD248⁺ cardiac fibroblasts within the MEFSK4⁺Sca-1⁺ population (d) and analysis of CD248⁺ cell proportion in ACKR3⁺ cardiac fibroblasts (e). **f-g)** Time-dependent regulation of ACKR3⁺ (f) and ACKR3⁺CD248⁺ (g) cardiac fibroblast number in response to MI, n=5/group. Data are represented as mean ± SEM and are representative of 5 independent experiments.

Figure 9

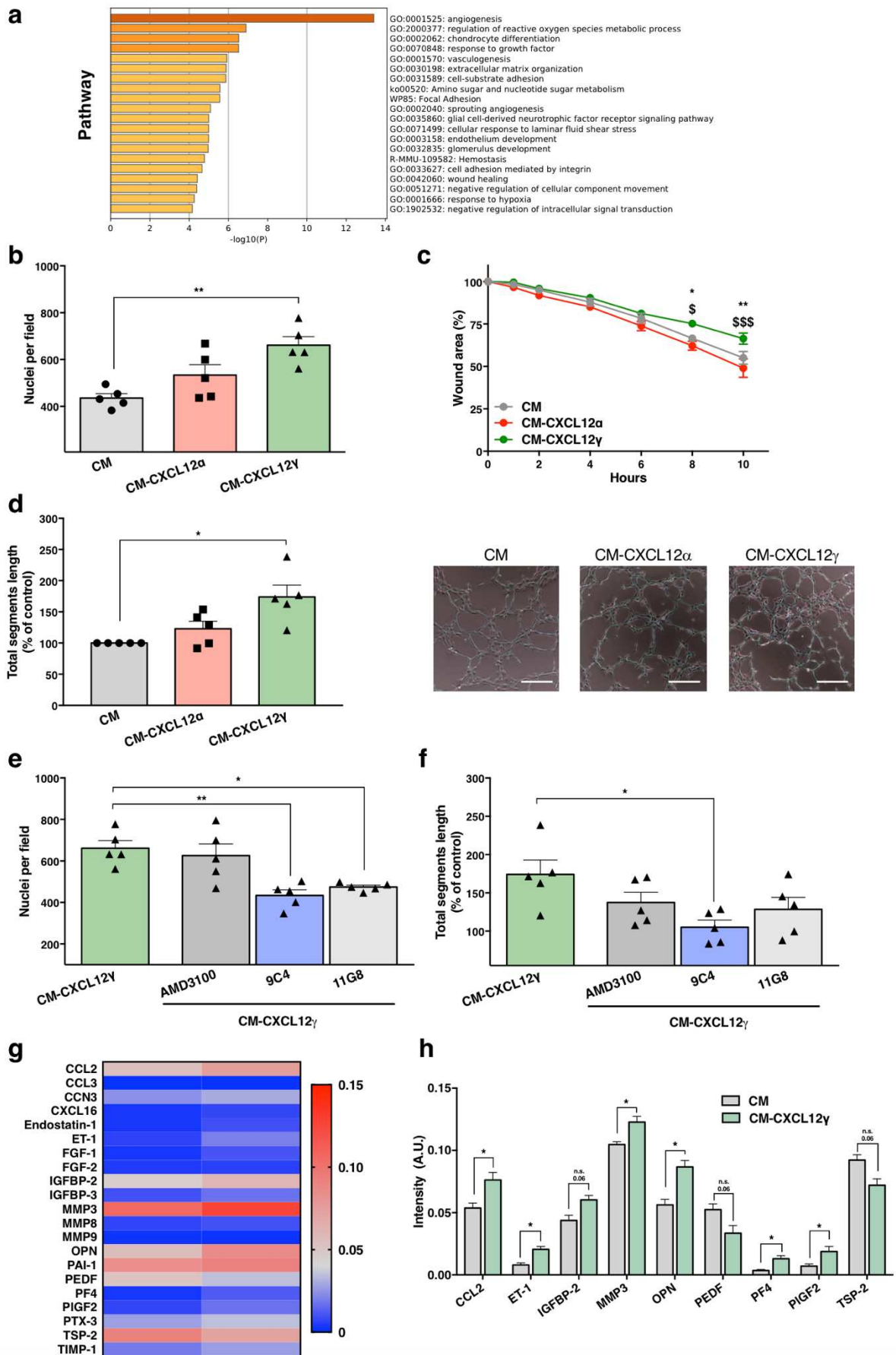


Figure 9. CXCL12 γ activates ACKR3-expressing cardiac fibroblasts to promote a pro-angiogenic response. **a)** Pathway analysis in cardiac fibroblast clusters (F1-F3). **b)** Cell density assay using DAPI staining was performed on SVEC in response to conditioned media collected from murine healthy cardiac fibroblasts (CM) or CM from cardiac fibroblasts treated with CXCL12 α (CM-CXCL12 α) or CXCL12 γ (CM-CXCL12 γ) recombinant proteins. n = 5 per condition, from five independent experiments performed in duplicate. **P<0.01. **c)** Effect of CM, CM-CXCL12 α or CM-CXCL12 γ on wound healing of scratched SVEC monolayers. Data were expressed as percent of wound area and were representative of 5 independent experiments performed in duplicate. *P<0.05, **P<0.01 versus CM and \$P<0.05, \$\$\$P<0.001 versus CM-CXCL12 α . **d)** Left, quantification of tube formation based on the total segment length measurement per field in SVEC treated with CM, CM-CXCL12 α or CM-CXCL12 γ . Data represent an average of SVEC cell assembly from n = 5 per condition from five independent experiments performed in duplicate. Right, representative bright field images from an endothelial cell assembly assay in the different experimental conditions. *P<0.05. **e-f)** Effect of ACKR3 neutralizing antibody clones 9C4 or 11G8, or CXCR4 antagonist AMD3100 on CM-CXCL12 γ -induced increase in cellular density (e) and vascular tube formation (f). Data are represented as mean \pm SEM and are representative from 5 independent experiments performed in duplicate. *P<0.05, **P<0.01. **g)** Heat map from angiogenesis proteome profiler array representing magnitude of protein level variations in cultured cardiac fibroblasts treated with CM or CM-CXCL12 γ . **h)** Semi-quantitative evaluation of selected angiogenic proteins in CM or CM-CXCL12 γ -treated fibroblast lysates identified using mouse angiogenesis proteome profiler array. ET-1 indicates endothelin-1, ns: not significant. Data are represented as mean \pm SEM and are representative from 2 independent experiments performed in duplicate. *P<0.05. P values were calculated using Kruskal-Wallis test or Two-Way ANOVA with Bonferroni correction.

References

1. Yu, L. *et al.* Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene* **374**, 174-179 (2006).
2. Shirozu, M. *et al.* Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* **28**, 495-500 (1995).
3. Aiuti, A., Webb, I.J., Bleul, C., Springer, T. & Gutierrez-Ramos, J.C. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *The Journal of experimental medicine* **185**, 111-120 (1997).
4. Peled, A. *et al.* The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *The Journal of clinical investigation* **104**, 1199-1211 (1999).
5. Grabovsky, V. *et al.* Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *The Journal of experimental medicine* **192**, 495-506 (2000).
6. Nagasawa, T. *et al.* Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 14726-14729 (1996).
7. Ma, Q. *et al.* Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9448-9453 (1998).
8. Shi, Y., Riese, D.J., 2nd & Shen, J. The Role of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis in Cancer. *Front Pharmacol* **11**, 574667 (2020).
9. McCandless, E.E. *et al.* Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis. *Am J Pathol* **172**, 799-808 (2008).
10. Pablos, J.L. *et al.* Synovioyte-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology* **170**, 2147-2152 (2003).
11. Phillips, R.J. *et al.* Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* **114**, 438-446 (2004).
12. Ceradini, D.J. *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature medicine* **10**, 858-864 (2004).
13. Wang, Y., Huang, J., Li, Y. & Yang, G.Y. Roles of chemokine CXCL12 and its receptors in ischemic stroke. *Curr Drug Targets* **13**, 166-172 (2012).
14. Saxena, A. *et al.* Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction. *Circulation* **117**, 2224-2231 (2008).
15. Rueda, P. *et al.* Homeostatic and tissue reparation defaults in mice carrying selective genetic invalidation of CXCL12/proteoglycan interactions. *Circulation* **126**, 1882-1895 (2012).
16. Bleul, C.C. *et al.* The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* **382**, 829-833 (1996).
17. Balabanian, K. *et al.* The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* **280**, 35760-35766 (2005).

18. Huynh, C., Dingemans, J., Meyer Zu Schwabedissen, H.E. & Sidharta, P.N. Relevance of the CXCR4/CXCR7-CXCL12 axis and its effect in pathophysiological conditions. *Pharmacol Res* **161**, 105092 (2020).
19. Rajagopal, S. *et al.* Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 628-632 (2010).
20. Naumann, U. *et al.* CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PloS one* **5**, e9175 (2010).
21. Sanchez-Alcaniz, J.A. *et al.* Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron* **69**, 77-90 (2011).
22. Levoe, A., Balabanian, K., Baleux, F., Bachelier, F. & Lagane, B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signalling. *Blood* (2009).
23. Bachelier, F. *et al.* International Union of Basic and Clinical Pharmacology. [corrected]. LXXXIX. Update on the extended family of chemokine receptors and introducing a new nomenclature for atypical chemokine receptors. *Pharmacological reviews* **66**, 1-79 (2014).
24. Zou, Y.R., Kottmann, A.H., Kuroda, M., Taniuchi, I. & Littman, D.R. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* **393**, 595-599 (1998).
25. Tachibana, K. *et al.* The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* **393**, 591-594 (1998).
26. Gerrits, H. *et al.* Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genesis* **46**, 235-245 (2008).
27. Sierro, F. *et al.* Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 14759-14764 (2007).
28. Yu, S., Crawford, D., Tsuchihashi, T., Behrens, T.W. & Srivastava, D. The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **240**, 384-393 (2011).
29. Hao, H. *et al.* Loss of Endothelial CXCR7 Impairs Vascular Homeostasis and Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction: Implications for Cardiovascular Drug Discovery. *Circulation* **135**, 1253-1264 (2017).
30. Ishizuka, M. *et al.* CXCR7 ameliorates myocardial infarction as a beta-arrestin-biased receptor. *Sci Rep* **11**, 3426 (2021).
31. Doring, Y., Pawig, L., Weber, C. & Noels, H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol* **5**, 212 (2014).
32. Proudfoot, A.E.I., Johnson, Z., Bonvin, P. & Handel, T.M. Glycosaminoglycan Interactions with Chemokines Add Complexity to a Complex System. *Pharmaceuticals (Basel)* **10** (2017).
33. Laguri, C., Arenzana-Seisdedos, F. & Lortat-Jacob, H. Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example. *Carbohydr Res* **343**, 2018-2023 (2008).
34. Janowski, M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell Adh Migr* **3**, 243-249 (2009).
35. Connell, B.J. *et al.* Heparan sulfate differentially controls CXCL12 α - and CXCL12 γ -mediated cell migration through differential presentation to their receptor CXCR4. *Sci Signal* **9**, ra107 (2016).

36. Janssens, R., Struyf, S. & Proost, P. The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol* **15**, 299-311 (2018).
37. Amara, A. *et al.* Stromal cell-derived factor-1 α associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *The Journal of biological chemistry* **274**, 23916-23925 (1999).
38. Laguri, C. *et al.* The novel CXCL12 γ isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and CXCR4. *PloS one* **2**, e1110 (2007).
39. Rueda, P. *et al.* The CXCL12 γ chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. *PloS one* **3**, e2543 (2008).
40. Sadir, R., Baleux, F., Grosdidier, A., Imberty, A. & Lortat-Jacob, H. Characterization of the stromal cell-derived factor-1 α -heparin complex. *The Journal of biological chemistry* **276**, 8288-8296 (2001).
41. O'Boyle, G., Mellor, P., Kirby, J.A. & Ali, S. Anti-inflammatory therapy by intravenous delivery of non-heparan sulfate-binding CXCL12. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**, 3906-3916 (2009).
42. Balabanian, K. *et al.* Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. *Blood* **119**, 5722-5730 (2012).
43. Gravel, S. *et al.* The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. *J Biol Chem* **285**, 37939-37943 (2010).
44. Farbehi, N. *et al.* Single-cell expression profiling reveals dynamic flux of cardiac stromal, vascular and immune cells in health and injury. *Elife* **8** (2019).
45. Pinto, A.R. *et al.* Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circulation research* **118**, 400-409 (2016).
46. Franco, D., Rueda, P., Lendinez, E., Arenzana-Seisdedos, F. & Caruz, A. Developmental expression profile of the CXCL12 γ isoform: insights into its tissue-specific role. *Anat Rec (Hoboken)* **292**, 891-901 (2009).
47. Ray, P. *et al.* CXCL12- γ in primary tumors drives breast cancer metastasis. *Oncogene* **34**, 2043-2051 (2015).
48. Chang, C.W., Seibel, A.J., Avendano, A., Cortes-Medina, M.G. & Song, J.W. Distinguishing Specific CXCL12 Isoforms on Their Angiogenesis and Vascular Permeability Promoting Properties. *Adv Healthc Mater* **9**, e1901399 (2020).
49. Sadir, R., Imberty, A., Baleux, F. & Lortat-Jacob, H. Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* **279**, 43854-43860 (2004).
50. Rupp, C. *et al.* Mouse endosialin, a C-type lectin-like cell surface receptor: expression during embryonic development and induction in experimental cancer neoangiogenesis. *Cancer Immun* **6**, 10 (2006).
51. Naylor, A.J. *et al.* A differential role for CD248 (Endosialin) in PDGF-mediated skeletal muscle angiogenesis. *PloS one* **9**, e107146 (2014).
52. Muhl, L. *et al.* Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination. *Nat Commun* **11**, 3953 (2020).
53. Mouton, A.J. *et al.* Fibroblast polarization over the myocardial infarction time continuum shifts roles from inflammation to angiogenesis. *Basic Res Cardiol* **114**, 6 (2019).

54. Miao, Z. *et al.* CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15735-15740 (2007).
55. Zhang, M. *et al.* CXCL12 enhances angiogenesis through CXCR7 activation in human umbilical vein endothelial cells. *Sci Rep* **7**, 8289 (2017).
56. Kollmar, O. *et al.* CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer* **126**, 1302-1315 (2010).

Acknowledgements

We thank Carmen Marchiol, Franck Lager and Gilles Renault (Plateforme Imagerie du Vivant, Institut Cochin, INSERM, Paris, France) for their help in echocardiography measurements. We are grateful to Françoise Bachelerie (Clamart, France) for helpful discussion and for providing Akr3-GFP animals. We thank Cécile Badoual and Marion Mandavit (Paris, France) for their help regarding the RNAscope assay. This work was supported by INSERM, Université de Paris, Programme doctoral AMX école polytechnique (V.D.), Fondation pour la Recherche Médicale (V.D. and P.A). This project has also received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 846519 (S.M.C.).

Author contributions

V.D. performed experiments, acquired, and interpreted the data, and wrote the manuscript. P.A. and S.C. carried out AAV injections and *in vitro* experiments. C.C. performed single cell RNA analysis. P.B. performed some echocardiography analysis. M.L. performed staining of tissues and data analysis. J.V. performed qPCR and data analysis. K.B. and F.A.S provided *Cxcr4*^{WT/1013}, *Akr3*-GFP and *Cxcl12*^{gagtm/gagtm} mice. J.S.S. and A.L. designed the experiments, analyzed, and interpreted data, and wrote the manuscript.

Supplementary information

Supplementary methods

Myocardial infarction

Myocardial infarction was induced by ligation of the left anterior descending artery, as previously described¹. Mice were anesthetized by peritoneal injection of ketamine (100 mg per kg body weight; Ketamine 1000, Vibrac) and Xylazine (10 mg per kg body weight; Xylazine 2%, Bayer) and intubated and ventilated with air using a small animal respirator (SAR 830/AP Ventilator, CWE Incorporated, Ardmore, USA). Body temperature was maintained to 37°C using a homeothermic blanket system (Harvard Apparatus). The chest wall was shaved and a thoracotomy was performed in the fourth left intercostal space. The left ventricle was localized and the pericardial sac was opened. The left anterior descending artery was permanently ligated using a 7/0 PVDF monofilament suture (Peters surgical, France) 5 mm below the site of its emergence from the left atrium. Permanent whitening of the myocardium below the ligation was considered indicative of a successful coronary occlusion. The thorax and the skin were closed with 6/0 PVDF monofilament sutures (Peters surgical, France), with local application of lidocaine (Lidocaine 20 mg/mL, Aguettant). The same procedure was performed on sham-operated control mice except that the ligation around the coronary artery was not tightened. The endotracheal tube was removed once spontaneous respiration resumed, and mice were placed on a warm pad maintained at 37°C until completely vigilant. To reduce pain, Buprenorphine (0.1 mg/kg) was injected before and 6 hours after the onset of surgery.

To investigate ACKR3 activation *in vivo*, C57B6/J mice received intra-peritoneal administration of TC14012 (Tocris Biosciences, Bristol, UK), a chemical ACKR3 agonist, at a dose of 10 mg/kg every 6 days for 28 days following MI.

Adeno-associated virus engineering and delivery

AAV2/9 vectors encoding *Cxcl12* isoforms were generated from a pcDNA3.1 expression vector containing the reading frames (ORF) for mouse *Cxcl12*α (AAV2/9-CMV- *Cxcl12*α), *Cxcl12*γ (AAV2/9-CMV- *Cxcl12*γ) or mouse *Cxcl12*γ lacking the specific sequences for canonical heparan-sulfate binding motifs (AAV2/9-*Cxcl12*γmut). AAV2/9-CMV-GFP was used as control (Centre de production des vecteurs viraux, Nantes, France). Vector preparations were determined as viral genome per milliliter (vg/ml). Two weeks prior the induction of MI, AAV

were delivered by transcutaneous echocardiography-guided intra-myocardial injections. Briefly, animals were anesthetized with isoflurane inhalation and fixed in a supine position on a heating pad. Four injections (10 μ L each) were carried out at four different points of the anterior wall of the left ventricle for a total of 1.5×10^{10} vg injected. Injections were performed with a syringe fitted with a 27-gauge BD Eclipse needle (Becton Dickinson, USA) using a micromanipulator system (VisualSonics, Canada), as previously described ².

Echocardiography

Cardiac function was assessed 28 days after MI. Briefly, upon anaesthesia with isoflurane, cardiac function was recorded using a VEVO 2100 Imaging System and a MS400 transducer appropriate for mouse cardiovascular imaging (18–38 MHz) (VisualSonics, Canada). Data were analysed using the cardiac package in VEVO-Lab (VisualSonics, Canada). Left ventricular end-diastolic volume (EDV) and end-systolic volume (ESV) were calculated on cine-loops using the 2-dimensional area-length method, allowing the calculation of left ventricular ejection fraction (EF) as $EF (\%) = [(EDV - ESV) / EDV] \times 100$.

Immunohistochemistry

For evaluation of cardiac remodelling, left ventricles were isolated, rinsed in Phosphate Buffer Solution (PBS), embedded in Optimal Cutting Temperature compound (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Netherlands), and frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Tissues were sectioned using cryostat (CM 3050S, Leica) at 8 μ m thickness. Every 500 μ m, 8 to 10 sections were obtained for each left ventricle. Masson's trichrome and Sirius Red staining were performed to assess infarct size and interstitial fibrosis, respectively. Infarct size was calculated as the ratio of infarcted surface over the total surface of the left ventricle. Interstitial fibrosis was calculated as the ratio of the total areas of interstitial fibrosis to the total area of the left ventricular section. Bright-field images were acquired using a Nanozoomer 2.0HT Digital slide scanner and processed using NDP.view2 viewing software (Hamamatsu Photonics, Japan). Capillary density per field was calculated as the ratio of capillary (endothelial cells stained with Dylight 594-conjugated Griffonia simplicifolia Isolectin B4, Agglutinin, Vector, 1/100) to cardiomyocyte (stained with FITC-conjugated Wheat Germ Agglutinin, Vector, 1/200). Eight images analysed per mouse. Cardiomyocyte hypertrophy was evaluated by measuring individual cardiomyocyte circumference and surface.

In corresponding experiments, heart cryo-sections were fixed with 4% paraformaldehyde (30 min, room temperature), permeabilized (PBS 0.1% saponin, 30 min at room temperature), then blocked (PBS 0.2% saponin, 5% donkey serum, 1h at room temperature). Sections were then incubated overnight at 4°C with an anti-GFP chicken polyclonal antibody (Thermo-Scientific, #A10262, 1/1000 dilution in PBS 1% donkey serum, 0.2% saponin). Sections were washed 3 times with PBS and incubated 1h at room temperature with an anti-chicken secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 647 (1/500 dilution in PBS 1% donkey serum, 0.2% saponin). After 3 washes, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to stain cell nuclei. Slides were then mounted (Mowiol 4-88, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) and images acquired on a confocal microscope (Leica TCS SP8, LAS X software, Leica microsystems, Germany).

RNA isolation and quantitative real-time PCR

Total RNAs were purified using TRizol (Life technologies) and reverse transcribed with random hexamer using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germany). Quantitative PCR was performed using SYBR Green detection (SensiFAST SYBR No-ROX Kit, Biorline) with a Step-One Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems). PCR primers were listed in the supplementary Table 1. Expression levels were normalized to that of the control group.

RNA *in situ* hybridization assay

Semi-quantitative *in-situ* detection of RNA was performed on 8 μm-thick frozen heart section using the RNAScope Multiplex Fluorescent V2 assay (#32087, Advanced Cell Diagnostics). Briefly, frozen heart sections were fixed using 4% paraformaldehyde, hydrogen peroxide and protease IV, at room temperature. Hybridization and amplification steps were then performed at 40°C in HybEZ hybridization system with RNAScope probes for mouse *Cxcl12*α (#460921), *Cxcl12*γ (#580221-C3) or *AckR3* (#482561). Positive (#320881) and negative control probes (#320871) were also used. In a specific set of experiments, slides were washed (Tris-Buffered Saline 0.1% Tween 20, TBST) and blocked (TBST 5% donkey serum, overnight, 4°C). Slides were then incubated with primary antibodies directed against PDGFRα (#AF1062, R&D) or VE-cadherin (#AF1002, R&D) (1/100) in TBST, 1% donkey serum for 2h at room temperature. Sections were then washed with TBST and incubated with Alexa Fluor 555-conjugated anti-goat antibody (Thermo Fisher Scientific, 1/250, 30 min, room temperature). After PBS washes, DAPI was used to stain cell nuclei. Slides were then mounted with ProLong Diamond Antifade

Mountant (Thermo Fisher Scientific), images acquired on confocal microscope (Leica TCS SP8, LAS X software, Leica microsystems, Germany) and analysed with ImageJ.

Isolation of cardiac fibroblasts

Cardiac fibroblasts were isolated and cultured using a modified version of a previously published protocol³. Briefly, the left ventricle was flushed with an EDTA buffer (5 mM EDTA, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 500 nM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 10 mM 2,3-Butanedione 2-monoxime, and 10 mM Taurine, pH 7.8) and the right ventricle was flushed with a perfusion buffer (1 mM MgCl₂, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 500 nM NaH₂PO₄, 10 mM HEPES, 10 mM Glucose, 10 mM 2,3-Butanedione 2-monoxime, and 10 mM Taurine, pH 7.8). The heart was then minced with a scalpel blade before digestion (Collagenase II and IV (Worthington) at 1 mg/mL, protease XIV (Sigma) at 0.1 mg/mL diluted in perfusion buffer, 30 min, 37°C). Digestion was stopped with perfusion buffer supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS). The cell suspension was filtered on a 100 μ m strainer before a step of gravity settling for 20 min. Supernatant containing non-cardiomyocyte cells was collected, washed twice, and suspended in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% FBS. For fibroblast isolation, TER119-CD45-CD31-CD90⁺Sca-1⁺MEFSK4⁺ cells were sorted by flow cytometry. For cell culture, the cells were seeded into 24 well-plate for 24h to allow selective fibroblast adhesion. After 24 hours, unattached and dead cells were removed and fresh medium was added and changed every 48 hours.

Preparation of conditioned media and cell cultures

Mouse endothelial cells (SVEC4-10, CRL-2181, ATCC, USA) were grown in complete medium (DMEM, 30-2002, ATCC,) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin (ThermoFisher Scientific). Cells were incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

Cardiac fibroblasts were seeded in 24-well plate in complete medium and incubated at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Upon 80% confluence (4 to 6 days after plating), cells were washed with FBS-Free DMEM and pre-treated with or without 1 μ M AMD3100 (Sigma, USA) or 10 μ g/mL neutralizing ACKR3 antibody clones 11G8 (R&D Systems) and 9C4 (Creative Biolabs). Cells were then stimulated with FBS-free DMEM with or without 100 nM CXCL12 α or CXCL12 γ mouse recombinant proteins (R&D systems) for 48 hours. At the end of the incubation, conditioned media (CM) were collected and stored at -80°C.

Flow cytometry

The left ventricles were collected, minced with fine scissors, and gently pushed through the Bel-Art Scienceware 12-Well Tissue Disaggregator (ThermoFisher Scientific). Cells were then passed through a 40 μ m nylon mesh and washed with PBS 1% FBS. Red blood cell lysis was performed with Red Blood Cell Lysis Buffer (Sigma, USA). Cells were counted and used for FACS sorting or analyser, as previously described⁴. Single-cell suspensions were stained with fluorophore-conjugated antibodies in phosphate buffered saline at 4°C. FACS antibodies are listed in supplementary Table 2. The total number of cells was then normalized to left ventricle weight. Samples were analysed using a flow cytometer (LSR Fortessa-X20, BD Biosciences) and FlowJo software (BD Biosciences).

Vascular tube formation assay

SVEC4-10 cells were serum starved in FBS-free DMEM for 12 hours. Forty eight-well plates were coated with 100 μ l of growth factor-reduced Matrigel (356231, Corning, NY, USA) for 1 hour at 37°C. SVEC4-10 cells were seeded (1×10^4 cells per well) and incubated with CM for 4 hours. The tubular branches were then imaged under EVOS bright field microscope (Thermofisher). Vascular tube formation was assessed by counting the total length of tubular branches in 3 fields per well using ImageJ software (NIH, USA).

Cell proliferation assay

Cell proliferation was measured using DAPI (Thermofisher). Briefly, 2,500 cells were seeded per well of a 96-well plate and incubated at 37°C for 24 hours. Cells were then starved for 2h in FBS-free DMEM and incubated with CM for 2 hours. Cells were washed (PBS), fixed (4% paraformaldehyde) and stained with DAPI. Cells were imaged (EVOS fluorescence microscope, Thermofisher) and cell density was assessed by counting the number of nuclei per field (3 fields per well) using ImageJ software (NIH, USA).

Scratch wound assay

SVEC4-10 cells (2.1×10^4 cells) were seeded into each chamber of 24-well plate containing 2-well culture inserts (Ibidi GmbH, Germany) and grown in DMEM 10% FBS 1% penicillin/streptomycin. Upon confluence, cells were serum-starved for 2 hours and the insert was removed. Cells were rinsed and incubated with CM.

To evaluate cell migration, the surface of the acellular gap was evaluated immediately after removing the inserts and then every 2 hours. Images were collected on an EVOS microscope (Thermofisher) and quantifications performed with ImageJ (NIH, USA).

Angiogenesis protein array

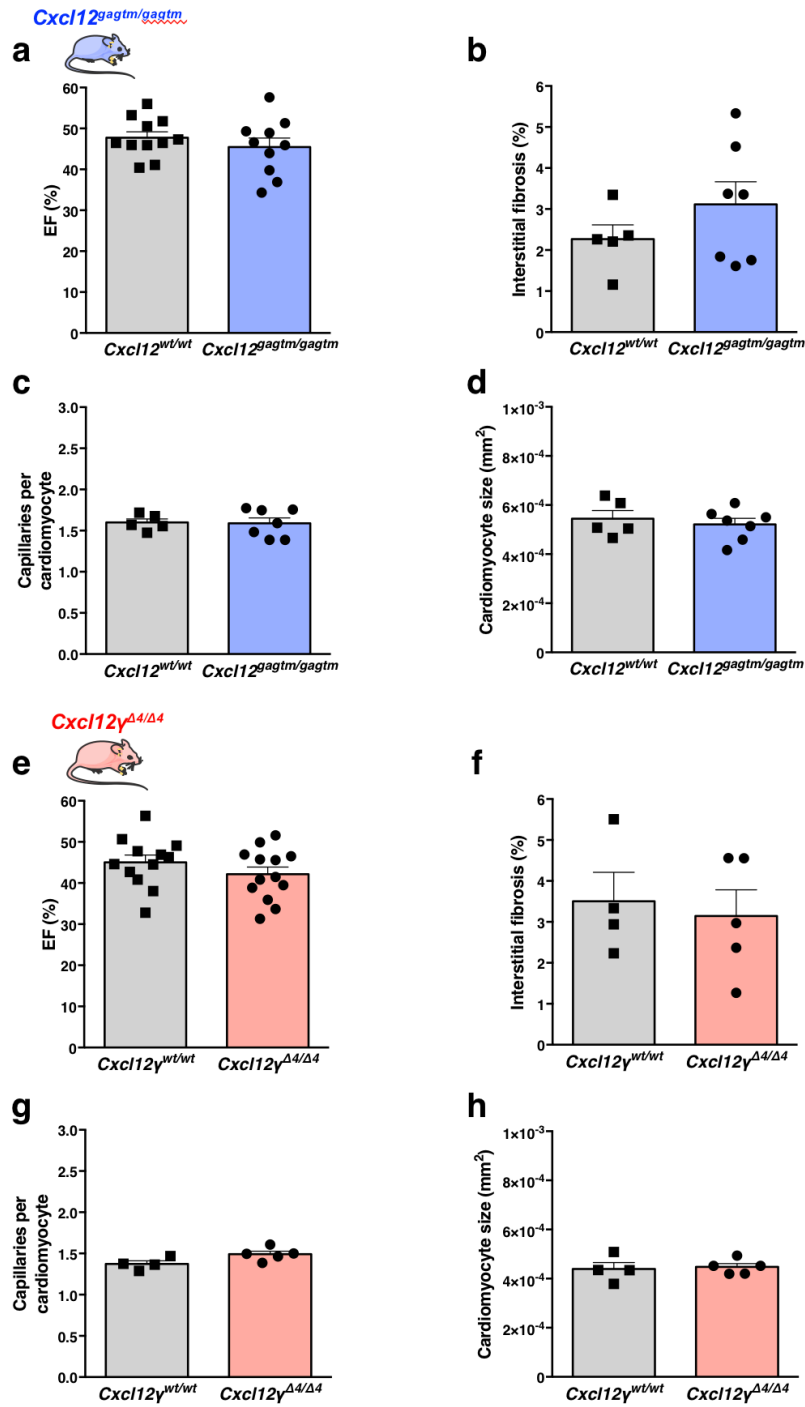
The Proteome Profiler Mouse Angiogenesis Array Kit (#ARY015, R&D) was used to assess 53 mouse angiogenesis-related proteins levels within cardiac fibroblast conditioned media (CM). Briefly, a cocktail of biotinylated detection antibodies was mixed with CM overnight at 4°C before incubation with the array membranes overnight at 4 °C. The array membranes are spotted with capture antibodies specific to target proteins. The membranes were then washed, incubated with streptavidin-HRP for 30 min at room temperature and the captured proteins visualized using chemiluminescence after 2 or 10 min exposition.

Zymosan-induced peritonitis in mice

Sterile peritonitis was induced by intraperitoneal injection of 1 mg of zymosan A from *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma-Aldrich, USA). The peritoneal cavity was washed with 1 ml of PBS at 0, 4 and 24 h post-injection and lavage fluid collected. Cells were recovered by centrifugation (1500 rpm, 5 min), counted, and subsequently used for flow cytometry analysis.

Supplementary Figures

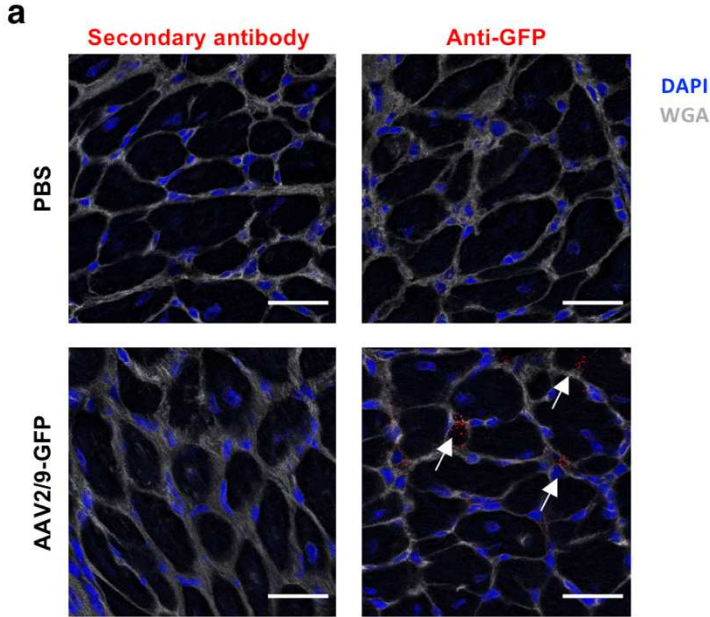
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Evaluation of cardiac function and remodelling in *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* and *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice at steady state.

a) Evaluation of left ventricular ejection fraction (EF) in *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* mice (n=10) and littermate WT control (*Cxcl12^{wt/wt}* n=11) at steady state. **b)** Quantitative analysis of collagen content (*Cxcl12^{wt/wt}* n=5; *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* n=7). **c)** Capillary density quantification (*Cxcl12^{wt/wt}* n=5; *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* n=7) **d)** Cardiomyocyte size measurement (*Cxcl12^{wt/wt}* n=5; *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* n=7). **e)** Evaluation of left ventricular ejection fraction (EF) in *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice (n=13) and littermate WT control (*Cxcl12 $\gamma^{\text{wt/wt}}$* n=12) at steady state. **f)** Quantitative analysis of collagen content (*Cxcl12 $\gamma^{\text{wt/wt}}$* n=4; *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* n=5) **g)** Capillary density quantification (*Cxcl12 $\gamma^{\text{wt/wt}}$* n=4; *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* n=5) **h)** Cardiomyocyte size measurements (*Cxcl12 $\gamma^{\text{wt/wt}}$* n=4; *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* n=5).

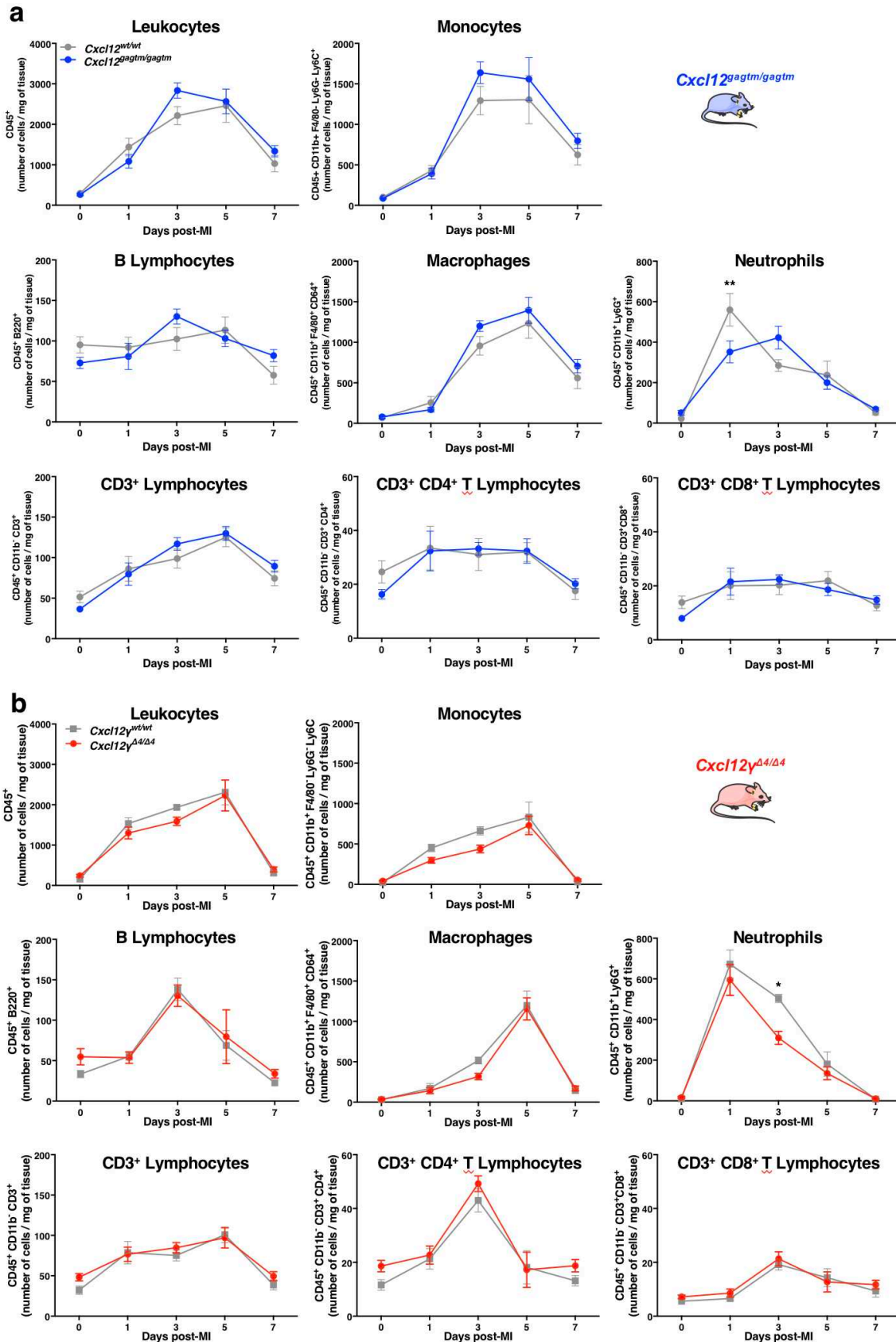
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 2. Validation of adeno-associated virus administration in infarcted hearts.

a) At day 28 after MI, ischemic heart tissue sections were stained either with donkey anti-chicken secondary antibody coupled to AF647 or with anti-GFP polyclonal antibody (Anti-GFP). No staining was detected with secondary antibody whereas cells infected with AAV2/9-GFP (red) were detected using anti-GFP. 40x magnification; Scale bar: 30 μ m. Nuclei were stained with DAPI and capillaries with fluorescent wheat germ agglutinin (WGA) lectin.

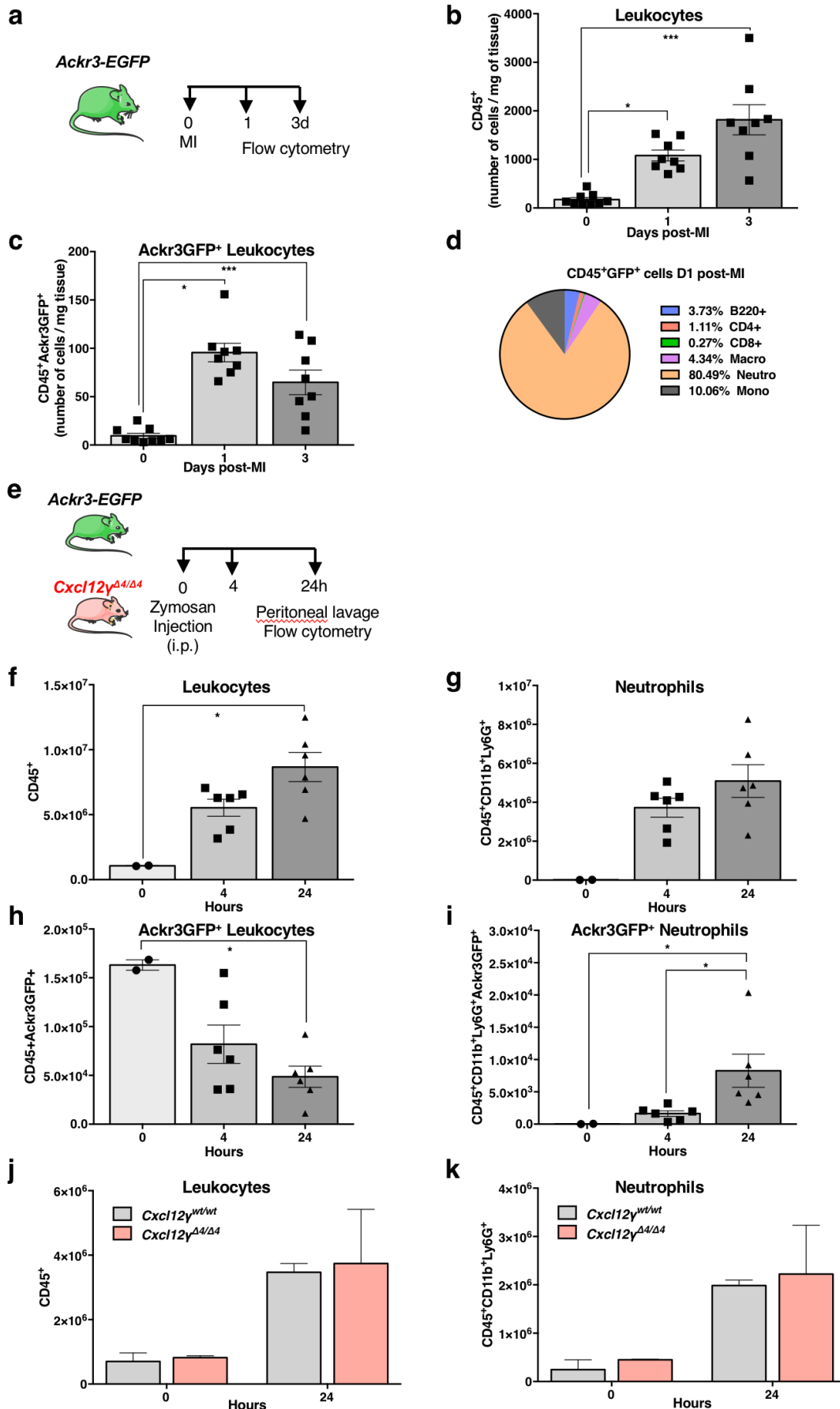
Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3. Effects of CXCL12/HS interactions and CXCL12 γ on inflammatory cell recruitment in infarcted heart.

Quantitative evaluation of cardiac inflammatory cells at different time points after the onset of ischemia in **a)** *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* and their WT littermates mice or **b)** *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* and their WT littermates. n=6~8 for each group, *P<0.05, **P<0.01. P values were calculated using Two-Way ANOVA with Bonferroni correction.

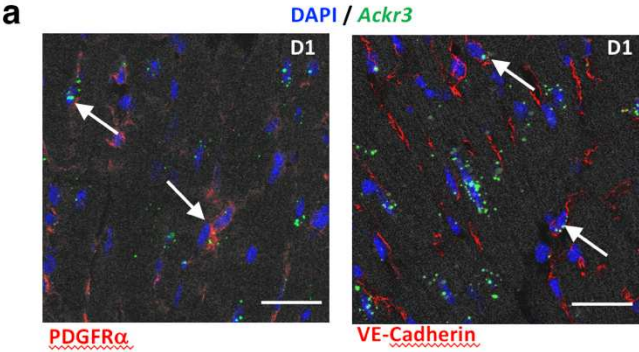
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4. CXCL12 γ does not modulate neutrophil recruitment.

a) *Ackr3-GFP* mice were challenged with acute MI for 1 or 3 days. **b-c)** Quantitative evaluation of the number of inflammatory CD45⁺ (b) and CD45⁺Ackr3GFP⁺ cells (c) in the cardiac tissue at 0, 1 and 3 days after MI. *P<0.05, ***P<0.01. **d)** Percentage (%) of B lymphocyte (B220⁺), CD4⁺ T lymphocytes (CD4⁺), CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺), macrophages (Macro), monocytes (Mono) and neutrophils (Neutro) within CD45⁺ Ackr3GFP⁺ cells at day 1 after MI. **e-h)** Quantitative evaluation of the number of CD45⁺ cells (e), neutrophils (f), CD45⁺ Ackr3GFP⁺ cells (g) and Ackr3GFP⁺ neutrophils (h) in the peritoneal cavity of WT mice treated for 0, 4 or 24 hours with zymosan. *P<0.05. **i-j)** Quantitative evaluation of the number of CD45⁺ cells (i) and neutrophils (j) in the peritoneal cavity of WT and *Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$* mice treated for 0 and 24 hours with zymosan. P values were calculated using Kruskal-Wallis test.

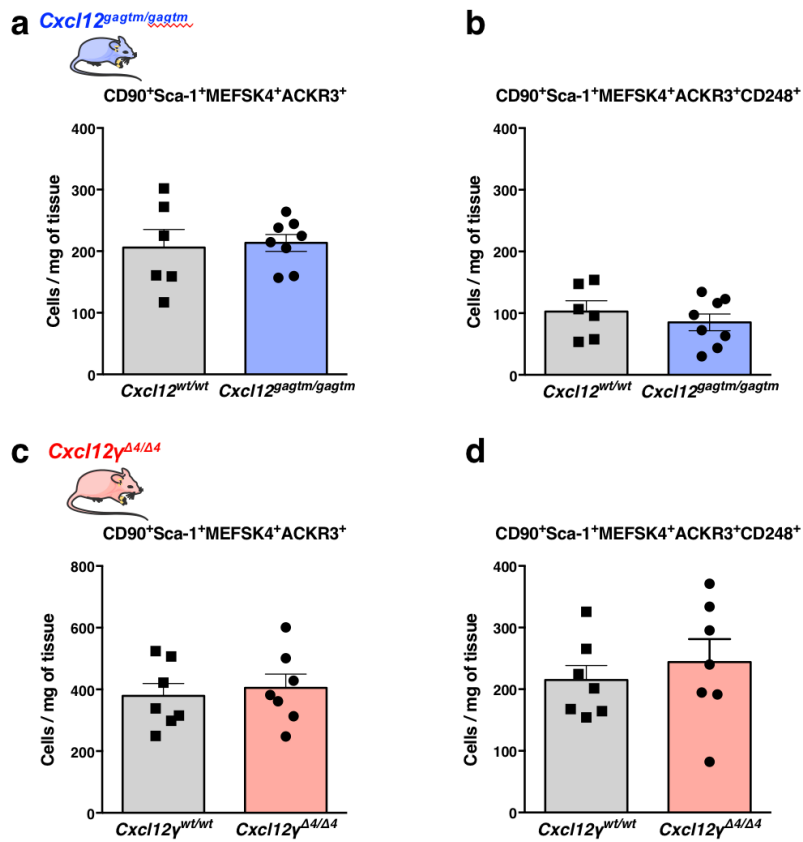
Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5. *Ackr3* is expressed in cardiac fibroblasts and endothelial cells after MI.

Representative photomicrographs showing PDGFRα (grey) or VE-Cadherin (grey) expression to identify vascular smooth muscle cells and endothelial cells, respectively. Fluorescent RNA *in situ* hybridization revealing *Ackr3* mRNA contents (green channel) in heart section. Cell nuclei were stained with DAPI. 40x magnification, Scale bar: 30 μm.

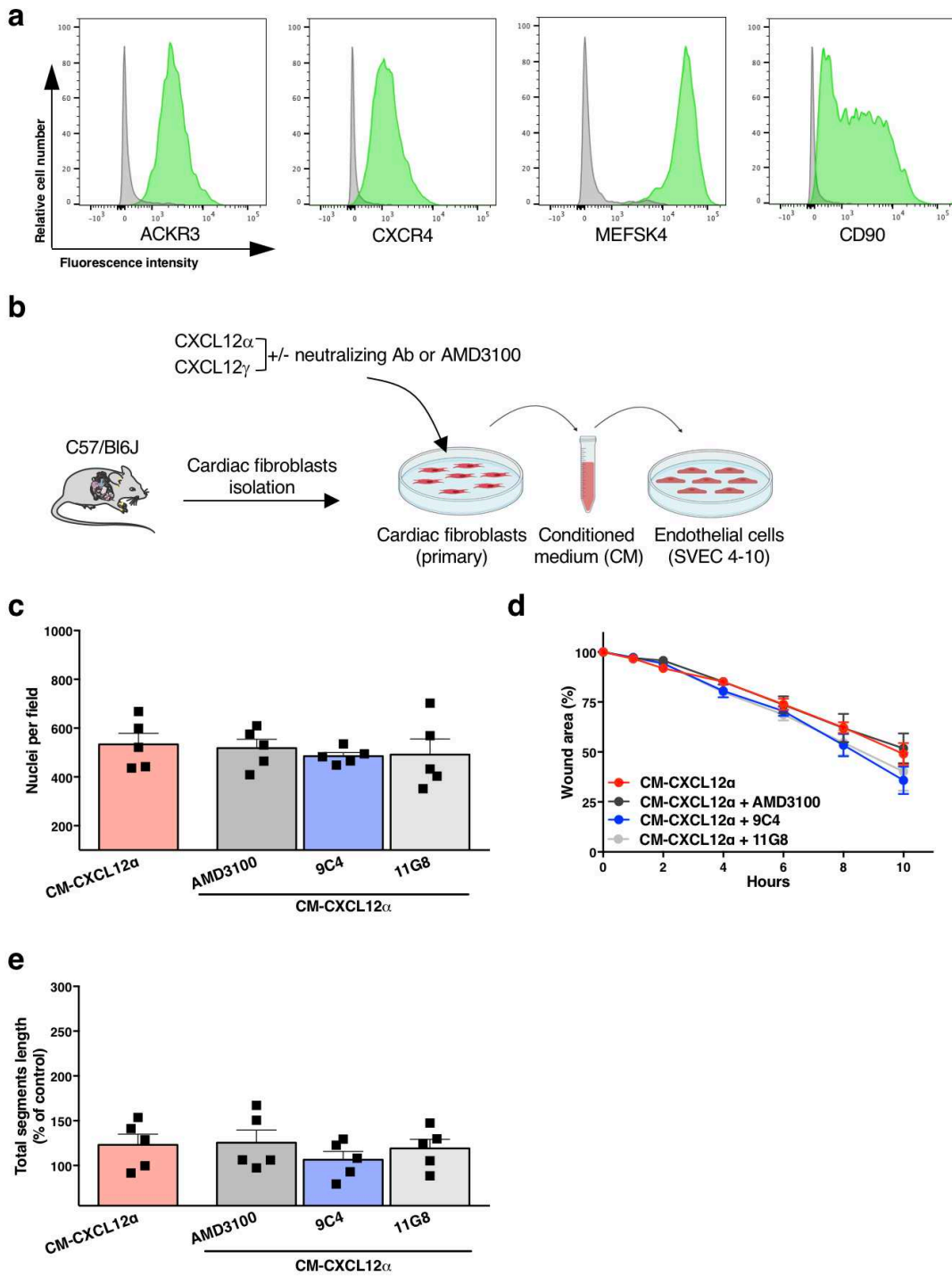
Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6. Cardiac fibroblast number in *Cxcl12*^{gagtm/gagtm} and *Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$ mice.

a-b) Quantification of cardiac fibroblast number identified as CD90⁺Sca-1⁺MEFSK4⁺ACKR3⁺ (a) or CD90⁺Sca-1⁺MEFSK4⁺ACKR3⁺CD248⁺ (b) in *Cxcl12*^{gagtm/gagtm} (n=8) and their WT littermates (n=6-7/group). **c-d)** Quantification of cardiac fibroblast number identified as CD90⁺Sca-1⁺MEFSK4⁺ACKR3⁺ (c) or CD90⁺Sca-1⁺MEFSK4⁺ACKR3⁺CD248⁺ (d) in *Cxcl12* $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$ (n=7) and their WT littermates (n=6 to 7 per group).

Supplementary Figure 7



Supplementary Figure 7. Cultured cardiac fibroblasts and angiogenesis assays.

a) Cell surface expression levels of CXCR4, ACKR3, MEFSK4 and CD90 in cultured cardiac fibroblasts determined by flow cytometry. Grey histogram corresponds to isotype-stained cells.

b) Experimental protocol to evaluate the pro-angiogenic effects of conditioned-media derived from murine cardiac fibroblast.

c-e) Effect of ACKR3 neutralizing antibodies (clones 9C4 or 11G8) or CXCR4 antagonist AMD3100 on cellular density (c), migration (d) and vascular tube formation (e) after CM-CXCL12 α treatment. Data are represented as mean \pm SEM and are representative from 5 independent experiments performed in duplicate.

Supplementary Table 1. Primer sequences used for quantitative real-time PCR.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Gapdh</i>	5-CGTCCCGTAGACAAAATGGTGAA-3	5-GCCGTGAGTGGAGTCATACTGGAACA-3
<i>Cxcl12</i> α	5-GCTGGCCGCGCTCTGCATCAGTGA-3	5-GCACGGGCGAGGGCAGGGATGAAT-3
<i>Cxcl12</i> β	5-TGCACGGCTGAAGAACAACAACAG-3	5-GGGCGTCTGACTCACACCTCTCAC-3
<i>Cxcl12</i> γ	5-TGTGCATTGACCCGAAATTAAGT-3	5-CTTTTCTGGGCAGCCTTTCTCTTC-3
<i>Cxcr4</i>	5-CTGAGGCGTTTGGTGCTCCGGTAA-3	5-ATCCCGGAAGCAGGGTTCCTTGT-3
<i>Ackr3</i>	5-AGGCAAACCACAGCCCAGGAA-3	5-AGTTGCCAGGCTCTGCATAGTCA-3

Supplementary Table 2. Antibodies used for FACS analysis.

Antigen	Dye	Clone	Supplier	References
CD45	Alexa Fluor 700	30 F11	BD Biosciences	560510
CD11b	BV605	M1/70	BD Biosciences	563015
CD45R/B200	PE	RA3-6B2	BD Biosciences	553090
CD45R/B200	BUV496	RA3-6B2	BD Biosciences	564562
IgM	APC	II/41	BD Biosciences	562032
IgM	BV785	II/41	BD Biosciences	743328
CD3	BV421	145-2C11	BD Biosciences	562600
CD3	PE-Cy7	145-2C11	BD Biosciences	552774
CD4	BV650	RM4-5	BD Biosciences	740446
CD8	Percp-Cy5,5	53-6.7	BD Biosciences	551162
Ly6C	APC-Cy7	AL-21	BD Biosciences	560596
Ly6G	BUV395	1A8	BD Biosciences	563978
CD64	BV421	X54-5/7.1	Biolegend	139309
F4/80	APC	CI:A3-1	Bio-RAD	MCA497ACPT
CXCR4	BV711	2B11	BD Biosciences	740734
CXCR7/ACKR3	PE	8F11	Biolegend	391101
CXCR7/ACKR3	PE	10D1	Biolegend	391404
CD31	PerCP-Cy5,5	MEC13.3	Biolegend	102522
TER119	BV510	TER119	BD Biosciences	116237
SCA-1	BUV395	E13-161.7	BD Biosciences	744328
MEFSK4	APC	mEF-SK4	Miltenyi	130-120-802
CD248	Alexa Fluor 594	Polyclonal	BIOSS	Bs-2101R-594
CD90.2	BV711	30-H2	Biolegend	105349

Supplementary references

1. Zouggari, Y. *et al.* B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nature medicine* **19**, 1273-1280 (2013).
2. El Harane, N. *et al.* Acellular therapeutic approach for heart failure: in vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. *European heart journal* **39**, 1835-1847 (2018).
3. 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).
4. Ngkelo, A. *et al.* Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *The Journal of experimental medicine* **213**, 1353-1374 (2016).

4. Discussion, perspectives et conclusion

Discussion

CXCL12 joue un rôle complexe dans l'IM. Plusieurs études ont montré des effets protecteurs mais aussi délétères de CXCL12 dans le remodelage cardiaque post-ischémique⁴³⁹. Ces observations reflètent probablement les effets pléiotropes de la signalisation de CXCL12, l'existence de plusieurs isoformes et le contexte dépendant du type cellulaire. La plupart des études se concentrent sur le rôle de l'axe CXCL12 α /CXCR4. Pourtant, CXCL12 γ est l'isoforme la plus exprimée dans le cœur^{289,290} et présente une forte affinité pour les HS²⁵⁹. Son rôle dans les lésions post-ischémiques est inconnu. Dans ce travail, nous avons mis en évidence un rôle crucial de CXCL12 γ dans la régulation de la réponse réparatrice après un IM par le biais de ses interactions avec les HS et de l'activation de son récepteur ACKR3 exprimé par les fibroblastes cardiaques.

Afin d'étudier la contribution des interactions CXCL12/HS et plus particulièrement le rôle spécifique de CXCL12 γ , nous avons utilisé les souris *Cxcl12^{gagtm/gagtm}*, exprimant *Cxcl12* dépourvu de tous ces sites d'interaction avec les HS et les souris *Cxcl12 $\gamma^{A4/\Delta4}$* , dans lesquelles le gène *Cxcl12 γ* est dépourvu de ces domaines de liaison aux HS dans sa partie C-terminale. Contrairement aux souris *Cxcl12^{-/-}*, *Cxcr4^{-/-}* et *Ackr3^{-/-}* qui présentent une mort périnatale, une organogenèse anormale et un développement vasculaire et cardiaque défectueux^{255,269,333}, les souris *Cxcl12^{gagtm/gagtm}* et *Cxcl12 $\gamma^{A4/\Delta4}$* atteignent l'âge adulte, sont fertiles et présentent une fonction et une morphologie cardiaques normales. Cette absence de phénotype délétère pourrait s'expliquer par la capacité non altérée des CK à induire une signalisation comme cela l'a été montré pour d'autres CK mutées, telle que CCL21⁴⁸⁶, par l'absence de motif de liaison de CXCL12 sur la structure des HS au cours de l'embryogenèse ou encore par la présence des autres isoformes pour le modèle *Cxcl12 $\gamma^{A4/\Delta4}$* .

Dans un modèle expérimental d'IM chez la souris *Cxcl12^{gagtm/gagtm}*, nous avons montré que la perturbation des interactions CXCL12/HS entraîne une diminution de la fonction cardiaque associée à une augmentation de la taille de l'infarctus et à une réduction significative de la fibrose interstitielle et de l'angiogenèse dans le cœur ischémique. Ces résultats montrent pour la première fois le rôle critique des interactions CXCL12/HS dans le remodelage et la fonction cardiaque après un IM. L'expression prédominante de *Cxcl12 γ* dans le cœur ainsi que sa forte affinité avec les HS, nous ont incité à analyser la fonction spécifique de CXCL12 γ dans la réponse à l'IM. L'analyse du phénotype des souris *Cxcl12 $\gamma^{A4/\Delta4}$* après IM, a révélé un phénotype cardiaque similaire à celui des souris *Cxcl12^{gagtm/gagtm}*. En utilisant une stratégie de « gain de

fonction » basée sur l'administration de particules adénovirales codant pour CXCL12 α ou CXCL12 γ , nous avons montré que les deux isoformes induisent des effets bénéfiques sur le remodelage cardiaque en diminuant la taille de l'infarctus, la fibrose et l'hypertrophie. De manière intéressante, CXCL12 γ favorise l'angiogenèse par rapport à CXCL12 α . L'utilisation d'un adénovirus exprimant un mutant de CXCL12 γ dépourvu de ses sites de liaison aux HS (AAV-Cxcl12 γ^{mut}) abolit l'effet sur l'angiogenèse, suggérant un rôle critique des interactions CXCL12 γ /HS dans ce processus. Enfin, l'expression exogène de CXCL12 γ dans les souris Cxcl12^{gagtm/gagtm} et Cxcl12 $\gamma^{\Delta4/\Delta4}$ corrige le phénotype cardiaque délétère observé chez ces souris, confirmant ainsi le rôle protecteur des interactions CXCL12 γ /HS dans la fonction et le remodelage cardiaque post-ischémique. L'effet sur la fibrose observé dans nos modèles murins mutés pour Cxcl12 ou dans les modèles de surexpression peut s'expliquer de plusieurs manières. Plusieurs études ont montré l'implication de CXCL12 dans la fibrose. En effet, il a été démontré que CXCL12 pouvait stimuler la prolifération, l'hypertrophie et la production de collagène par les fibroblastes cardiaques de manière CXCR4 dépendante⁴⁸⁷. De même, dans les maladies inflammatoires et cardiovasculaires, CXCL12 peut contribuer au développement de la fibrose en favorisant une réponse angiocrine pro-fibrotique des fibroblastes ou des cellules endothéliales^{410,416}. Les HS contrôlent l'activité de CXCL12 de manière isoforme-dépendante en modulant directement la liaison et l'activation du récepteur²⁸⁷. Ainsi, la réduction de la fibrose interstitielle observée dans nos modèles murins pourrait s'expliquer par une présentation au récepteur de l'isoforme CXCL12 γ qui serait différente de celle de l'isoforme CXCL12 α dans les fibroblastes ou les cellules endothéliales. Cette présentation de la CK au récepteur pourrait induire des changements conformationnels spécifiques au niveau des récepteurs, liés à l'activation de voie de signalisation pro-fibrotique.

Pour déterminer les mécanismes cellulaires impliqués dans les effets médiés par CXCL12 γ sur la vascularisation cardiaque post-ischémique, nous avons analysé des données de SingleCell-RNAseq et observé une forte expression d'ACKR3 dans les fibroblastes cardiaques. Ces résultats ont été corroborés par d'autres analyses montrant également une expression abondante d'Ackr3 dans les fibroblastes cardiaques^{461,488}. Nous avons identifié six sous-populations (F1 à F6) de fibroblastes cardiaques dont une exprimant fortement Ackr3 et présentant une signature « angiogénique » (F3). Par cytométrie de flux, ACKR3 est exprimé majoritairement au sein des fibroblastes, puis dans les cellules endothéliales et leucocytes. ACKR3 joue un rôle clé dans l'angiogenèse physiologique et pathologique^{321,339,390}. L'expression d'ACKR3 contribue à l'angiogenèse tumorale par la sécrétion de facteurs angiogéniques^{395,489}. De plus, une étude

transcriptomique chez les souris *Ackr3*^{-/-} a identifié des défauts d'expression de facteurs angiogéniques essentiels à la protection des vaisseaux, ou à la croissance et à la survie des cellules endothéliales³³⁹. Par ailleurs, la moitié des fibroblastes ACKR3⁺ sont CD248⁺, autre marqueur identifié comme spécifique de cette sous-population de fibroblastes pro-angiogénique. CD248, ou endosialine, est un marqueur exprimé de façon prédominante sur divers fibroblastes et peut agir comme modulateur de l'angiogenèse⁴⁹⁰. Les souris invalidées pour *Cd248* montrent des défauts de remodelage vasculaire lors de la régénération musculaire⁴⁹¹, renforçant le phénotype « angiogénique » de ces fibroblastes. D'autres études seraient intéressantes à mener pour identifier les caractéristiques phénotypiques des fibroblastes cardiaques ACKR3⁺CD248⁻. Les fibroblastes sont une population de cellules présentant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes et qui dépendent du temps, du tissu et du contexte de la blessure⁴⁹². Les fibroblastes cardiaques présentent des signatures prolifératives, pro-fibrotiques et pro-angiogéniques au cours de l'IM^{485,493}. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggèrent que les fibroblastes cardiaques exprimant ACKR3 pourraient contribuer à l'angiogenèse médiée par CXCL12 γ .

L'activation d'ACKR3 par le TC14012, un agoniste spécifique d'ACKR3 qui déclenche les voies de la β -arrestine, favorise la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse *in vitro*^{436,462,466}. Nous avons montré que l'activation d'ACKR3 après IM *in vivo* avec le TC14012 améliore la fonction cardiaque, réduit la taille de l'IM et augmente la fibrose et la densité capillaire, suggérant un rôle important de l'activation d'ACKR3 dans la réponse angiogénique induite par l'ischémie, en accord avec la littérature⁴⁶³. De même, CXCL12 γ augmente significativement la dissémination des métastases vers des sites distants par rapport aux autres isoformes^{288,296}. Par conséquent, nous avons supposé que la liaison de CXCL12 γ à ACKR3 dans les fibroblastes cardiaques pourrait activer la réponse angiogénique après un IM. Nous avons démontré *in vitro* que l'effet pro-angiogénique des milieux conditionnés issus de fibroblastes cardiaques ACKR3⁺ stimulés avec CXCL12 γ était plus puissant que celui induit par des fibroblastes stimulés avec CXCL12 α .

L'expression d'ACKR3 contribue à l'angiogenèse tumorale par la sécrétion de facteurs angiogéniques^{395,489}. De plus, plusieurs études rapportent que les fibroblastes sont capables de promouvoir l'angiogenèse par la sécrétion de facteurs de croissance et de stimuler la réparation tissulaire^{494,495}. Enfin, nous avons montré que ces effets dépendaient de l'activation d'ACKR3 mais pas de CXCR4 en utilisant des anticorps neutralisant ACKR3 et un antagoniste de

CXCR4. Ainsi, nos résultats indiquent que CXCL12 sécrété de manière autocrine/paracrine dans le cœur infarci agit également par le biais des fibroblastes cardiaques exprimant ACKR3 pour promouvoir la vascularisation post-ischémique. En contradiction avec cette hypothèse, l'étude récente de *Ishizuka et coll.* montre l'absence de phénotype cardiaque chez des souris invalidées pour ACKR3 dans les fibroblastes comparé aux souris témoins après un IM⁴⁶¹. Une raison potentielle de cette divergence pourrait être due à un mécanisme compensatoire des cardiomyocytes et des cellules endothéliales exprimant ACKR3. En effet, il a été montré que ACKR3 est exprimé préférentiellement dans les cardiomyocytes, suivis par les fibroblastes^{461,488}. Ainsi, le rôle exercé par les fibroblastes pourrait être masqué par celui des cardiomyocytes.

Bien que nous ayons montré un rôle de l'axe CXCL12 γ /ACKR3 dans les fibroblastes cardiaques pour la vascularisation post-ischémique, les voies de signalisation impliquées dans ce processus sont inconnues. Cependant, il a été montré que CXCL12 γ recrute activement la β -arrestine 2 avec une efficacité supérieure à CXCL12 α et CXCL12 β ²⁹⁶. De même, les effets biologiques médiés par ACKR3 impliquent souvent la β -arrestine 2. On peut supposer que cette voie pourrait être activée lors de la liaison de CXCL12 γ à ACKR3 dans les fibroblastes cardiaques.

Perspectives

Les progrès dans la prise en charge des patients présentant un IM ont permis de fortement réduire la mortalité. Le nombre de patients évoluant vers une insuffisance cardiaque augmentant, le défi des nouvelles stratégies thérapeutiques est alors de prévenir les lésions tissulaires de manière à préserver la fonction cardiaque et éviter ou retarder le développement de l'insuffisance cardiaque. Les résultats concernant le rôle critique des interactions CXCL12/HS et celui de l'axe CXCL12 γ -ACKR3 dans le remodelage post-ischémique obtenus au cours de ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives à moyen et long terme. Certaines pistes sont en cours d'exploration pour appréhender les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets observés dans la réponse à l'IM

- Étude des mécanismes moléculaires régulant l'angiogenèse médiée par CXCL12 γ

L'isoforme CXCL12 γ promeut la revascularisation post-ischémique *in vivo* et l'angiogenèse *in vitro* avec une meilleure efficacité que CXCL12 α . Cependant les mécanismes moléculaires sous-tendant les effets différentiels observés pour ces deux isoformes sont inconnus. Pour éclaircir ce point, nous avons débuté une analyse comparative par RNAseq de fibroblastes stimulés ou non avec CXCL12 α ou CXCL12 γ , afin de déterminer les gènes et les voies de signalisation différentiellement modulées dans ces cellules. L'analyse des ARN issus de fibroblastes prétraités par des inhibiteurs de CXCR4 ou ACKR3 nous permettra d'analyser la contribution spécifique de chaque récepteur dans les modulations observées. Nous avons identifié certains facteurs préférentiellement sécrétés par les fibroblastes stimulés avec CXCL12 γ tels que CCL2, MMP3, PIGF2, ET-1, OPN ou IGFBP2 et certains facteurs diminués tels que TSP-2 et PEDF/Serp1F1. En fonction des voies identifiées par ces analyses, nous pourrions agir sur ces dernières *via* des approches *in vivo* et *in vitro* de blocage, stimulation et invalidation pour confirmer leur implication dans l'angiogenèse médiée par CXCL12 γ et ACKR3.

- Étude du rôle de ACKR3 dans les cardiomyocytes et les fibroblastes

Nos données ainsi que celles d'autres équipes ont relevé l'expression d'ACKR3 dans les cardiomyocytes, le type cellulaire majoritaire dans le cœur. Afin d'évaluer le rôle d'ACKR3 dans les cardiomyocytes, nous avons généré une souris invalidée spécifiquement pour *Ackr3* dans les cardiomyocytes (*Cxcr7^{fllox/fllox}xMyh6Cre⁺*). Les résultats préliminaires obtenus montrent une forte diminution de la fonction cardiaque dans les animaux mutants, associée à une

dilatation ventriculaire massive. Les effets concernant la fonction cardiaque sont cohérents avec ceux publiés récemment par *Ishizuka et Coll.*⁴⁶¹. Par ailleurs, nous montrons une réduction importante de l'angiogenèse (Figure 29).

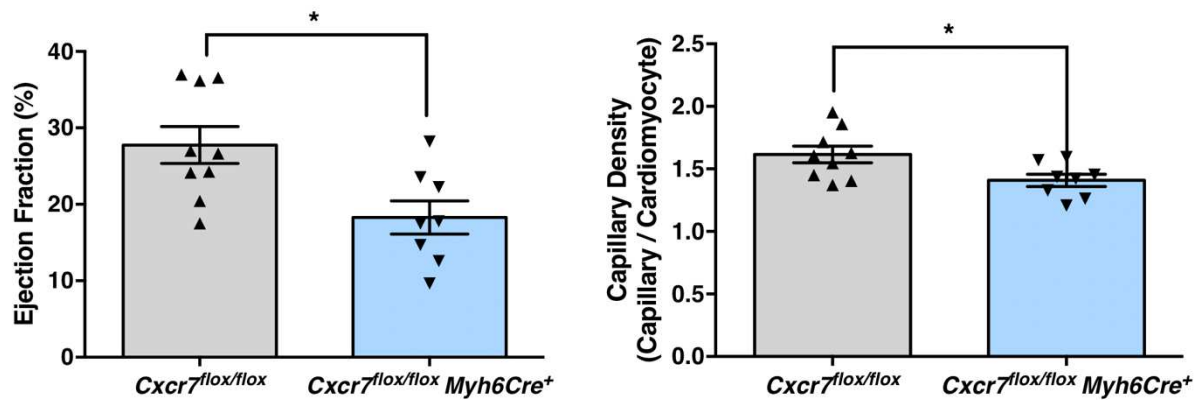


Figure 29 Fonction cardiaque et remodelage après IM dans un modèle *Cxcr7^{flox/flox}xMyh6Cre⁺*
Étude de la fonction cardiaque (fraction d'éjection) et mesure de la densité capillaire dans le cœur d'animaux *Cxcr7^{flox/flox}xMyh6Cre⁺* et leur contrôles 28 jours après IM. (* P<0.05)

Ces résultats indiquent un effet protecteur de ACKR3 dans les cardiomyocytes après l'IM et soulignent une fois de plus le rôle majeur de ACKR3 dans le remodelage cardiaque post-ischémique. Récemment, il a été décrit des interactions fonctionnelles entre ACKR3 et la Connexine 43 (Cx43) dans les astrocytes participant à la régulation de l'activité électrique neuronale³³¹. La Cx43 est une protéine de jonction communicante, très exprimée à la membrane cellulaire des cardiomyocytes comme au niveau des mitochondries. Il a été montré que la Cx43 est impliquée dans la protection cellulaire face à l'ischémie⁴⁹⁶, et que l'altération de son expression provoque des effets délétères⁴⁹⁷. Par ailleurs, des travaux plus récents indiquent une contribution de la Cx43 dans les interactions entre les cardiomyocytes et les myofibroblastes⁴⁹⁸. Il serait intéressant d'étudier la façon dont ACKR3 et la Cx43 peuvent interagir au sein des cardiomyocytes, et si ces interactions ont un rôle bénéfique ou délétère dans le contexte de l'IM.

- Effet de CXCL12 γ dans la régénération cardiaque

En parallèle, de l'étude de l'axe CXCL12/CXCR4/ACKR3 dans l'IM chez la souris adulte, j'ai recherché le rôle des interactions CXCL12/HS et celui de CXCL12 γ dans la régénération cardiaque. La souris adulte possède une très faible capacité de régénération cardiaque. Nous avons donc développé un modèle de régénération cardiaque chez les nouveau nés induite par une atteinte cardiaque consécutive à une ligature permanente de l'artère coronaire à P1 (soit environ 24 à 36 heures après la naissance) avec l'aide de Paul Alayrac, doctorant dans l'équipe. En effet, le cœur de souriceau affiche un potentiel de régénération transitoire.

Dans nos modèles $Cxcl12^{gagtm/gagtm}$ et $Cxcl12^{\Delta4/\Delta4}$, l'IM chez le souriceau entraîne une cicatrice plus importante comparée à leurs contrôles WT respectifs, indiquant que CXCL12 γ et les interactions avec les HS jouent un rôle important dans la régénération cardiaque (Figure 30). Par ailleurs, il a été démontré l'implication de CXCL12 et CXCR4 dans la régénération cardiaque et plus particulièrement dans la collatéralisation artérielle après IM chez le souriceau⁴⁹⁹. L'étude du rôle d'ACKR3 dans la régénération cardiaque est en cours. Ainsi, la compréhension de ces mécanismes dans la régénération cardiaque chez le nouveau-né peut nous aider à identifier des mécanismes de réparation pouvant être transposés à l'adulte et ouvrir ainsi la voie à de nouvelles approches.

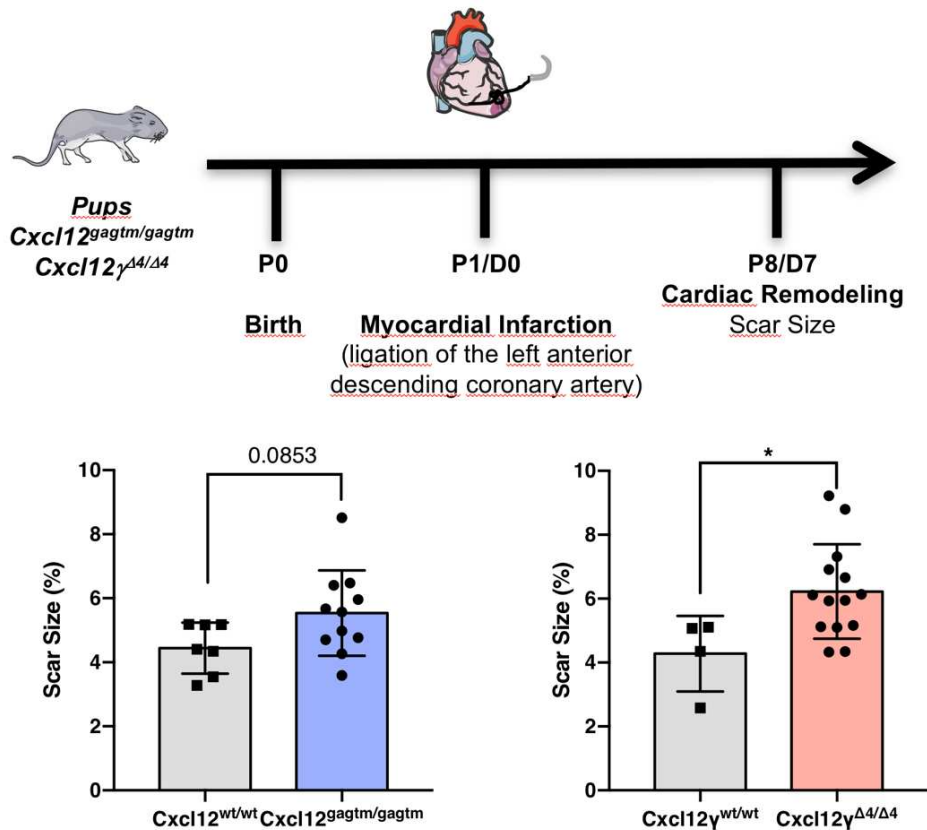


Figure 30 Implication de CXCL12 γ dans la régénération cardiaque (Haut) Schéma expérimental : un IM est réalisé chez des souriceaux à P1 soit 24h après la naissance par ligature de l'artère coronaie. Les animaux sont sacrifiés 7 jours plus tard. (Bas) Quantification de la taille de la cicatrice 7 jours après l'infarctus chez des animaux $Cxcl12^{gagtm/gagtm}$ et $Cxcl12^{\Delta4/\Delta4}$ et leurs contrôles respectifs. * P<0.05.

- GAGs et remodelage post IM

Étant donné le rôle majeur des GAGs et des HS dans la régulation de la fonction des CK et en particulier CXCL12, on peut se demander comment les modulations des GAGs peuvent influencer le remodelage cardiaque post-ischémique. Les syndecans, une famille de GAGs membranaires composés d'un domaine extracellulaire sur lequel sont liées plusieurs chaînes

d'HS ont été particulièrement étudiés dans ce contexte. Après l'IM, il y a une augmentation d'expression de ces syndecans, capables de lier les CK mais également de nombreux autres facteurs. Ainsi, il a été démontré une contribution des syndecans dans le développement de la fibrose cardiaque à travers notamment une action directe sur les fibroblastes⁵⁰⁰⁻⁵⁰³. En raison de leur participation à de nombreuses voies de signalisation, la contribution des GAGs dans le remodelage cardiaque post-IM va bien au-delà de leur simple rôle « d'ancrage » des chimiokines⁵⁰⁴.

- Autres ligands et interactions de ACKR3

ACKR3 possède une multitude de ligands comme CXCL11, MIF, l'adrénomédulline, des peptides dérivés d'opioïdes. ACKR3 est capable de réguler les concentrations de ces molécules par son activité scavenging. De la même manière que pour CXCL12³²⁹, cela a été démontré pour CXCL11 avec des modulations dans la signalisation CXCR3-CXCL11⁵⁰⁵. Ainsi, la séquestration de CXCL11 par ACKR3 pourrait limiter la signalisation pro-inflammatoire dépendante de CXCR3. ACKR3 peut également lier MIF (macrophage migration inhibitory Factor), une cytokine présentant des effets pro-inflammatoires^{303,506,507}. Les modèles *Mif*^{-/-} ne montrent pas de défaut de développement mais sont associés au développement d'une hypertrophie ventriculaire et d'une fibrose cardiaque progressive avec l'âge⁵⁰⁸. Cela suggère une contribution de MIF dans le remodelage cardiaque. Dans l'IM, l'expression de MIF par les cellules cardiaques résidentes est associée à une stimulation d'expression de facteurs pro-fibrotiques par les fibroblastes cardiaques et une promotion de la survie des cardiomyocytes⁵⁰⁹. En revanche, lors d'une ischémie prolongée, la contribution de MIF est délétère en soutenant une inflammation élevée⁵¹⁰. L'étude des interactions entre ACKR3 et ses autres ligands pourrait permettre de mieux comprendre son rôle de récepteur de chimiokines dans la réponse à l'IM.

- Le potentiel thérapeutique de CXCL12 γ

Les résultats obtenus au cours de ces travaux indiquent que CXCL12 γ présente un potentiel angiogénique supérieur à CXCL12 α et permet un meilleur remodelage cardiaque post-ischémique. Il est important de noter que la plupart des études faites sur CXCL12 ne prennent pas en compte l'existence des différentes isoformes ou ne considèrent que l'isoforme CXCL12 α . En effet, grâce à son long domaine C-terminal, CXCL12 γ est moins exposé à la dégradation par les MMPs et, en raison de sa grande capacité à se lier aux HS, est moins diffusé dans la circulation ; ceci augmente donc sa demi-vie et renforce son efficacité²⁸⁶. Dans nos

expériences de surexpression via l'injection de particules adénovirales, celles-ci ont été administrées deux semaines précédant l'IM afin de permettre l'expression du transgène. Cependant, des expériences préliminaires d'injection intra-myocardique de particules virales en périphérie de la zone ischémique, immédiatement après la ligature, nous ont également permis de révéler une amélioration de la fonction cardiaque, une réduction de la taille d'infarctus et une augmentation de l'angiogenèse dans les animaux injectés avec les AAV2/9-CXCL12 γ comparé aux animaux injectés avec AAV2/9-GFP ou AAV2/9-CXCL12 α (Figure 31). Ces résultats sont prometteurs car ils témoignent d'un effet thérapeutique de CXCL12 γ . Il faudrait les répéter, analyser plus en détail le remodelage et évaluer les effets à long terme de l'utilisation de CXCL12 γ pour améliorer le remodelage cardiaque post-IM..

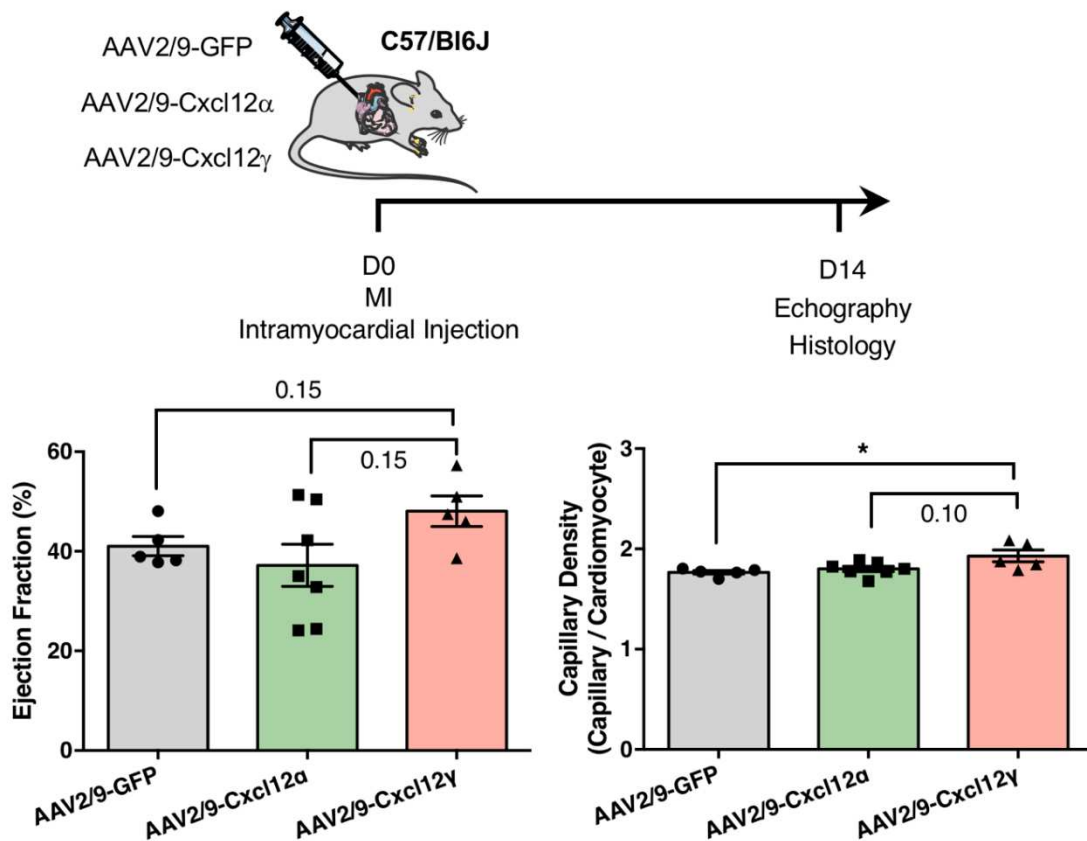


Figure 31 Potentiel thérapeutique de la surexpression de CXCL12 γ

Schéma expérimental : les animaux sont injectés avec des vecteurs viraux contenant CXCL12 α , CXCL12 γ ou un contrôle GFP immédiatement après l'IM, en bordure de la zone ischémique. 14 jours plus tard, une échographie cardiaque est réalisée et les animaux sont sacrifiés pour histologie.

Conclusion

Les interactions entre CXCL12 et les héparanes-sulfates de la matrice extracellulaire jouent un rôle crucial dans le remodelage cardiaque post-ischémique. Nous avons montré que CXCL12 γ , l'isoforme présentant l'affinité pour les HS la plus forte, est essentielle pour la revascularisation post-ischémique du myocarde infarcté et que cet effet est dépendant des interactions CXCL12 γ /HS. De manière intéressante, nous révélons le rôle essentiel des fibroblastes et de l'axe CXCL12 γ /ACKR3 dans la réponse à l'IM. En effet, nous montrons qu'ACKR3 exprimé dans les fibroblastes cardiaques et activé par l'isoforme CXCL12 γ est capable de réguler la sécrétion de divers facteurs pro-angiogéniques soulignant ainsi le potentiel réparateur de l'axe CXCL12 γ /ACKR3. Ces résultats ouvrent la voie à de nouvelles recherches sur la contribution spécifique de CXCL12 γ dans les maladies cardiovasculaires.

Sur le plan thérapeutique, CXCL12 γ pourrait surmonter les limitations observées lors des essais précliniques utilisant CXCL12 α en raison de sa plus grande efficacité à promouvoir la vascularisation dans le myocarde infarcté, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives thérapeutiques pour promouvoir la réparation tissulaire du myocarde après un IM.

5. Bibliographie

1. World Health Organization. World health statistics 2008. Geneva: World health organization; 2008.
2. World Health Organization. World health statistics 2019. Geneva: World health organization; 2019.
3. Yusuf S, Hawken S, Ôunpuu S, Dans T, Avezum A, Lananç F, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *The Lancet*. 2004;364:16.
4. Modin D, Claggett B, Sindet-Pedersen C, Lassen MCH, Skaarup KG, Jensen JUS, et al. Acute COVID-19 and the Incidence of Ischemic Stroke and Acute Myocardial Infarction. *Circulation*. 2020 Nov 24;142(21):2080–2.
5. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Jul;70(1):1–25.
6. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, Mensah GA, Ezzati M, Flaxman A, et al. The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the Global Burden of Disease 2010 study. *Circulation*. 2014 Apr 8;129(14):1493–501.
7. Danchin N, Puymirat E, Aissaoui N, Adavane S, Durand E. [Epidemiology of acute coronary syndromes in France and in Europe]. *Ann Cardiol Angéiologie*. 2010 Dec;59:S37–41.
8. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons-Sel A, Chaitman BR, White HD, et al. Third universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Oct 16;60(16):1581–98.
9. Myocardial Infarction community registers. Public Health in Europe, document No. 5. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 1976.
10. Nomenclature and criteria for diagnosis of ischemic heart disease. Report of the Joint International Society and Federation of Cardiology/World Health Organization task force on standardization of clinical nomenclature. *Circulation*. 1979 Mar;59(3):607–9.
11. Task Force Members, Thygesen K, Alpert JS, White HD, Biomarker Group, Jaffe AS, et al. Universal definition of myocardial infarction: Kristian Thygesen, Joseph S. Alpert and Harvey D. White on behalf of the Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. *Eur Heart J*. 2007 Sep 7;28(20):2525–38.
12. Mendis S, Thygesen K, Kuulasmaa K, Giampaoli S, Mahonen M, Ngu Blackett K, et al. World Health Organization definition of myocardial infarction: 2008-09 revision. *Int J Epidemiol*. 2011 Feb 1;40(1):139–46.
13. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur Heart J*. 2019 Jan 14;40(3):237–69.
14. Saaby L, Poulsen TS, Hosbond S, Larsen TB, Pyndt Diederichsen AC, Hallas J, et al. Classification of Myocardial Infarction: Frequency and Features of Type 2 Myocardial Infarction. *Am J Med*. 2013 Sep;126(9):789–97.
15. Lambrecht S, Sarkisian L, Saaby L, Poulsen TS, Gerke O, Hosbond S, et al. Different Causes of Death in Patients with Myocardial Infarction Type 1, Type 2, and Myocardial Injury. *Am J Med*. 2018 May;131(5):548–54.
16. Gulati R, Behfar A, Narula J, Kanwar A, Lerman A, Cooper L, et al. Acute Myocardial Infarction in Young Individuals. *Mayo Clin Proc*. 2020 Jan;95(1):136–56.
17. Saw J, Mancini GBJ, Humphries KH. Contemporary Review on Spontaneous Coronary Artery Dissection. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Jul;68(3):297–312.

18. Saaby L, Poulsen TS, Diederichsen ACP, Hosbond S, Larsen TB, Schmidt H, et al. Mortality Rate in Type 2 Myocardial Infarction: Observations from an Unselected Hospital Cohort. *Am J Med.* 2014 Apr;127(4):295–302.
19. Cediel G, Gonzalez-del-Hoyo M, Carrasquer A, Sanchez R, Boqué C, Bardají A. Outcomes with type 2 myocardial infarction compared with non-ischaemic myocardial injury. *Heart.* 2017 Apr;103(8):616–22.
20. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med.* 2007;15.
21. 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.* 2018 Jan 7;39(2):119–77.
22. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction—summary article. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Oct;40(7):1366–74.
23. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. *The Lancet.* 1994 Feb;343(8893):311–22.
24. Grüntzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med.* 1979 Jul 12;301(2):61–8.
25. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N Engl J Med.* 1987 Mar 19;316(12):701–6.
26. Garg S, Serruys PW. Coronary Stents. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Aug;56(10):S1–42.
27. Karam N, Bataille S, Marijon E, Tafflet M, Benamer H, Caussin C, et al. Incidence, Mortality, and Outcome-Predictors of Sudden Cardiac Arrest Complicating Myocardial Infarction Prior to Hospital Admission. *Circ Cardiovasc Interv.* 2019 Jan;12(1).
28. Grines CL, Browne KF, Marco J, Rothbaum D, Stone GW, O'Keefe J, et al. A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. The Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med.* 1993 Mar 11;328(10):673–9.
29. Hillis LD, Smith PK, Anderson JL, Bittl JA, Bridges CR, Byrne JG, et al. 2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery: Executive Summary. *J Am Coll Cardiol.* 2011 Dec;58(24):2584–614.
30. Garrett HE, Dennis EW, DeBakey ME. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft. Seven-year follow-up. *JAMA.* 1973 Feb 12;223(7):792–4.
31. Sabik JF, Lytle BW, Blackstone EH, Houghtaling PL, Cosgrove DM. Comparison of saphenous vein and internal thoracic artery graft patency by coronary system. *Ann Thorac Surg.* 2005 Feb;79(2):544–51; discussion 544-551.
32. Adelborg K, Horváth-Puhó E, Schmidt M, Munch T, Pedersen L, Nielsen PH, et al. Thirty-Year Mortality After Coronary Artery Bypass Graft Surgery: A Danish Nationwide Population-Based Cohort Study. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2017 May;10(5).
33. Falk E, Nakano M, Bentzon JF, Finn AV, Virmani R. Update on acute coronary syndromes: the pathologists' view. *Eur Heart J.* 2013 Mar 7;34(10):719–28.
34. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of Plaque Formation and Rupture. *Circ Res.* 2014 Jun 6;114(12):1852–66.

35. Ponnuswamy P, Van Vré EA, Mallat Z, Tedgui A. Humoral and cellular immune responses in atherosclerosis: Spotlight on B- and T-cells. *Vascul Pharmacol*. 2012 May;56(5–6):193–203.
36. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002 Dec;420(6917):868–74.
37. Jennings R, Ganote C. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res*. 1974;35:156–72.
38. Virmani R, Forman MB, Kolodgie FD. Myocardial reperfusion injury. Histopathological effects of perfluorochemical. *Circulation*. 1990 Mar;81(3 Suppl):IV57-68.
39. Ooi DS, Isotalo PA, Veinot JP. Correlation of antemortem serum creatine kinase, creatine kinase-MB, troponin I, and troponin T with cardiac pathology. *Clin Chem*. 2000 Mar;46(3):338–44.
40. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: Metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol*. 1983 Jul;52(2):72–81.
41. Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving Therapies for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Apr;65(14):1454–71.
42. Silvestre J-S, Smadja DM, Lévy BI. Postischemic Revascularization: From Cellular and Molecular Mechanisms to Clinical Applications. *Physiol Rev*. 2013 Oct;93(4):1743–802.
43. Dyson A, Stidwill R, Taylor V, Singer M. Tissue oxygen monitoring in rodent models of shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Jul;293(1):H526-533.
44. Jennings RB, Reimer KA. The Cell Biology of Acute Myocardial Ischemia. *Annu Rev Med*. 1991;42(1):225–46.
45. Xu T, Ding W, Tariq MA, Wang Y, Wan Q, Li M, et al. Molecular mechanism and therapy application of necrosis during myocardial injury. *J Cell Mol Med*. 2018 May;22(5):2547–57.
46. Haunstetter Armin, Izumo Seigo. Apoptosis. *Circ Res*. 1998 Jun 15;82(11):1111–29.
47. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, et al. Programmed Myocyte Cell Death Affects the Viable Myocardium after Infarction in Rats. *Exp Cell Res*. 1996 Aug;226(2):316–27.
48. de Haan JJ, Smeets MB, Pasterkamp G, Arslan F. Danger Signals in the Initiation of the Inflammatory Response after Myocardial Infarction. *Mediators Inflamm*. 2013;2013.
49. Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, Arslan F, Appelman Y, de Kleijn DPV. The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc Res*. 2012 May 1;94(2):276–83.
50. Arslan F, Smeets MB, O’Neill LAJ, Keogh B, McGuirk P, Timmers L, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation*. 2010 Jan 5;121(1):80–90.
51. Ghigo A, Franco I, Morello F, Hirsch E. Myocyte signalling in leucocyte recruitment to the heart. *Cardiovasc Res*. 2014 May 1;102(2):270–80.
52. Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, Kashima Y, Usui F, Morimoto H, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circulation*. 2011 Feb 15;123(6):594–604.
53. Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, Brett J, Morrow B, Morris SA, et al. Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol*. 1992 Mar;262(3 Pt 1):C546-554.

54. Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA. Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med*. 1990 Apr 1;171(4):1155–62.
55. Wang S, Voisin M-B, Larbi KY, Dangerfield J, Scheiermann C, Tran M, et al. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med*. 2006 Jun 12;203(6):1519–32.
56. Boufenzler A, Lemarié J, Simon T, Derive M, Bouazza Y, Tran N, et al. TREM-1 Mediates Inflammatory Injury and Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2015 May 22;116(11):1772–82.
57. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo J-L, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*. 2007 Nov 26;204(12):3037–47.
58. Dewald O, Zymek P, Winkelmann K, Koerting A, Ren G, Abou-Khamis T, et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circ Res*. 2005 Apr 29;96(8):881–9.
59. Santos-Zas I, Lemarié J, Zlatanova I, Cachanado M, Seghezzi J-C, Benamer H, et al. Cytotoxic CD8+ T cells promote granzyme B-dependent adverse post-ischemic cardiac remodeling. *Nat Commun*. 2021 Mar 5;12(1):1483.
60. Zouggar Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guérin C, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med*. 2013 Oct;19(10):1273–80.
61. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*. 2014 Jan 16;40(1):91–104.
62. Ferraro B, Leoni G, Hinkel R, Ormanns S, Paulin N, Ortega-Gomez A, et al. Pro-Angiogenic Macrophage Phenotype to Promote Myocardial Repair. *J Am Coll Cardiol*. 2019 Jun 18;73(23):2990–3002.
63. Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, Moreira MB, Heidt T, Courties G, et al. Proliferation and Recruitment Contribute to Myocardial Macrophage Expansion in Chronic Heart Failure. *Circ Res*. 2016 Sep 16;119(7):853–64.
64. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2011 Jul 25;11(8):519–31.
65. Varda-Bloom N, Leor J, Ohad DG, Hasin Y, Amar M, Fixler R, et al. Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol*. 2000 Dec;32(12):2141–9.
66. Sandanger Ø, Ranheim T, Vinge LE, Bliksøen M, Alfsnes K, Finsen AV, et al. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2013 Jul 1;99(1):164–74.
67. Saxena A, Chen W, Su Y, Rai V, Uche OU, Li N, et al. IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013 Nov 1;191(9):4838–48.
68. Palmer JN, Hartogensis WE, Patten M, Fortuin FD, Long CS. Interleukin-1 beta induces cardiac myocyte growth but inhibits cardiac fibroblast proliferation in culture. *J Clin Invest*. 1995 Jun;95(6):2555–64.

69. Frangogiannis NG, Michael LH, Entman ML. Myofibroblasts in reperfused myocardial infarcts express the embryonic form of smooth muscle myosin heavy chain (SMemb). *Cardiovasc Res.* 2000 Oct;48(1):89–100.
70. Dobaczewski M, Bujak M, Zymek P, Ren G, Entman ML, Frangogiannis NG. Extracellular matrix remodeling in canine and mouse myocardial infarcts. *Cell Tissue Res.* 2006 Jun;324(3):475–88.
71. Bujak M, Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Xia Y, Leucker T, Zymek P, et al. Induction of the CXC chemokine interferon-gamma-inducible protein 10 regulates the reparative response following myocardial infarction. *Circ Res.* 2009 Nov 6;105(10):973–83.
72. Kumar S, Shahabuddin S, Haboubi N, West D, Arnold F, Reid H, et al. Angiogenesis factor from human myocardial infarcts. *The Lancet.* 1983 Aug;322(8346):364–8.
73. Shammas NW, Moss AJ, Sullebarger T, Gutierrez OH, Rocco TA. Acquired Coronary Angiogenesis after Myocardial Infarction. *Cardiology.* 1993;83(3):212–6.
74. Mallat Z, Silvestre J-S, Le Ricousse-Roussanne S, Lecomte-Raclet L, Corbaz A, Clergue M, et al. Interleukin-18/Interleukin-18 Binding Protein Signaling Modulates Ischemia-Induced Neovascularization in Mice Hindlimb. *Circ Res.* 2002 Sep 6;91(5):441–8.
75. Silvestre J-S, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, et al. Antiangiogenic Effect of Interleukin-10 in Ischemia-Induced Angiogenesis in Mice Hindlimb. *Circ Res.* 2000 Sep 15;87(6):448–52.
76. Johnson C, Sung H-J, Lessner SM, Fini ME, Galis ZS. Matrix Metalloproteinase-9 Is Required for Adequate Angiogenic Revascularization of Ischemic Tissues: Potential Role in Capillary Branching. *Circ Res.* 2004 Feb 6;94(2):262–8.
77. Cochain C, Rodero MP, Vilar J, Récalde A, Richart AL, Loinard C, et al. Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization. *Cardiovasc Res.* 2010 Oct 1;88(1):186–95.
78. Cochain C, Auvynet C, Poupel L, Vilar J, Dumeau E, Richart A, et al. The chemokine decoy receptor D6 prevents excessive inflammation and adverse ventricular remodeling after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Sep;32(9):2206–13.
79. Zougari Y, Ait-Oufella H, Waeckel L, Vilar J, Loinard C, Cochain C, et al. Regulatory T cells modulate postischemic neovascularization. *Circulation.* 2009 Oct 6;120(14):1415–25.
80. Dobaczewski M, Xia Y, Bujak M, Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. CCR5 signaling suppresses inflammation and reduces adverse remodeling of the infarcted heart, mediating recruitment of regulatory T cells. *Am J Pathol.* 2010 May;176(5):2177–87.
81. 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 Jul;27(7):417–20.
82. Kobara M, Noda K, Kitamura M, Okamoto A, Shiraishi T, Toba H, et al. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res.* 2010 Aug 1;87(3):424–30.
83. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lindsey ML, Ballantyne CM, Michael LH, Smith CW, et al. IL-10 Is Induced in the Reperfused Myocardium and May Modulate the Reaction to Injury. *J Immunol.* 2000 Sep 1;165(5):2798–808.

84. Burchfield JS, Iwasaki M, Koyanagi M, Urbich C, Rosenthal N, Zeiher AM, et al. Interleukin-10 From Transplanted Bone Marrow Mononuclear Cells Contributes to Cardiac Protection After Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2008 Jul 18;103(2):203–11.
85. Prabhu SD, Frangogiannis NG. The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*. 2016 Jun 24;119(1):91–112.
86. Janicki JS, Brower GL. The role of myocardial fibrillar collagen in ventricular remodeling and function. *J Card Fail*. 2002 Dec;8(6 Suppl):S319-325.
87. Baicu CF, Stroud JD, Livesay VA, Hapke E, Holder J, Spinale FG, et al. Changes in extracellular collagen matrix alter myocardial systolic performance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Jan;284(1):H122-132.
88. Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. *Circ Res*. 2002 Nov 29;91(11):988–98.
89. Ismahil MA, Hamid T, Bansal SS, Patel B, Kingery JR, Prabhu SD. Remodeling of the mononuclear phagocyte network underlies chronic inflammation and disease progression in heart failure: critical importance of the cardiopulmonary axis. *Circ Res*. 2014 Jan 17;114(2):266–82.
90. Bahit MC, Kochar A, Granger CB. Post-Myocardial Infarction Heart Failure. *JACC Heart Fail*. 2018 Mar;6(3):179–86.
91. Torabi A, Cleland JG, Rigby AS, Sherwi N. Development and course of heart failure after a myocardial infarction in younger and older people. *J Geriatr Cardiol*. 2014;11:1–12.
92. Konstam MA, Kramer DG, Patel AR, Maron MS, Udelson JE. Left Ventricular Remodeling in Heart Failure. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011 Jan;4(1):98–108.
93. Torabi A, Cleland JGF, Khan NK, Loh PH, Clark AL, Alamgir F, et al. The timing of development and subsequent clinical course of heart failure after a myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008 Mar 19;29(7):859–70.
94. Cahill TJ, Kharbanda RK. Heart failure after myocardial infarction in the era of primary percutaneous coronary intervention: Mechanisms, incidence and identification of patients at risk. *World J Cardiol*. 2017;9(5):407.
95. Gerber Y, Weston SA, Enriquez-Sarano M, Berardi C, Chamberlain AM, Manemann SM, et al. Mortality Associated With Heart Failure After Myocardial Infarction: A Contemporary Community Perspective. *Circ Heart Fail*. 2016 Jan;9(1).
96. Nochioka K, Sakata Y, Shimokawa H. Combination Therapy of Renin Angiotensin System Inhibitors and β -Blockers in Patients with Heart Failure. In: Islam MdS, editor. *Heart Failure: From Research to Clinical Practice: Volume 3*. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 17–30. (Advances in Experimental Medicine and Biology).
97. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, Bueno H, Cleland JGF, Coats AJS, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *Eur Heart J*. 2016 Jul 14;37(27):2129–200.
98. WRITING COMMITTEE MEMBERS, Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, Butler J, Casey DE, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation*. 2013 Oct 15;128(16):e240-327.

99. Swedberg K, Kjeksus J. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *Am J Cardiol.* 1988 Jul 11;62(2):60A-66A.
100. Granger CB, McMurray JJV, Yusuf S, Held P, Michelson EL, Olofsson B, et al. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Alternative trial. *Lancet Lond Engl.* 2003 Sep 6;362(9386):772–6.
101. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, Cody R, Castaigne A, Perez A, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med.* 1999 Sep 2;341(10):709–17.
102. Zannad F, McMurray JJV, Krum H, van Veldhuisen DJ, Swedberg K, Shi H, et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med.* 2011 Jan 6;364(1):11–21.
103. Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, et al. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med.* 1996 May 23;334(21):1349–55.
104. Sakata Y, Shiba N, Takahashi J, Miyata S, Nochioka K, Miura M, et al. Clinical impacts of additive use of olmesartan in hypertensive patients with chronic heart failure: the supplemental benefit of an angiotensin receptor blocker in hypertensive patients with stable heart failure using olmesartan (SUPPORT) trial. *Eur Heart J.* 2015 Apr 14;36(15):915–23.
105. Theuns DAMJ, Smith T, Hunink MGM, Bardy GH, Jordaens L. Effectiveness of prophylactic implantation of cardioverter-defibrillators without cardiac resynchronization therapy in patients with ischaemic or non-ischaemic heart disease: a systematic review and meta-analysis. *Eur Eur Pacing Arrhythm Card Electrophysiol J Work Groups Card Pacing Arrhythm Card Cell Electrophysiol Eur Soc Cardiol.* 2010 Nov;12(11):1564–70.
106. Ojo A, Tariq S, Harikrishnan P, Iwai S, Jacobson JT. Cardiac Resynchronization Therapy for Heart Failure. *Interv Cardiol Clin.* 2017 Jul;6(3):417–26.
107. Bristow MR, Saxon LA, Boehmer J, Krueger S, Kass DA, De Marco T, et al. Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *N Engl J Med.* 2004 May 20;350(21):2140–50.
108. Cleland JGF, Daubert J-C, Erdmann E, Freemantle N, Gras D, Kappenberger L, et al. Longer-term effects of cardiac resynchronization therapy on mortality in heart failure [the CARDiac RESynchronization-Heart Failure (CARE-HF) trial extension phase]. *Eur Heart J.* 2006 Aug;27(16):1928–32.
109. St John Sutton MG, Plappert T, Abraham WT, Smith AL, DeLurgio DB, Leon AR, et al. Effect of cardiac resynchronization therapy on left ventricular size and function in chronic heart failure. *Circulation.* 2003 Apr 22;107(15):1985–90.
110. Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, Tonn T, et al. Transcatheter transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res.* 2007 Apr 27;100(8):1234–41.
111. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Dec 8;54(24):2277–86.

112. Henry TD, Pepine CJ, Lambert CR, Traverse JH, Schatz R, Costa M, et al. The Athena trials: Autologous adipose-derived regenerative cells for refractory chronic myocardial ischemia with left ventricular dysfunction. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 2017 Feb 1;89(2):169–77.
113. Teerlink JR, Metra M, Filippatos GS, Davison BA, Bartunek J, Terzic A, et al. Benefit of cardiopoietic mesenchymal stem cell therapy on left ventricular remodelling: results from the Congestive Heart Failure Cardiopoietic Regenerative Therapy (CHART-1) study. *Eur J Heart Fail.* 2017 Nov;19(11):1520–9.
114. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet Lond Engl.* 2012 Mar 10;379(9819):895–904.
115. Miller M, Mayo K. Chemokines from a Structural Perspective. *Int J Mol Sci.* 2017 Oct 2;18(10):2088.
116. Lortat-Jacob H. The molecular basis and functional implications of chemokine interactions with heparan sulphate. *Curr Opin Struct Biol.* 2009 Oct;19(5):543–8.
117. Chew AL, Tan WY, Khoo BY. Potential combinatorial effects of recombinant atypical chemokine receptors in breast cancer cell invasion: A research perspective. *Biomed Rep.* 2013 Mar;1(2):185–92.
118. Luster AD. Chemokines — Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. Epstein FH, editor. *N Engl J Med.* 1998 Feb 12;338(7):436–45.
119. Charo IF, Ransohoff RM. The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation. *N Engl J Med.* 2006 Feb 9;354(6):610–21.
120. Rossi D, Zlotnik A. The Biology of Chemokines and their Receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:217–42.
121. Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):108–15.
122. Bachelier F, Graham GJ, Locati M, Mantovani A, Murphy PM, Nibbs R, et al. New nomenclature for atypical chemokine receptors. *Nat Immunol.* 2014 Mar;15(3):207–8.
123. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 2000 Feb;12(2):121–7.
124. Janssens R, Struyf S, Proost P. The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol.* 2018 Apr;15(4):299–311.
125. Jia T, Serbina NV, Brandl K, Zhong MX, Leiner IM, Charo IF, et al. Additive roles for MCP-1 and MCP-3 in CCR2-mediated recruitment of inflammatory monocytes during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008 May 15;180(10):6846–53.
126. Kelner G, Kennedy J, Bacon K, Kleyensteuber S, Largaespada D, Jenkins N, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science.* 1994 Nov 25;266(5189):1395–9.
127. Getzin T, Krishnasamy K, Gamrekelashvili J, Kapanadze T, Limbourg A, Häger C, et al. The chemokine receptor CX3CR1 coordinates monocyte recruitment and endothelial regeneration after arterial injury. *EMBO Mol Med.* 2018;10(2):151–9.
128. Johnson Z, Proudfoot AE, Handel TM. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Dec;16(6):625–36.

129. Stephens B, Handel TM. Chemokine receptor oligomerization and allostery. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;115:375–420.
130. Nguyen LT, Vogel HJ. Structural perspectives on antimicrobial chemokines. *Front Immunol.* 2012;3:384.
131. Lubkowski J, Bujacz G, Boqué L, Domaille PJ, Handel TM, Wlodawer A. The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions. *Nat Struct Biol.* 1997 Jan;4(1):64–9.
132. Shaw JP, Johnson Z, Borlat F, Zwahlen C, Kungl A, Roulin K, et al. The X-ray structure of RANTES: heparin-derived disaccharides allows the rational design of chemokine inhibitors. *Struct Lond Engl* 1993. 2004 Nov;12(11):2081–93.
133. Lodi PJ, Garrett DS, Kuszewski J, Tsang ML, Weatherbee JA, Leonard WJ, et al. High-resolution solution structure of the beta chemokine hMIP-1 beta by multidimensional NMR. *Science.* 1994 Mar 25;263(5154):1762–7.
134. Wang X, Sharp JS, Handel TM, Prestegard JH. Chemokine oligomerization in cell signaling and migration. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;117:531–78.
135. Swaminathan GJ, Holloway DE, Colvin RA, Campanella GK, Papageorgiou AC, Luster AD, et al. Crystal structures of oligomeric forms of the IP-10/CXCL10 chemokine. *Struct Lond Engl* 1993. 2003 May;11(5):521–32.
136. Kuo J-H, Chen Y-P, Liu J-S, Dubrac A, Quemener C, Prats H, et al. Alternative C-terminal helix orientation alters chemokine function: structure of the anti-angiogenic chemokine, CXCL4L1. *J Biol Chem.* 2013 May 10;288(19):13522–33.
137. Rajarathnam K, Sykes BD, Kay CM, Dewald B, Geiser T, Baggiolini M, et al. Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science.* 1994 Apr 1;264(5155):90–2.
138. Proudfoot AEI, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, et al. Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Feb 18;100(4):1885–90.
139. Paoletti S, Petkovic V, Sebastiani S, Danelon MG, Ugucioni M, Gerber BO. A rich chemokine environment strongly enhances leukocyte migration and activities. *Blood.* 2005 May 1;105(9):3405–12.
140. Koenen RR, von Hundelshausen P, Nesmelova IV, Zerneck A, Liehn EA, Sarabi A, et al. Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *Nat Med.* 2009 Jan;15(1):97–103.
141. Nesmelova IV, Sham Y, Dudek AZ, van Eijk LI, Wu G, Slungaard A, et al. Platelet factor 4 and interleukin-8 CXC chemokine heterodimer formation modulates function at the quaternary structural level. *J Biol Chem.* 2005 Feb 11;280(6):4948–58.
142. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine:Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annu Rev Immunol.* 2007 Apr 1;25(1):787–820.
143. Webb LM, Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Rot A. Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Aug 1;90(15):7158–62.
144. Weber M, Hauschild R, Schwarz J, Moussion C, de Vries I, Legler DF, et al. Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients. *Science.* 2013 Jan 18;339(6117):328–32.
145. Ali S, O’Boyle G, Mellor P, Kirby JA. An apparent paradox: chemokine receptor agonists can be used for anti-inflammatory therapy. *Mol Immunol.* 2007 Mar;44(7):1477–82.

146. Merida-de-Barros DA, Chaves SP, Belmiro CLR, Wanderley JLM. Leishmaniasis and glycosaminoglycans: a future therapeutic strategy? *Parasit Vectors*. 2018 Oct 3;11(1):536.
147. Couchman JR, Pataki CA. An Introduction to Proteoglycans and Their Localization. *J Histochem Cytochem*. 2012 Dec 1;60(12):885–97.
148. Billings PC, Pacifici M. Interactions of signaling proteins, growth factors and other proteins with heparan sulfate: mechanisms and mysteries. *Connect Tissue Res*. 2015;56(4):272–80.
149. Stoler-Barak L, Moussion C, Shezen E, Hatzav M, Sixt M, Alon R. Blood vessels pattern heparan sulfate gradients between their apical and basolateral aspects. *PloS One*. 2014;9(1):e85699.
150. Wang L, Fuster M, Sriramarao P, Esko JD. Endothelial heparan sulfate deficiency impairs L-selectin- and chemokine-mediated neutrophil trafficking during inflammatory responses. *Nat Immunol*. 2005 Sep;6(9):902–10.
151. Cardin AD, Weintraub HJ. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arterioscler Dallas Tex*. 1989 Feb;9(1):21–32.
152. Vivès RR, Crublet E, Andrieu J-P, Gagnon J, Rousselle P, Lortat-Jacob H. A novel strategy for defining critical amino acid residues involved in protein/glycosaminoglycan interactions. *J Biol Chem*. 2004 Dec 24;279(52):54327–33.
153. Lortat-Jacob H, Grosdidier A, Imberty A. Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 5;99(3):1229–34.
154. Laguri C, Arenzana-Seisdedos F, Lortat-Jacob H. Relationships between glycosaminoglycan and receptor binding sites in chemokines-the CXCL12 example. *Carbohydr Res*. 2008 Aug 11;343(12):2018–23.
155. Proudfoot AE, Fritchley S, Borlat F, Shaw JP, Vilbois F, Zwahlen C, et al. The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J Biol Chem*. 2001 Apr 6;276(14):10620–6.
156. Davis DA, Singer KE, De La Luz Sierra M, Narazaki M, Yang F, Fales HM, et al. Identification of carboxypeptidase N as an enzyme responsible for C-terminal cleavage of stromal cell-derived factor-1alpha in the circulation. *Blood*. 2005 Jun 15;105(12):4561–8.
157. De La Luz Sierra M, Yang F, Narazaki M, Salvucci O, Davis D, Yarchoan R, et al. Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood*. 2004 Apr 1;103(7):2452–9.
158. Hughes CE, Nibbs RJB. A guide to chemokines and their receptors. *FEBS J*. 2018 Aug;285(16):2944–71.
159. Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*. 2006;7(12):243.
160. Galés C, Van Durm JJJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, et al. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Sep;13(9):778–86.
161. Nobles M, Benians A, Tinker A. Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 20;102(51):18706–11.
162. Benians A, Nobles M, Hosny S, Tinker A. Regulators of G-protein signaling form a quaternary complex with the agonist, receptor, and G-protein. A novel explanation for the acceleration of signaling activation kinetics. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13383–94.

163. Dupré DJ, Hébert TE. Biosynthesis and trafficking of seven transmembrane receptor signalling complexes. *Cell Signal*. 2006 Oct;18(10):1549–59.
164. Milligan G, Kostenis E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol*. 2006 Jan;147 Suppl 1:S46-55.
165. Offermanns S. G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog Biophys Mol Biol*. 2003 Oct;83(2):101–30.
166. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Multifaceted roles of beta-arrestins in the regulation of seven-membrane-spanning receptor trafficking and signalling. *Biochem J*. 2003 Nov 1;375(Pt 3):503–15.
167. Wilden U, Hall SW, Kühn H. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Mar;83(5):1174–8.
168. Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*. 1990 Jun 22;248(4962):1547–50.
169. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *J Biol Chem*. 2003 Apr 18;278(16):14498–506.
170. Laporte SA, Oakley RH, Zhang J, Holt JA, Ferguson SS, Caron MG, et al. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3712–7.
171. Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem*. 1999 Nov 5;274(45):32248–57.
172. Reiter E, Lefkowitz RJ. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab*. 2006 Jun;17(4):159–65.
173. McDonald PH, Chow CW, Miller WE, Laporte SA, Field ME, Lin FT, et al. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science*. 2000 Nov 24;290(5496):1574–7.
174. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Seven-Transmembrane Receptor Signaling Through β -Arrestin. *Sci Signal*. 2005 Nov 1;2005(308).
175. Smith JS, Rajagopal S. The β -Arrestins: Multifunctional Regulators of G Protein-coupled Receptors. *J Biol Chem*. 2016 Apr 22;291(17):8969–77.
176. Shenoy SK, Lefkowitz RJ. β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci*. 2011 Sep;32(9):521–33.
177. Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ. Therapeutic potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med*. 2011 Mar;17(3):126–39.
178. Rovati GE, Capra V, Neubig RR. The Highly Conserved DRY Motif of Class A G Protein-Coupled Receptors: Beyond the Ground State. *Mol Pharmacol*. 2007 Apr 1;71(4):959–64.
179. Chandrasekar B, Bysani S, Mummidi S. CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*. 2004 Jan 30;279(5):3188–96.
180. Koenen A, Babendreyer A, Schumacher J, Pasqualon T, Schwarz N, Seifert A, et al. The DRF motif of CXCR6 as chemokine receptor adaptation to adhesion. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173486.

181. Donà E, Barry JD, Valentin G, Quirin C, Khmelinskii A, Kunze A, et al. Directional tissue migration through a self-generated chemokine gradient. *Nature*. 2013 Nov 14;503(7475):285–9.
182. Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, et al. β -arrestin- but not G protein-mediated signaling by the “decoy” receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci*. 2010 Jan 12;107(2):628–32.
183. Dutta P, Sager HB, Stengel KR, Naxerova K, Courties G, Saez B, et al. Myocardial Infarction Activates CCR2(+) Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cell Stem Cell*. 2015 May 7;16(5):477–87.
184. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science*. 2009 Jul 31;325(5940):612–6.
185. Horckmans M, Bianchini M, Santovito D, Megens RTA, Springael J-Y, Negri I, et al. Pericardial Adipose Tissue Regulates Granulopoiesis, Fibrosis, and Cardiac Function After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2018 Feb 27;137(9):948–60.
186. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 2005 Jul 1;121(7):1109–21.
187. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity*. 2006 Dec;25(6):977–88.
188. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol*. 2002 Jul 1;3(7):687–94.
189. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell*. 2002 May 31;109(5):625–37.
190. Pinho S, Frenette PS. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 May;20(5):303–20.
191. Sokol CL, Luster AD. The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015 Jan 29;7(5).
192. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007 Sep;7(9):678–89.
193. Foubert P, Silvestre J-S, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimian TG, et al. PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2007 Jun;117(6):1527–37.
194. Alon R, Hammer DA, Springer TA. Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. *Nature*. 1995 Apr;374(6522):539–42.
195. Campbell JJ, Qin S, Bacon KB, Mackay CR, Butcher EC. Biology of chemokine and classical chemoattractant receptors: differential requirements for adhesion-triggering versus chemotactic responses in lymphoid cells. *J Cell Biol*. 1996 Jul 1;134(1):255–66.
196. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC. Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions. *Science*. 1998 Jan 16;279(5349):381–4.
197. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998 May 15;91(10):3527–61.

198. Mylonas KJ, Turner NA, Bageghni SA, Kenyon CJ, White CI, McGregor K, et al. 11 β -HSD1 suppresses cardiac fibroblast CXCL2, CXCL5 and neutrophil recruitment to the heart post MI. *J Endocrinol*. 2017 Jun;233(3):315–27.
199. Mühlstedt S, Ghadge SK, Duchene J, Qadri F, Järve A, Vilianovich L, et al. Cardiomyocyte-derived CXCL12 is not involved in cardiogenesis but plays a crucial role in myocardial infarction. *J Mol Med Berl Ger*. 2016 Sep;94(9):1005–14.
200. Chen B, Frangogiannis NG. Chemokines in Myocardial Infarction. *J Cardiovasc Transl Res*. 2020 May 15;
201. Rossini A, Zacheo A, Mocini D, Totta P, Facchiano A, Castoldi R, et al. HMGB1-stimulated human primary cardiac fibroblasts exert a paracrine action on human and murine cardiac stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2008 Apr;44(4):683–93.
202. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2652–60.
203. Lugin J, Parapanov R, Rosenblatt-Velin N, Rignault-Clerc S, Feihl F, Waeber B, et al. Cutting edge: IL-1 α is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015 Jan 15;194(2):499–503.
204. Chen C, Feng Y, Zou L, Wang L, Chen HH, Cai J-Y, et al. Role of extracellular RNA and TLR3-Trif signaling in myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Am Heart Assoc*. 2014 Jan 3;3(1):e000683.
205. Methe H, Kim J-O, Kofler S, Weis M, Nabauer M, Koglin J. Expansion of circulating Toll-like receptor 4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome. *Circulation*. 2005 May 24;111(20):2654–61.
206. Lu C, Ren D, Wang X, Ha T, Liu L, Lee EJ, et al. Toll-like receptor 3 plays a role in myocardial infarction and ischemia/reperfusion injury. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Jan;1842(1):22–31.
207. de Kleijn DPV, Chong SY, Wang X, Yatim SMJM, Fairhurst A-M, Vernooij F, et al. Toll-like receptor 7 deficiency promotes survival and reduces adverse left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 2019 Oct 1;115(12):1791–803.
208. Wang J-W, Fontes MSC, Wang X, Chong SY, Kessler EL, Zhang Y-N, et al. Leukocytic Toll-Like Receptor 2 Deficiency Preserves Cardiac Function And Reduces Fibrosis In Sustained Pressure Overload. *Sci Rep*. 2017 Aug 23;7(1):9193.
209. Li Y, Si R, Feng Y, Chen HH, Zou L, Wang E, et al. Myocardial ischemia activates an injurious innate immune signaling via cardiac heat shock protein 60 and Toll-like receptor 4. *J Biol Chem*. 2011 Sep 9;286(36):31308–19.
210. Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL. Ischemia-reperfusion of rat myocardium activates nuclear factor-KappaB and induces neutrophil infiltration via lipopolysaccharide-induced CXC chemokine. *Circulation*. 2001 May 8;103(18):2296–302.
211. Chandrasekar B, Freeman GL. Induction of nuclear factor kappaB and activation protein 1 in postischemic myocardium. *FEBS Lett*. 1997 Jan 13;401(1):30–4.
212. Pinckard RN, Olson MS, Giclas PC, Terry R, Boyer JT, O'Rourke RA. Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *J Clin Invest*. 1975 Sep;56(3):740–50.
213. Czermak BJ, Sarma V, Bless NM, Schmal H, Friedl HP, Ward PA. In Vitro and In Vivo Dependency of Chemokine Generation on C5a and TNF- α . *J Immunol*. 1999 Feb 15;162(4):2321–5.

214. Bujak M, Dobaczewski M, Chatila K, Mendoza LH, Li N, Reddy A, et al. Interleukin-1 receptor type I signaling critically regulates infarct healing and cardiac remodeling. *Am J Pathol.* 2008 Jul;173(1):57–67.
215. Maekawa N, Wada H, Kanda T, Niwa T, Yamada Y, Saito K, et al. Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α . *J Am Coll Cardiol.* 2002 Apr 3;39(7):1229–35.
216. Kilgore KS, Park JL, Tanhehco EJ, Booth EA, Marks RM, Lucchesi BR. Attenuation of interleukin-8 expression in C6-deficient rabbits after myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Jan;30(1):75–85.
217. Shetelig C, Limalanathan S, Hoffmann P, Seljeflot I, Gran JM, Eritsland J, et al. Association of IL-8 With Infarct Size and Clinical Outcomes in Patients With STEMI. *J Am Coll Cardiol.* 2018 Jul 10;72(2):187–98.
218. Tarzami ST, Miao W, Mani K, Lopez L, Factor SM, Berman JW, et al. Opposing Effects Mediated by the Chemokine Receptor CXCR2 on Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: Recruitment of Potentially Damaging Neutrophils and Direct Myocardial Protection. *Circulation.* 2003 Nov 11;108(19):2387–92.
219. Dewald O, Ren G, Duerr GD, Zoerlein M, Klemm C, Gersch C, et al. Of Mice and Dogs. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):665–77.
220. Dufour JH, Dziejman M, Liu MT, Leung JH, Lane TE, Luster AD. IFN- γ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *J Immunol.* 2002 Apr 1;168(7):3195–204.
221. Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou KF, Mentzikof DG, Karas SM, Kremastinos DT. Serum profiles of C-C chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* 2002 Feb;22(2):223–9.
222. Montecucco F, Braunersreuther V, Lenglet S, Delattre BMA, Pelli G, Buatois V, et al. CC chemokine CCL5 plays a central role impacting infarct size and post-infarction heart failure in mice. *Eur Heart J.* 2012 Aug 1;33(15):1964–74.
223. Huang Y, Wang D, Wang X, Zhang Y, Liu T, Chen Y, et al. Abrogation of CC chemokine receptor 9 ameliorates ventricular remodeling in mice after myocardial infarction. *Sci Rep.* 2016 Sep 2;6:32660.
224. Liehn EA, Merx MW, Postea O, Becher S, Djalali-Talab Y, Shagdarsuren E, et al. Ccr1 deficiency reduces inflammatory remodelling and preserves left ventricular function after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2008 Apr;12(2):496–506.
225. Jiang Y, Bai J, Tang L, Zhang P, Pu J. Anti-CCL21 antibody attenuates infarct size and improves cardiac remodeling after myocardial infarction. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2015;37(3):979–90.
226. Frangogiannis NG, Dewald O, Xia Y, Ren G, Haudek S, Leucker T, et al. Critical Role of Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 in the Pathogenesis of Ischemic Cardiomyopathy. *Circulation.* 2007 Feb 6;115(5):584–92.
227. Haudek SB, Xia Y, Huebener P, Lee JM, Carlson S, Crawford JR, et al. Bone marrow-derived fibroblast precursors mediate ischemic cardiomyopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci.* 2006 Nov 28;103(48):18284–9.

228. Moore BB, Kolodsick JE, Thannickal VJ, Cooke K, Moore TA, Hogaboam C, et al. CCR2-Mediated Recruitment of Fibrocytes to the Alveolar Space after Fibrotic Injury. *Am J Pathol*. 2005 Mar 1;166(3):675–84.
229. Kruglov EA, Nathanson RA, Nguyen T, Dranoff JA. Secretion of MCP-1/CCL2 by bile duct epithelia induces myofibroblastic transdifferentiation of portal fibroblasts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006 Apr;290(4):G765-771.
230. Gharaee-Kermani M, Denholm EM, Phan SH. Costimulation of fibroblast collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant protein-1 via specific receptors. *J Biol Chem*. 1996 Jul 26;271(30):17779–84.
231. Wang L, Zhang Y-L, Lin Q-Y, Liu Y, Guan X-M, Ma X-L, et al. CXCL1–CXCR2 axis mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and remodelling through regulation of monocyte infiltration. *Eur Heart J*. 2018 May 21;39(20):1818–31.
232. Saxena A, Bujak M, Frunza O, Dobaczewski M, Gonzalez-Quesada C, Lu B, et al. CXCR3-independent actions of the CXC chemokine CXCL10 in the infarcted myocardium and in isolated cardiac fibroblasts are mediated through proteoglycans. *Cardiovasc Res*. 2014 Jul 15;103(2):217–27.
233. Frangogiannis NG, Mendoza LH, Lewallen M, Michael LH, Smith CW, Entman ML. Induction and suppression of interferon-inducible protein (IP)-10 in reperfused myocardial infarcts may regulate angiogenesis. *FASEB J*. 2001;15(8):1428–30.
234. Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, et al. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem*. 1995 Nov 10;270(45):27348–57.
235. Xie Q, Sun Z, Chen M, Zhong Q, Yang T, Yi J. IL-8 up-regulates proliferative angiogenesis in ischemic myocardium in rabbits through phosphorylation of Akt/GSK-3 β ser9 dependent pathways. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Aug 15;8(8):12498–508.
236. Gu X, Xu J, Yang X-P, Peterson E, Harding P. Fractalkine neutralization improves cardiac function after myocardial infarction. *Exp Physiol*. 2015 Jul 1;100(7):805–17.
237. Xuan W, Liao Y, Chen B, Huang Q, Xu D, Liu Y, et al. Detrimental effect of fractalkine on myocardial ischaemia and heart failure. *Cardiovasc Res*. 2011 Dec 1;92(3):385–93.
238. Fadel H, Temesgen Z. Maraviroc. *Drugs Today Barc Spain* 1998. 2007 Nov;43(11):749–58.
239. De Clercq E. Mozobil® (Plerixafor, AMD3100), 10 years after its approval by the US Food and Drug Administration. *Antivir Chem Chemother*. 2019 Feb 18;27.
240. Moore DC, Elmes JB, Shibu PA, Larck C, Park SI. Mogamulizumab: An Anti-CC Chemokine Receptor 4 Antibody for T-Cell Lymphomas. *Ann Pharmacother*. 2020 Apr;54(4):371–9.
241. Francisci D, Pirro M, Schiaroli E, Mannarino MR, Cipriani S, Bianconi V, et al. Maraviroc Intensification Modulates Atherosclerotic Progression in HIV-Suppressed Patients at High Cardiovascular Risk. A Randomized, Crossover Pilot Study. *Open Forum Infect Dis*. 2019 Mar 7;6(4).
242. Cipriani S, Francisci D, Mencarelli A, Renga B, Schiaroli E, D'Amore C, et al. Efficacy of the CCR5 antagonist maraviroc in reducing early, ritonavir-induced atherogenesis and advanced plaque progression in mice. *Circulation*. 2013 May 28;127(21):2114–24.
243. Braunersreuther V, Pellioux C, Pelli G, Burger F, Steffens S, Montessuit C, et al. Chemokine CCL5/RANTES inhibition reduces myocardial reperfusion injury in atherosclerotic mice. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Apr;48(4):789–98.

244. Alexander JM, Nelson CA, van Berkel V, Lau EK, Studts JM, Brett TJ, et al. Structural basis of chemokine sequestration by a herpesvirus decoy receptor. *Cell*. 2002 Nov 1;111(3):343–56.
245. Ravindran D, Ridiandries A, Vanags LZ, Henriquez R, Cartland S, Tan JTM, et al. Chemokine binding protein “M3” limits atherosclerosis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173224.
246. Déruaz M, Frauenschuh A, Alessandri AL, Dias JM, Coelho FM, Russo RC, et al. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. *J Exp Med*. 2008 Sep 1;205(9):2019–31.
247. Braunersreuther V, Montecucco F, Pelli G, Galan K, Proudfoot AE, Belin A, et al. Treatment with the CC chemokine-binding protein Evasin-4 improves post-infarction myocardial injury and survival in mice. *Thromb Haemost*. 2013 Oct;110(4):807–25.
248. Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, Pelli G, Pellieux C, Montessuit C, et al. Single administration of the CXC chemokine-binding protein Evasin-3 during ischemia prevents myocardial reperfusion injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 Jul;30(7):1371–7.
249. Gilbert J, Lekstrom-Himes J, Donaldson D, Lee Y, Hu M, Xu J, et al. Effect of CC chemokine receptor 2 CCR2 blockade on serum C-reactive protein in individuals at atherosclerotic risk and with a single nucleotide polymorphism of the monocyte chemoattractant protein-1 promoter region. *Am J Cardiol*. 2011 Mar 15;107(6):906–11.
250. Joseph JP, Reyes E, Guzman J, O’Doherty J, McConkey H, Arri S, et al. CXCR2 Inhibition - a novel approach to treating CoronAry heart DiseAse (CICADA): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2017 Oct 11;18(1):473.
251. Jurcevic S, Humfrey C, Uddin M, Warrington S, Larsson B, Keen C. The effect of a selective CXCR2 antagonist (AZD5069) on human blood neutrophil count and innate immune functions. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;80(6):1324–36.
252. Nagasawa T, Kikutani H, Kishimoto T. Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci*. 1994 Mar 15;91(6):2305–9.
253. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*. 1995 Aug 10;28(3):495–500.
254. Nomura M, Matsuda Y, Itoh H, Hori T, Suzuki G. Genetic mapping of the mouse stromal cell-derived factor gene (Sdf1) to mouse and rat chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*. 1996;73(4):286–9.
255. Nagasawa T, Nakajima T, Tachibana K, Iizasa H, Bleul CC, Yoshie O, et al. Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci*. 1996 Dec 10;93(25):14726–9.
256. Gleichmann M, Gillen C, Czardybon M, Bosse F, Greiner-Petter R, Auer J, et al. Cloning and characterization of SDF-1 γ , a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system: SDF-1 γ in the nervous system. *Eur J Neurosci*. 2000 Jun;12(6):1857–66.
257. Yu L, Cecil J, Peng S-B, Schrementi J, Kovacevic S, Paul D, et al. Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*. 2006 Jun;374:174–9.
258. Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP, Juan M. The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility. *Clin Exp Immunol*. 2007 Oct;150(1):1–12.

259. Rueda P, Balabanian K, Lagane B, Staropoli I, Chow K, Levoye A, et al. The CXCL12 γ Chemokine Displays Unprecedented Structural and Functional Properties that Make It a Paradigm of Chemoattractant Proteins. *PLoS ONE*. 2008 Jul 2;3(7).
260. Amara A, Lorthioir O, Valenzuela A, Magerus A, Thelen M, Montes M, et al. Stromal cell-derived factor-1 α associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J Biol Chem*. 1999 Aug 20;274(34):23916–25.
261. Sadir R, Baleux F, Grosdidier A, Imberty A, Lortat-Jacob H. Characterization of the Stromal Cell-derived Factor-1 α -Heparin Complex. *J Biol Chem*. 2001 Mar;276(11):8288–96.
262. Murphy JW, Cho Y, Sachpatzidis A, Fan C, Hodsdon ME, Lolis E. Structural and functional basis of CXCL12 (stromal cell-derived factor-1 α) binding to heparin. *J Biol Chem*. 2007 Mar 30;282(13):10018–27.
263. Migliorini E, Thakar D, Kühnle J, Sadir R, Dyer DP, Li Y, et al. Cytokines and growth factors cross-link heparan sulfate. *Open Biol*. 2015 Aug;5(8):150046.
264. Rueda P, Richart A, Récalde A, Gasse P, Vilar J, Guérin C, et al. Homeostatic and tissue repair defaults in mice carrying selective genetic invalidation of CXCL12/proteoglycan interactions. *Circulation*. 2012 Oct 9;126(15):1882–95.
265. Hardy D, Fefeu M, Besnard A, Briand D, Gasse P, Arenzana-Seisdedos F, et al. Defective angiogenesis in CXCL12 mutant mice impairs skeletal muscle regeneration. *Skelet Muscle*. 2019 Sep 18;9(1):25.
266. Barinov A, Luo L, Gasse P, Meas-Yedid V, Donnadiou E, Arenzana-Seisdedos F, et al. Essential role of immobilized chemokine CXCL12 in the regulation of the humoral immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 28;114(9):2319–24.
267. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature*. 1996 Aug;382(6592):635–8.
268. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, et al. The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature*. 1998 Jun;393(6685):591–4.
269. Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci*. 1998 Aug 4;95(16):9448–53.
270. Chen W-C, Tzeng Y-S, Li H, Tien W-S, Tsai Y-C. Lung defects in neonatal and adult stromal-derived factor-1 conditional knockout mice. *Cell Tissue Res*. 2010 Oct;342(1):75–85.
271. Pawig L, Klasen C, Weber C, Bernhagen J, Noels H. Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives. *Front Immunol*. 2015 Aug 21;6.
272. Vergote D, Butler GS, Ooms M, Cox JH, Silva C, Hollenberg MD, et al. Proteolytic processing of SDF-1 α reveals a change in receptor specificity mediating HIV-associated neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Dec 12;103(50):19182–7.
273. Denoyer A, Godefroy D, Célérier I, Frugier J, Degardin J, Harrison JK, et al. CXCR3 antagonism of SDF-1(5-67) restores trabecular function and prevents retinal neurodegeneration in a rat model of ocular hypertension. *PloS One*. 2012;7(6):e37873.

274. Wu B, Chien EYT, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*. 2010 Nov 19;330(6007):1066–71.
275. Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, et al. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J*. 1997 Dec 1;16(23):6996–7007.
276. Sadir R, Imberty A, Baleux F, Lortat-Jacob H. Heparan Sulfate/Heparin Oligosaccharides Protect Stromal Cell-derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against Proteolysis Induced by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15;279(42):43854–60.
277. McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, et al. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXCR4 chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem*. 2001 Nov 23;276(47):43503–8.
278. Delgado MB, Clark-Lewis I, Loetscher P, Langen H, Thelen M, Baggiolini M, et al. Rapid inactivation of stromal cell-derived factor-1 by cathepsin G associated with lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2001 Mar;31(3):699–707.
279. Valenzuela-Fernández A, Planchenault T, Baleux F, Staropoli I, Le-Barillec K, Leduc D, et al. Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4. *J Biol Chem*. 2002 May 3;277(18):15677–89.
280. Jaracz-Ros A, Bernadat G, Cutolo P, Gallego C, Gustavsson M, Cecon E, et al. Differential activity and selectivity of N-terminal modified CXCL12 chemokines at the CXCR4 and ACKR3 receptors. *J Leukoc Biol*. 2020 Jun;107(6):1123–35.
281. Struyf S, Noppen S, Loos T, Mortier A, Gouwy M, Verbeke H, et al. Citrullination of CXCL12 differentially reduces CXCR4 and CXCR7 binding with loss of inflammatory and anti-HIV-1 activity via CXCR4. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2009 Jan 1;182(1):666–74.
282. Janssens R, Mortier A, Boff D, Vanheule V, Gouwy M, Franck C, et al. Natural nitration of CXCL12 reduces its signaling capacity and chemotactic activity in vitro and abrogates intra-articular lymphocyte recruitment in vivo. *Oncotarget*. 2016 Aug 23;7(38):62439–59.
283. Soriano A, Martínez C, García F, Plana M, Palou E, Lejeune M, et al. Plasma Stromal Cell-Derived Factor (SDF)-1 Levels, SDF1-3'A Genotype, and Expression of CXCR4 on T Lymphocytes: Their Impact on Resistance to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection and Its Progression. *J Infect Dis*. 2002 Oct;186(7):922–31.
284. V. Reiche E, Bonametti A, Voltarelli J, Morimoto H, E. Watanabe M. Genetic Polymorphisms in the Chemokine and Chemokine Receptors: Impact on Clinical Course and Therapy of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection (HIV-1). *Curr Med Chem*. 2007 May 1;14(12):1325–34.
285. Zhang J, Ma H, Gao J, Kong S, You J, Sheng Y. Variants in the CXCL12 gene was associated with coronary artery disease susceptibility in Chinese Han population. *Oncotarget*. 2017 Apr 18;8(33):54518–27.
286. Laguri C, Sadir R, Rueda P, Baleux F, Gans P, Arenzana-Seisdedos F, et al. The novel CXCL12gamma isoform encodes an unstructured cationic domain which regulates bioactivity and interaction with both glycosaminoglycans and CXCR4. *PloS One*. 2007 Oct 31;2(10):e1110.
287. Connell BJ, Sadir R, Baleux F, Laguri C, Kleman J-P, Luo L, et al. Heparan sulfate differentially controls CXCL12a- and CXCL12g-mediated cell migration through differential presentation to their receptor CXCR4. *Sci Signal*. 2016;12.

288. Chang C-W, Seibel AJ, Avendano A, Cortes-Medina MG, Song JW. Distinguishing Specific CXCL12 Isoforms on Their Angiogenesis and Vascular Permeability Promoting Properties. *Adv Healthc Mater.* 2020 Feb;9(4):e1901399.
289. Torres R, Ramirez JC. A chemokine targets the nucleus: Cxcl12-gamma isoform localizes to the nucleolus in adult mouse heart. *PloS One.* 2009 Oct 27;4(10):e7570.
290. Franco D, Rueda P, Lendínez E, Arenzana-Seisdedos F, Caruz A. Developmental Expression Profile of the CXCL12 γ Isoform: Insights Into its Tissue-Specific Role. *Anat Rec.* 2009;292(6):891–901.
291. Pillarisetti K, Gupta SK. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation.* 2001 Oct;25(5):293–300.
292. Janowski M. Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell Adhes Migr.* 2009 Jul 1;3(3):243–9.
293. Santiago B, Calonge E, Del Rey MJ, Gutierrez-Cañas I, Izquierdo E, Usategui A, et al. CXCL12 gene expression is upregulated by hypoxia and growth arrest but not by inflammatory cytokines in rheumatoid synovial fibroblasts. *Cytokine.* 2011 Feb;53(2):184–90.
294. Timotijević G, Petković F, Blaževski J, Momčilović M, Mostarica Stojković M, Miljković D. CXCL12- γ expression is inhibited in neuroinflammation. *Brain Res.* 2013 Jun 26;1519:120–6.
295. Altenburg JD, Broxmeyer HE, Jin Q, Cooper S, Basu S, Alkhatib G. A naturally occurring splice variant of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 is a potent human immunodeficiency virus type 1 inhibitor with weak chemotaxis and cell survival activities. *J Virol.* 2007 Aug;81(15):8140–8.
296. Ray P, Stacer AC, Fenner J, Cavnar SP, Meguiar K, Brown M, et al. CXCL12- γ in primary tumors drives breast cancer metastasis. *Oncogene.* 2015 Apr 16;34(16):2043–51.
297. Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem.* 1994 Jan 7;269(1):232–7.
298. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science.* 1996 May 10;272(5263):872–7.
299. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier J-L, Arenzana-Seisdedos F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by I-cell-line-adapted HIV-. *1996;382:3.*
300. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature.* 1996 Aug;382(6594):829–33.
301. Saini V, Marchese A, Majetschak M. CXC chemokine receptor 4 is a cell surface receptor for extracellular ubiquitin. *J Biol Chem.* 2010 May 14;285(20):15566–76.
302. Feng Z, Dubyak GR, Lederman MM, Weinberg A. Cutting edge: human beta defensin 3--a novel antagonist of the HIV-1 coreceptor CXCR4. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2006 Jul 15;177(2):782–6.
303. Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, et al. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nat Med.* 2007;13(5):10.

304. Schiraldi M, Raucci A, Muñoz LM, Livoti E, Celona B, Venereau E, et al. HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4. *J Exp Med.* 2012 Mar 12;209(3):551–63.
305. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 1997 Mar 4;94(5):1925–30.
306. Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, Ohlstein E, Stadel JM. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem.* 1998 Feb 13;273(7):4282–7.
307. Hesselgesser J, Halks-Miller M, DelVecchio V, Peiper SC, Hoxie J, Kolson DL, et al. CD4-independent association between HIV-1 gp120 and CXCR4: functional chemokine receptors are expressed in human neurons. *Curr Biol CB.* 1997 Feb 1;7(2):112–21.
308. He J, Chen Y, Farzan M, Choe H, Ohagen A, Gartner S, et al. CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia. *Nature.* 1997 Feb 13;385(6617):645–9.
309. Zou Y-R, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* 1998 Jun;393(6685):595–9.
310. Sand LGL, Jochemsen AG, Beletkaia E, Schmidt T, Hogendoorn PCW, Szuhai K. Novel splice variants of CXCR4 identified by transcriptome sequencing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Oct 9;466(1):89–94.
311. Chabot DJ, Chen H, Dimitrov DS, Broder CC. N-linked glycosylation of CXCR4 masks coreceptor function for CCR5-dependent human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol.* 2000 May;74(9):4404–13.
312. Wang J, Babcock GJ, Choe H, Farzan M, Sodroski J, Gabuzda D. N-linked glycosylation in the CXCR4 N-terminus inhibits binding to HIV-1 envelope glycoproteins. *Virology.* 2004 Jun 20;324(1):140–50.
313. BreLOT A, Heveker N, Montes M, Alizon M. Identification of Residues of CXCR4 Critical for Human Immunodeficiency Virus Coreceptor and Chemokine Receptor Activities. *J Biol Chem.* 2000 Aug;275(31):23736–44.
314. Farzan M, Babcock GJ, Vasilieva N, Wright PL, Kiprilov E, Mirzabekov T, et al. The Role of Post-translational Modifications of the CXCR4 Amino Terminus in Stromal-derived Factor 1 α Association and HIV-1 Entry. *J Biol Chem.* 2002 Aug;277(33):29484–9.
315. Veldkamp CT, Seibert C, Peterson FC, Sakmar TP, Volkman BF. Recognition of a CXCR4 Sulfotyrosine by the Chemokine Stromal Cell-derived Factor-1 α (SDF-1 α /CXCL12). *J Mol Biol.* 2006 Jun;359(5):1400–9.
316. Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. Site-specific Phosphorylation of CXCR4 Is Dynamically Regulated by Multiple Kinases and Results in Differential Modulation of CXCR4 Signaling. *J Biol Chem.* 2010 Mar;285(10):7805–17.
317. Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dinsart C, Van Sande J, Maenhaut C, et al. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science.* 1989 May 5;244(4904):569–72.
318. Sreedharan SP, Robichon A, Peterson KE, Goetzl EJ. Cloning and expression of the human vasoactive intestinal peptide receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jun 1;88(11):4986–90.

319. Heesen M, Berman MA, Charest A, Housman D, Gerard C, Dorf ME. Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1. *Immunogenetics*. 1998 Mar 26;47(5):364–70.
320. Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KYC, Harriague J, Moepps B, et al. The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes. *J Biol Chem*. 2005 Oct;280(42):35760–6.
321. Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*. 2006 Sep 4;203(9):2201–13.
322. Boldajipour B, Mahabaleshwar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, et al. Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration. *Cell*. 2008 Feb;132(3):463–73.
323. Alampour-Rajabi S, El Bounkari O, Rot A, Müller-Newen G, Bachelier F, Gawaz M, et al. MIF interacts with CXCR7 to promote receptor internalization, ERK1/2 and ZAP-70 signaling, and lymphocyte chemotaxis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2015 Nov;29(11):4497–511.
324. Klein KR, Karpinich NO, Espenschied ST, Willcockson HH, Dunworth WP, Hoopes SL, et al. Decoy receptor CXCR7 modulates adrenomedullin-mediated cardiac and lymphatic vascular development. *Dev Cell*. 2014 Sep 8;30(5):528–40.
325. Meyrath M, Szpakowska M, Zeiner J, Massotte L, Merz MP, Benkel T, et al. The atypical chemokine receptor ACKR3/CXCR7 is a broad-spectrum scavenger for opioid peptides. *Nat Commun*. 2020 Jun 19;11(1):3033.
326. Ikeda Y, Kumagai H, Skach A, Sato M, Yanagisawa M. Modulation of circadian glucocorticoid oscillation via adrenal opioid-CXCR7 signaling alters emotional behavior. *Cell*. 2013 Dec 5;155(6):1323–36.
327. Gravel S, Malouf C, Boulais PE, Berchiche YA, Oishi S, Fujii N, et al. The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. *J Biol Chem*. 2010 Dec 3;285(49):37939–43.
328. Luker KE, Gupta M, Steele JM, Foerster BR, Luker GD. Imaging ligand-dependent activation of CXCR7. *Neoplasia N Y N*. 2009 Oct;11(10):1022–35.
329. Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes H-G, et al. CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11. Pockley G, editor. *PLoS ONE*. 2010 Feb 11;5(2):e9175.
330. Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*. 2009 Jun 11;113(24):6085–93.
331. Fumagalli A, Heuninck J, Pizzoccaro A, Moutin E, Koenen J, Séveno M, et al. The atypical chemokine receptor 3 interacts with Connexin 43 inhibiting astrocytic gap junctional intercellular communication. *Nat Commun*. 2020 Sep 25;11(1):4855.
332. Odemis V, Lipfert J, Kraft R, Hajek P, Abraham G, Hattermann K, et al. The presumed atypical chemokine receptor CXCR7 signals through G(i/o) proteins in primary rodent astrocytes and human glioma cells. *Glia*. 2012 Mar;60(3):372–81.
333. Gerrits H, Schenau DS van I, Bakker NEC, Disseldorp AJM van, Strik A, Hermens LS, et al. Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *genesis*. 2008;46(5):235–45.

334. Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, et al. CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *J Exp Med*. 2011 Feb 14;208(2):327–39.
335. Sánchez-Alcañiz JA, Haege S, Mueller W, Pla R, Mackay F, Schulz S, et al. Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron*. 2011 Jan 13;69(1):77–90.
336. Koenen J, Bachelier F, Balabanian K, Schlecht-Louf G, Gallego C. Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3): A Comprehensive Overview of its Expression and Potential Roles in the Immune System. *Mol Pharmacol*. 2019 Dec;96(6):809–18.
337. Infantino S, Moepps B, Thelen M. Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Feb 15;176(4):2197–207.
338. Radice E, Ameti R, Melgrati S, Foglierini M, Antonello P, Stahl RAK, et al. Marginal Zone Formation Requires ACKR3 Expression on B Cells. *Cell Rep*. 2020 Aug 4;32(5):107951.
339. Siervo F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Sep 11;104(37):14759–64.
340. Yu S, Crawford D, Tsuchihashi T, Behrens TW, Srivastava D. The chemokine receptor CXCR7 functions to regulate cardiac valve remodeling. *Dev Dyn*. 2011;240(2):384–93.
341. Canals M, Scholten DJ, de Munnik S, Han MKL, Smit MJ, Leurs R. Ubiquitination of CXCR7 Controls Receptor Trafficking. *Ko BCB, editor. PLoS ONE*. 2012 Mar 23;7(3):e34192.
342. Chatterjee M, Seizer P, Borst O, Schönberger T, Mack A, Geisler T, et al. SDF-1 α induces differential trafficking of CXCR4-CXCR7 involving cyclophilin A, CXCR7 ubiquitination and promotes platelet survival. *FASEB J*. 2014;28(7):2864–78.
343. Fumagalli A, Zarca A, Neves M, Caspar B, Hill SJ, Mayor F, et al. CXCR4/ACKR3 Phosphorylation and Recruitment of Interacting Proteins: Key Mechanisms Regulating Their Functional Status. *Mol Pharmacol*. 2019 Dec;96(6):794–808.
344. Lipfert J, Ödemis V, Engele J. Grk2 is an essential regulator of CXCR7 signalling in astrocytes. *Cell Mol Neurobiol*. 2013 Jan;33(1):111–8.
345. Saaber F, Schütz D, Miess E, Abe P, Desikan S, Ashok Kumar P, et al. ACKR3 Regulation of Neuronal Migration Requires ACKR3 Phosphorylation, but Not β -Arrestin. *Cell Rep*. 2019 Feb 5;26(6):1473-1488.e9.
346. Puchert M, Engele J. The peculiarities of the SDF-1/CXCL12 system: in some cells, CXCR4 and CXCR7 sing solos, in others, they sing duets. *Cell Tissue Res*. 2014 Feb;355(2):239–53.
347. Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr*. 2007 Apr;1768(4):952–63.
348. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010 Jun 1;16(11):2927–31.
349. Devreotes P, Janetopoulos C. Eukaryotic Chemotaxis: Distinctions between Directional Sensing and Polarization. *J Biol Chem*. 2003 Jun;278(23):20445–8.
350. Wang J-F, Park I-W, Gropman JE. Stromal cell-derived factor-1 α stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood*. 2000 Apr 15;95(8):2505–13.

351. Sohy D, Yano H, de Nadai P, Urizar E, Guillabert A, Javitch JA, et al. Hetero-oligomerization of CCR2, CCR5, and CXCR4 and the Protean Effects of “Selective” Antagonists. *J Biol Chem*. 2009 Nov;284(45):31270–9.
352. Vila-Coro AJ, Rodríguez-Frade JM, Martín De Ana A, Moreno-Ortíz MC, Martínez-A C, Mellado M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 1999 Oct;13(13):1699–710.
353. Luker KE, Lewin SA, Mihalko LA, Schmidt BT, Winkler JS, Coggins NL, et al. Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene*. 2012 Nov 8;31(45):4750–8.
354. Drury LJ, Ziarek JJ, Gravel S, Veldkamp CT, Takekoshi T, Hwang ST, et al. Monomeric and dimeric CXCL12 inhibit metastasis through distinct CXCR4 interactions and signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci*. 2011 Oct 25;108(43):17655–60.
355. Zabel BA, Wang Y, Lewén S, Berahovich RD, Penfold MET, Zhang P, et al. Elucidation of CXCR7-Mediated Signaling Events and Inhibition of CXCR4-Mediated Tumor Cell Transendothelial Migration by CXCR7 Ligands. *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3204–11.
356. Tripathi V, Kumar R, Dinda AK, Kaur J, Luthra K. CXCL12-CXCR7 signaling activates ERK and Akt pathways in human choriocarcinoma cells. *Cell Commun Adhes*. 2014 Aug;21(4):221–8.
357. De Clercq E. Potential clinical applications of the CXCR4 antagonist bicyclam AMD3100. *Mini Rev Med Chem*. 2005 Sep;5(9):805–24.
358. Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 Is a CXCR7 Ligand with Allosteric Agonist Properties. *Mol Pharmacol*. 2009 May 1;75(5):1240–7.
359. Caron KM, Smithies O. Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 16;98(2):615–9.
360. Sigmund EC, Baur L, Schineis P, Arasa J, Collado-Diaz V, Vranova M, et al. Lymphatic endothelial-cell expressed ACKR3 is dispensable for postnatal lymphangiogenesis and lymphatic drainage function in mice. *PLoS One*. 2021;16(4):e0249068.
361. Wei S-T, Huang Y-C, Hsieh M-L, Lin Y-J, Shyu W-C, Chen H-C, et al. Atypical chemokine receptor ACKR3/CXCR7 controls postnatal vasculogenesis and arterial specification by mesenchymal stem cells via Notch signaling. *Cell Death Dis*. 2020 May 4;11(5):307.
362. Décaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *J Biol Chem*. 2011 Sep 16;286(37):32188–97.
363. Yan X, Cai S, Xiong X, Sun W, Dai X, Chen S, et al. Chemokine receptor CXCR7 mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation. *J Cell Biochem*. 2012;113(4):1437–46.
364. Mazinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, Sagrinati C, Ballerini L, Angelotti ML, et al. Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med*. 2008 Feb 18;205(2):479–90.
365. Sun Y, Cheng Z, Ma L, Pei G. Beta-arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem*. 2002 Dec 20;277(51):49212–9.

366. Grymula K, Tarnowski M, Wysoczynski M, Drukala J, Barr FG, Ratajczak J, et al. Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *Int J Cancer*. 2010;127(11):2554–68.
367. Janssens R, Struyf S, Proost P. Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2018 Dec;44:51–68.
368. Davis CB, Dikic I, Unutmaz D, Hill CM, Arthos J, Siani MA, et al. Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J Exp Med*. 1997 Nov 17;186(10):1793–8.
369. Balter M. A Second Coreceptor for HIV in Early Stages of Infection. *Science*. 1996 Jun 21;272(5269):1740–1740.
370. Berger EA, Doms RW, Fenyö E-M, Korber BTM, Littman DR, Moore JP, et al. A new classification for HIV-1. *Nature*. 1998 Jan;391(6664):240–240.
371. Wang J, Harada A, Matsushita S, Matsumi S, Zhang Y, Shioda T, et al. IL-4 and a glucocorticoid up-regulate CXCR4 expression on human CD4+ T lymphocytes and enhance HIV-1 replication. *J Leukoc Biol*. 1998;64(5):642–9.
372. Llano A, Barretina J, Gutiérrez A, Blanco J, Cabrera C, Clotet B, et al. Interleukin-7 in Plasma Correlates with CD4 T-Cell Depletion and May Be Associated with Emergence of Syncytium-Inducing Variants in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Positive Individuals. *J Virol*. 2001 Nov;75(21):10319–25.
373. Caulfield J, Fernandez M, Snetkov V, Lee T, Hawrylowicz C. CXCR4 expression on monocytes is up-regulated by dexamethasone and is modulated by autologous CD3+ T cells. *Immunology*. 2002 Feb;105(2):155–62.
374. Kledal TN, Rosenkilde MM, Coulin F, Simmons G, Johnsen AH, Alouani S, et al. A Broad-Spectrum Chemokine Antagonist Encoded by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus. *Science*. 1997 Sep 12;277(5332):1656–9.
375. Clatot F, Cornic M, Berghian A, Marchand V, Choussy O, El Ouakif F, et al. CXCL12 and CXCR4, but not CXCR7, are primarily expressed by the stroma in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathology (Phila)*. 2015 Jan;47(1):45–50.
376. Lucchesi W, Brady G, Dittrich-Breiholz O, Kracht M, Russ R, Farrell PJ. Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type 2 EBNA2. *J Virol*. 2008 Aug;82(15):7456–66.
377. Hernandez PA, Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat Genet*. 2003 May;34(1):70–4.
378. Gulino AV, Moratto D, Sozzani S, Cavadini P, Otero K, Tassone L, et al. Altered leukocyte response to CXCL12 in patients with warts hypogammaglobulinemia, infections, myelokathexis (WHIM) syndrome. *Blood*. 2004 Jul 15;104(2):444–52.
379. Haribabu B, Richardson RM, Fisher I, Sozzani S, Peiper SC, Horuk R, et al. Regulation of human chemokine receptors CXCR4. Role of phosphorylation in desensitization and internalization. *J Biol Chem*. 1997 Nov 7;272(45):28726–31.
380. Balabanian K, Lagane B, Pablos JL, Laurent L, Planchenault T, Verola O, et al. WHIM syndromes with different genetic anomalies are accounted for by impaired CXCR4 desensitization to CXCL12. *Blood*. 2005 Mar 15;105(6):2449–57.

381. Kawai T, Malech HL. WHIM syndrome: congenital immune deficiency disease. *Curr Opin Hematol*. 2009 Jan;16(1):20–6.
382. Lagane B, Chow KYC, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T, et al. CXCR4 dimerization and β -arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):34–44.
383. Balabanian K, Brotin E, Biajoux V, Bouchet-Delbos L, Lainey E, Fenneteau O, et al. Proper desensitization of CXCR4 is required for lymphocyte development and peripheral compartmentalization in mice. *Blood*. 2012 Jun 14;119(24):5722–30.
384. Santagata S, Ieranò C, Trotta AM, Capilungo A, Auletta F, Guardascione G, et al. CXCR4 and CXCR7 Signaling Pathways: A Focus on the Cross-Talk Between Cancer Cells and Tumor Microenvironment. *Front Oncol*. 2021;11:591386.
385. Li M, Lu Y, Xu Y, Wang J, Zhang C, Du Y, et al. Horizontal transfer of exosomal CXCR4 promotes murine hepatocarcinoma cell migration, invasion and lymphangiogenesis. *Gene*. 2018 Nov 15;676:101–9.
386. Liu XQ, Fourel L, Dalonneau F, Sadir R, Leal S, Lortat-Jacob H, et al. Biomaterial-enabled delivery of SDF-1 α at the ventral side of breast cancer cells reveals a crosstalk between cell receptors to promote the invasive phenotype. *Biomaterials*. 2017 May;127:61–74.
387. Shanmugam MK, Ahn KS, Hsu A, Woo CC, Yuan Y, Tan KHB, et al. Thymoquinone Inhibits Bone Metastasis of Breast Cancer Cells Through Abrogation of the CXCR4 Signaling Axis. *Front Pharmacol*. 2018;9.
388. Salazar N, Muñoz D, Kallifatidis G, Singh RK, Jordà M, Lokeshwar BL. The chemokine receptor CXCR7 interacts with EGFR to promote breast cancer cell proliferation. *Mol Cancer*. 2014 Aug 28;13:198.
389. Zuo J, Wen M, Li S, Lv X, Wang L, Ai X, et al. Overexpression of CXCR4 promotes invasion and migration of non-small cell lung cancer via EGFR and MMP-9. *Oncol Lett*. 2017 Dec;14(6):7513–21.
390. Singh RK, Lokeshwar BL. The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. *Cancer Res*. 2011 May 1;71(9):3268–77.
391. Salaroglio IC, Mungo E, Gazzano E, Kopecka J, Riganti C. ERK is a Pivotal Player of Chemo-Immune-Resistance in Cancer. *Int J Mol Sci*. 2019 May 21;20(10).
392. Daniel SK. The CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis as a mechanism of immune resistance in gastrointestinal malignancies. *Semin Cancer Biol*. 2020;13.
393. Salazar N, Zabel BA. Support of Tumor Endothelial Cells by Chemokine Receptors. *Front Immunol*. 2019;10:147.
394. Mühlethaler-Mottet A, Liberman J, Ascensão K, Flahaut M, Balmas Bourlout K, Yan P, et al. The CXCR4/CXCR7/CXCL12 Axis Is Involved in a Secondary but Complex Control of Neuroblastoma Metastatic Cell Homing. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125616.
395. Kollmar O, Rupertus K, Scheuer C, Nickels RM, Haberl GCY, Tilton B, et al. CXCR4 and CXCR7 regulate angiogenesis and CT26.WT tumor growth independent from SDF-1. *Int J Cancer*. 2010;126(6):1302–15.
396. Meiron M, Zohar Y, Anunu R, Wildbaum G, Karin N. CXCL12 (SDF-1 α) suppresses ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis by selecting antigen-specific regulatory T cells. *J Exp Med*. 2008 Oct 27;205(11):2643–55.

397. Jiang K, Li J, Zhang J, Wang L, Zhang Q, Ge J, et al. SDF-1/CXCR4 axis facilitates myeloid-derived suppressor cells accumulation in osteosarcoma microenvironment and blunts the response to anti-PD-1 therapy. *Int Immunopharmacol*. 2019 Oct;75:105818.
398. Maksym RB, Tarnowski M, Grymula K, Tarnowska J, Wysoczynski M, Liu R, et al. The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *Eur J Pharmacol*. 2009 Dec 25;625(1-3):31-40.
399. Xu Q, Sun X, Shang X, Jiang H. Association of CXCL12 levels in synovial fluid with the radiographic severity of knee osteoarthritis. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res*. 2012 Aug;60(6):898-901.
400. Lisignoli G, Toneguzzi S, Piacentini A, Cristino S, Grassi F, Cavallo C, et al. CXCL12 (SDF-1) and CXCL13 (BCA-1) chemokines significantly induce proliferation and collagen type I expression in osteoblasts from osteoarthritis patients. *J Cell Physiol*. 2006 Jan;206(1):78-85.
401. Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, et al. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Dec 1;165(11):6590-8.
402. Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Torres C, Brehmer MT, Blanco FJ, et al. Synoviocyte-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Feb 15;170(4):2147-52.
403. Santiago B, Izquierdo E, Rueda P, Del Rey MJ, Criado G, Usategui A, et al. CXCL12 γ isoform is expressed on endothelial and dendritic cells in rheumatoid arthritis synovium and regulates T cell activation. *Arthritis Rheum*. 2012 Feb;64(2):409-17.
404. Gonzalo JA, Lloyd CM, Peled A, Delaney T, Coyle AJ, Gutierrez-Ramos JC. Critical involvement of the chemotactic axis CXCR4/stromal cell-derived factor-1 alpha in the inflammatory component of allergic airway disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000 Jul 1;165(1):499-508.
405. Petty JM, Sueblinvong V, Lenox CC, Jones CC, Cosgrove GP, Cool CD, et al. Pulmonary stromal-derived factor-1 expression and effect on neutrophil recruitment during acute lung injury. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Jun 15;178(12):8148-57.
406. Marks DJB, Rahman FZ, Sewell GW, Segal AW. Crohn's disease: an immune deficiency state. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2010 Feb;38(1):20-31.
407. Dotan I, Werner L, Vigodman S, Weiss S, Brazowski E, Maharshak N, et al. CXCL12 is a constitutive and inflammatory chemokine in the intestinal immune system. *Inflamm Bowel Dis*. 2010 Apr;16(4):583-92.
408. Werner L, Elad H, Brazowski E, Tulchinsky H, Vigodman S, Kopylov U, et al. Reciprocal regulation of CXCR4 and CXCR7 in intestinal mucosal homeostasis and inflammatory bowel disease. *J Leukoc Biol*. 2011 Sep;90(3):583-90.
409. Phillips RJ, Burdick MD, Hong K, Lutz MA, Murray LA, Xue YY, et al. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(3):438-46.
410. Li F, Xu X, Geng J, Wan X, Dai H. The autocrine CXCR4/CXCL12 axis contributes to lung fibrosis through modulation of lung fibroblast activity. *Exp Ther Med*. 2020 Mar;19(3):1844-54.
411. Jaffar J, Griffiths K, Oveissi S, Duan M, Foley M, Glaspole I, et al. CXCR4+ cells are increased in lung tissue of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res*. 2020 Aug 26;21(1):221.

412. Guan S, Zhou J. CXCR7 attenuates the TGF- β -induced endothelial-to-mesenchymal transition and pulmonary fibrosis. *Mol Biosyst.* 2017 Sep 26;13(10):2116–24.
413. Cao Z, Lis R, Ginsberg M, Chavez D, Shido K, Rabbany SY, et al. Targeting of the pulmonary capillary vascular niche promotes lung alveolar repair and ameliorates fibrosis. *Nat Med.* 2016 Feb;22(2):154–62.
414. Akcora BÖ, Storm G, Bansal R. Inhibition of canonical WNT signaling pathway by β -catenin/CBP inhibitor ICG-001 ameliorates liver fibrosis in vivo through suppression of stromal CXCL12. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018 Mar;1864(3):804–18.
415. Saiman Y, Agarwal R, Hickman DA, Fausther M, El-Shamy A, Dranoff JA, et al. CXCL12 induces hepatic stellate cell contraction through a calcium-independent pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2013 Sep 1;305(5):G375-382.
416. Ding B-S, Cao Z, Lis R, Nolan DJ, Guo P, Simons M, et al. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature.* 2014 Jan;505(7481):97–102.
417. Ding J, Hori K, Zhang R, Marcoux Y, Honardoust D, Shankowsky HA, et al. Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and its receptor CXCR4 in the formation of postburn hypertrophic scar (HTS). *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* 2011 Oct;19(5):568–78.
418. Cao J, Zhu W, Yu D, Pan L, Zhong L, Xiao Y, et al. The Involvement of SDF-1 α /CXCR4 Axis in Radiation-Induced Acute Injury and Fibrosis of Skin. *Radiat Res.* 2019 Aug;192(4):410–21.
419. Hu B, Wang J, Chen J, Zhao L, Li X. The heterogeneity of fibroblasts in laryngotracheal stenosis and skin hypertrophic scar in pediatric patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2021 Jun;145:110709.
420. Desnoyer A, Dupin N, Assoumou L, Carlotti A, Gaudin F, Deback C, et al. Expression pattern of the CXCL12/CXCR4-CXCR7 trio in Kaposi sarcoma skin lesions. *Br J Dermatol.* 2016 Dec;175(6):1251–62.
421. Hu SC-S, Yu H-S, Yen F-L, Chen G-S, Lan C-CE. CXCR7 expression correlates with tumor depth in cutaneous squamous cell carcinoma skin lesions and promotes tumor cell survival through ERK activation. *Exp Dermatol.* 2014 Dec;23(12):902–8.
422. Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, Tepper OM, Bastidas N, Kleinman ME, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 2004 Aug;10(8):858–64.
423. Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller F-J, Nieto M, Teng YD, et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 α /CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 28;101(52):18117–22.
424. Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, et al. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004 Jan;63(1):84–96.
425. Bogoslovsky T, Spatz M, Chaudhry A, Maric D, Luby M, Frank J, et al. Stromal-derived factor-1[α] correlates with circulating endothelial progenitor cells and with acute lesion volume in stroke patients. *Stroke.* 2011 Mar;42(3):618–25.
426. Stumm RK, Rummel J, Junker V, Culmsee C, Pfeiffer M, Krieglstein J, et al. A Dual Role for the SDF-1/CXCR4 Chemokine Receptor System in Adult Brain: Isoform-Selective Regulation of SDF-1 Expression Modulates CXCR4-Dependent Neuronal Plasticity and Cerebral Leukocyte Recruitment after Focal Ischemia. *J Neurosci.* 2002 Jul 15;22(14):5865–78.

427. Li Y, Tang G, Liu Y, He X, Huang J, Lin X, et al. CXCL12 Gene Therapy Ameliorates Ischemia-Induced White Matter Injury in Mouse Brain. *STEM CELLS Transl Med.* 2015;4(10):1122–30.
428. Zhang Y, Zhang H, Lin S, Chen X, Yao Y, Mao X, et al. SDF-1/CXCR7 Chemokine Signaling is Induced in the Peri-Infarct Regions in Patients with Ischemic Stroke. *Aging Dis.* 2018 Apr;9(2):287–95.
429. Schönemeier B, Schulz S, Hoell V, Stumm R. Enhanced expression of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 after cerebral ischemia in the rat brain. *J Neuroimmunol.* 2008 Jul 31;198(1–2):39–45.
430. van Weel V, Seghers L, de Vries MR, Kuiper EJ, Schlingemann RO, Bajema IM, et al. Expression of vascular endothelial growth factor, stromal cell-derived factor-1, and CXCR4 in human limb muscle with acute and chronic ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Jun;27(6):1426–32.
431. Tan Y, Shao H, Eton D, Yang Z, Alonso-Diaz L, Zhang H, et al. Stromal cell-derived factor-1 enhances pro-angiogenic effect of granulocyte-colony stimulating factor. *Cardiovasc Res.* 2007 Mar 1;73(4):823–32.
432. Hiasa K, Ishibashi M, Ohtani K, Inoue S, Zhao Q, Kitamoto S, et al. Gene transfer of stromal cell-derived factor-1alpha enhances ischemic vasculogenesis and angiogenesis via vascular endothelial growth factor/endothelial nitric oxide synthase-related pathway: next-generation chemokine therapy for therapeutic neovascularization. *Circulation.* 2004 May 25;109(20):2454–61.
433. Zemani F, Silvestre J-S, Fauvel-Lafeve F, Bruel A, Vilar J, Bieche I, et al. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Apr;28(4):644–50.
434. Capoccia BJ, Shepherd RM, Link DC. G-CSF and AMD3100 mobilize monocytes into the blood that stimulate angiogenesis in vivo through a paracrine mechanism. *Blood.* 2006 Oct 1;108(7):2438–45.
435. Dai X, Yan X, Zeng J, Chen J, Wang Y, Chen J, et al. Elevating CXCR7 Improves Angiogenic Function of EPCs via Akt/GSK-3 β /Fyn-Mediated Nrf2 Activation in Diabetic Limb Ischemia. *Circ Res.* 2017 Mar 3;120(5):e7–23.
436. Hao H, Hu S, Chen H, Bu D, Zhu L, Xu C, et al. Loss of Endothelial CXCR7 Impairs Vascular Homeostasis and Cardiac Remodeling After Myocardial Infarction: Implications for Cardiovascular Drug Discovery. *Circulation.* 2017 Mar 28;135(13):1253–64.
437. Saxena A, Fish JE, White MD, Yu S, Smyth JWP, Shaw RM, et al. Stromal cell-derived factor-1alpha is cardioprotective after myocardial infarction. *Circulation.* 2008 Apr 29;117(17):2224–31.
438. Mühlstedt S, Ghadge SK, Duchene J, Qadri F, Järve A, Vilianovich L, et al. Cardiomyocyte-derived CXCL12 is not involved in cardiogenesis but plays a crucial role in myocardial infarction. *J Mol Med Berl Ger.* 2016 Sep;94(9):1005–14.
439. Döring Y, Pawig L, Weber C, Noels H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol.* 2014.
440. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001 Apr 5;410(6829):701–5.
441. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med.* 1997 Jan 6;185(1):111–20.

442. Yamani MH, Ratliff NB, Cook DJ, Tuzcu EM, Yu Y, Hobbs R, et al. Peritransplant ischemic injury is associated with up-regulation of stromal cell-derived factor-1. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Sep 20;46(6):1029–35.
443. Unzek S, Zhang M, Mal N, Mills WR, Laurita KR, Penn MS. SDF-1 recruits cardiac stem cell-like cells that depolarize in vivo. *Cell Transplant*. 2007;16(9):879–86.
444. Koch K-C, Schaefer WM, Liehn EA, Rammos C, Mueller D, Schroeder J, et al. Effect of catheter-based transendocardial delivery of stromal cell-derived factor 1alpha on left ventricular function and perfusion in a porcine model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2006 Jan;101(1):69–77.
445. Liu Y, Gao S, Wang Z, Yang Y, Huo H, Tian X. Effect of stromal cell-derived factor-1 on myocardial apoptosis and cardiac function recovery in rats with acute myocardial infarction. *Exp Ther Med*. 2016 Nov;12(5):3282–6.
446. Zerneck A, Schober A, Bot I, von Hundelshausen P, Liehn EA, Möpps B, et al. SDF-1alpha/CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circ Res*. 2005 Apr 15;96(7):784–91.
447. Jarrah AA, Schwarskopf M, Wang ER, LaRocca T, Dhume A, Zhang S, et al. SDF-1 induces TNF-mediated apoptosis in cardiac myocytes. *Apoptosis*. 2018 Jan;23(1):79–91.
448. Veldkamp CT, Ziarek JJ, Su J, Basnet H, Lennertz R, Weiner JJ, et al. Monomeric structure of the cardioprotective chemokine SDF-1/CXCL12. *Protein Sci*. 2009;18(7):1359–69.
449. Cheng X, Liao Y-H, Ge H, Li B, Zhang J, Yuan J, et al. TH1/TH2 functional imbalance after acute myocardial infarction: coronary arterial inflammation or myocardial inflammation. *J Clin Immunol*. 2005 May;25(3):246–53.
450. Yu Q, Watson RR, Marchalonis JJ, Larson DF. A role for T lymphocytes in mediating cardiac diastolic function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Aug;289(2):H643–651.
451. Chen D, Xia Y, Zuo K, Wang Y, Zhang S, Kuang D, et al. Crosstalk between SDF-1/CXCR4 and SDF-1/CXCR7 in cardiac stem cell migration. *Sci Rep*. 2015 Dec;5(1):16813.
452. Ceholski DK, Turnbull IC, Pothula V, Lecce L, Jarrah AA, Kho C, et al. CXCR4 and CXCR7 play distinct roles in cardiac lineage specification and pharmacologic β -adrenergic response. *Stem Cell Res*. 2017 Aug;23:77–86.
453. Agarwal U, Ghalayini W, Dong F, Weber K, Zou Y-R, Rabbany SY, et al. Role of Cardiac Myocyte CXCR4 Expression in Development and Left Ventricular Remodeling After Acute Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2010 Sep 3;107(5):667–76.
454. Liehn EA, Tuchscheerer N, Kanzler I, Drechsler M, Fraemohs L, Schuh A, et al. Double-Edged Role of the CXCL12/CXCR4 Axis in Experimental Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Nov;58(23):2415–23.
455. Schumacher D, Curaj A, Staudt M, Cordes F, Dumitraşcu AR, Rolles B, et al. Phosphatidylserine Supplementation as a Novel Strategy for Reducing Myocardial Infarct Size and Preventing Adverse Left Ventricular Remodeling. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr 22;22(9):4401.
456. Jujo K, Hamada H, Iwakura A, Thorne T, Sekiguchi H, Clarke T, et al. CXCR4 blockade augments bone marrow progenitor cell recruitment to the neovasculature and reduces mortality after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 15;107(24):11008–13.
457. Abbott JD, Huang Y, Liu D, Hickey R, Krause DS, Giordano FJ. Stromal cell-derived factor-1alpha plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation*. 2004 Nov 23;110(21):3300–5.

458. Jujo K, Ii M, Sekiguchi H, Klyachko E, Misener S, Tanaka T, et al. CXC-chemokine receptor 4 antagonist AMD3100 promotes cardiac functional recovery after ischemia/reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Circulation*. 2013 Jan 1;127(1):63–73.
459. Wang Y, Dembowsky K, Chevalier E, Stüve P, Korf-Klingebiel M, Lochner M, et al. C-X-C Motif Chemokine Receptor 4 Blockade Promotes Tissue Repair After Myocardial Infarction by Enhancing Regulatory T Cell Mobilization and Immune-Regulatory Function. *Circulation*. 2019 Apr 9;139(15):1798–812.
460. Chen J, Chemaly E, Liang L, Kho C, Lee A, Park J, et al. Effects of CXCR4 gene transfer on cardiac function after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol*. 2010 Apr;176(4):1705–15.
461. Ishizuka M, Harada M, Nomura S, Ko T, Ikeda Y, Guo J, et al. CXCR7 ameliorates myocardial infarction as a β -arrestin-biased receptor. *Sci Rep*. 2021 Dec;11(1):3426.
462. Zhang M, Qiu L, Zhang Y, Xu D, Zheng JC, Jiang L. CXCL12 enhances angiogenesis through CXCR7 activation in human umbilical vein endothelial cells. *Sci Rep*. 2017 Dec;7(1):8289.
463. Zhang S, Yue J, Ge Z, Xie Y, Zhang M, Jiang L. Activation of CXCR7 alleviates cardiac insufficiency after myocardial infarction by promoting angiogenesis and reducing apoptosis. *Biomed Pharmacother*. 2020 Jul;127:110168.
464. Ghadge SK, Messner M, Seiringer H, Maurer T, Stagg S, Zeller T, et al. Smooth Muscle Specific Ablation of CXCL12 in Mice Downregulates CXCR7 Associated with Defective Coronary Arteries and Cardiac Hypertrophy. *Int J Mol Sci*. 2021 May 31;22(11):5908.
465. Ma W, Liu Y, Ellison N, Shen J. Induction of C-X-C chemokine receptor type 7 (CXCR7) switches stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) signaling and phagocytic activity in macrophages linked to atherosclerosis. *J Biol Chem*. 2013 May 31;288(22):15481–94.
466. Zhang J, Zhang Y, Xin S, Wu M, Zhang Y, Sun L. CXCR7 suppression modulates macrophage phenotype and function to ameliorate post-myocardial infarction injury. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al*. 2020 May;69(5):523–32.
467. MacArthur JW, Purcell BP, Shudo Y, Cohen JE, Fairman A, Trubelja A, et al. Sustained Release of Engineered Stromal Cell-Derived Factor 1- From Injectable Hydrogels Effectively Recruits Endothelial Progenitor Cells and Preserves Ventricular Function After Myocardial Infarction. *Circulation*. 2013 Sep 10;128(11_suppl_1):S79–86.
468. MacArthur JW, Cohen JE, McGarvey JR, Shudo Y, Patel JB, Trubelja A, et al. Preclinical Evaluation of the Engineered Stem Cell Chemokine Stromal Cell-Derived Factor 1 α Analog in a Translational Ovine Myocardial Infarction Model. *Circ Res*. 2014 Feb 14;114(4):650–9.
469. Tang J, Wang J, Song H, Huang Y, Yang J, Kong X, et al. Adenovirus-mediated stromal cell-derived factor-1 alpha gene transfer improves cardiac structure and function after experimental myocardial infarction through angiogenic and antifibrotic actions. *Mol Biol Rep*. 2010;37(4):1957–69.
470. Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet Lond Engl*. 2003 Aug 30;362(9385):697–703.
471. Elmadbouh I, Haider HK, Jiang S, Idris NM, Lu G, Ashraf M. Ex vivo delivered stromal cell-derived factor-1alpha promotes stem cell homing and induces angiomyogenesis in the infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2007 Apr;42(4):792–803.
472. Proulx C, El-Helou V, Gosselin H, Clement R, Gillis M-A, Villeneuve L, et al. Antagonism of stromal cell-derived factor-1alpha reduces infarct size and improves ventricular function after myocardial infarction. *Pflugers Arch*. 2007 Nov;455(2):241–50.

473. Dai S, Yuan F, Mu J, Li C, Chen N, Guo S, et al. Chronic AMD3100 antagonism of SDF-1 α -CXCR4 exacerbates cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Oct;49(4):587–97.
474. Penn MS, Mendelsohn FO, Schaer GL, Sherman W, Farr M, Pastore J, et al. An open-label dose escalation study to evaluate the safety of administration of nonviral stromal cell-derived factor-1 plasmid to treat symptomatic ischemic heart failure. *Circ Res.* 2013 Mar 1;112(5):816–25.
475. Chung ES, Miller L, Patel AN, Anderson RD, Mendelsohn FO, Traverse J, et al. Changes in ventricular remodelling and clinical status during the year following a single administration of stromal cell-derived factor-1 non-viral gene therapy in chronic ischaemic heart failure patients: the STOP-HF randomized Phase II trial. *Eur Heart J.* 2015 Sep 1;36(33):2228–38.
476. Zaruba M-M, Theiss HD, Vallaster M, Mehl U, Brunner S, David R, et al. Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction. *Cell Stem Cell.* 2009 Apr 3;4(4):313–23.
477. Theiss HD, Brenner C, Engelmann MG, Zaruba M-M, Huber B, Henschel V, et al. Safety and efficacy of SITAgliptin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial)--rationale, design and first interim analysis. *Int J Cardiol.* 2010 Nov 19;145(2):282–4.
478. Brenner C, Adrion C, Grabmaier U, Theisen D, von Ziegler F, Leber A, et al. Sitagliptin plus granulocyte colony-stimulating factor in patients suffering from acute myocardial infarction: A double-blind, randomized placebo-controlled trial of efficacy and safety (SITAGRAMI trial). *Int J Cardiol.* 2016 Feb 15;205:23–30.
479. Gross L, Theiss HD, Grabmaier U, Adrion C, Mansmann U, Sohn H-Y, et al. Combined therapy with sitagliptin plus granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction - Long-term results of the SITAGRAMI trial. *Int J Cardiol.* 2016 Jul 15;215:441–5.
480. Pernas S, Martin M, Kaufman PA, Gil-Martin M, Gomez Pardo P, Lopez-Tarruella S, et al. Balixafortide plus eribulin in HER2-negative metastatic breast cancer: a phase 1, single-arm, dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 2018 Jun;19(6):812–24.
481. Peled A, Grabovsky V, Habler L, Sandbank J, Arenzana-Seisdedos F, Petit I, et al. The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. *J Clin Invest.* 1999 Nov;104(9):1199–211.
482. Grabovsky V, Feigelson S, Chen C, Bleijs DA, Peled A, Cinamon G, et al. Subsecond induction of α 4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions. *J Exp Med.* 2000 Aug 21;192(4):495–506.
483. Huynh C, Dingemans J, Meyer zu Schwabedissen HE, Sidharta PN. Relevance of the CXCR4/CXCR7-CXCL12 axis and its effect in pathophysiological conditions. *Pharmacol Res.* 2020 Nov;161:105092.
484. O'Boyle G, Mellor P, Kirby JA, Ali S. Anti-inflammatory therapy by intravenous delivery of non-heparan sulfate-binding CXCL12. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2009 Nov;23(11):3906–16.
485. Mouton AJ, Ma Y, Rivera Gonzalez OJ, Daseke MJ, Flynn ER, Freeman TC, et al. Fibroblast polarization over the myocardial infarction time continuum shifts roles from inflammation to angiogenesis. *Basic Res Cardiol.* 2019 Jan 11;114(2):6.

486. Schumann K, Lämmermann T, Bruckner M, Legler DF, Polleux J, Spatz JP, et al. Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity*. 2010 May 28;32(5):703–13.
487. Jackson EK, Zhang Y, Gillespie DD, Zhu X, Cheng D, Jackson TC. SDF-1 α (Stromal Cell-Derived Factor 1 α) Induces Cardiac Fibroblasts, Renal Microvascular Smooth Muscle Cells, and Glomerular Mesangial Cells to Proliferate, Cause Hypertrophy, and Produce Collagen. *J Am Heart Assoc*. 2017 Nov 7;6(11):e007253.
488. Vidal R, Wagner JUG, Braeuning C, Fischer C, Patrick R, Tombor L, et al. Transcriptional heterogeneity of fibroblasts is a hallmark of the aging heart. *JCI Insight*. 2019 Nov 14;4(22):131092.
489. Zheng K, Li H-Y, Su X-L, Wang X-Y, Tian T, Li F, et al. Chemokine receptor CXCR7 regulates the invasion, angiogenesis and tumor growth of human hepatocellular carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res CR*. 2010 Apr 11;29:31.
490. Rupp C, Dolznig H, Puri C, Schweifer N, Sommergruber W, Kraut N, et al. Laser capture microdissection of epithelial cancers guided by antibodies against fibroblast activation protein and endosialin. *Diagn Mol Pathol Am J Surg Pathol Part B*. 2006 Mar;15(1):35–42.
491. Naylor AJ, McGettrick HM, Maynard WD, May P, Barone F, Croft AP, et al. A differential role for CD248 (Endosialin) in PDGF-mediated skeletal muscle angiogenesis. *PLoS One*. 2014;9(9):e107146.
492. Muhl L, Genové G, Leptidis S, Liu J, He L, Mocci G, et al. Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination. *Nat Commun*. 2020 Aug 7;11(1):3953.
493. Tallquist MD. Cardiac Fibroblast Diversity. *Annu Rev Physiol*. 2020 Feb 10;82:63–78.
494. Caneparo C, Baratange C, Chabaud S, Bolduc S. Conditioned medium produced by fibroblasts cultured in low oxygen pressure allows the formation of highly structured capillary-like networks in fibrin gels. *Sci Rep*. 2020 Jun 9;10(1):9291.
495. Saraswati S, Marrow SMW, Watch LA, Young PP. Identification of a pro-angiogenic functional role for FSP1-positive fibroblast subtype in wound healing. *Nat Commun*. 2019 Jul 9;10(1):3027.
496. Waza AA, Andrabi K, Hussain MU. Protein kinase C (PKC) mediated interaction between connexin43 (Cx43) and K(+)(ATP) channel subunit (Kir6.1) in cardiomyocyte mitochondria: Implications in cytoprotection against hypoxia induced cell apoptosis. *Cell Signal*. 2014 Sep;26(9):1909–17.
497. Michela P, Velia V, Aldo P, Ada P. Role of connexin 43 in cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol*. 2015 Dec 5;768:71–6.
498. Schultz F, Swiatlowska P, Alvarez-Laviada A, Sanchez-Alonso JL, Song Q, de Vries AAF, et al. Cardiomyocyte-myofibroblast contact dynamism is modulated by connexin-43. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2019 Sep;33(9):10453–68.
499. Das S, Goldstone AB, Wang H, Farry J, D'Amato G, Paulsen MJ, et al. A Unique Collateral Artery Development Program Promotes Neonatal Heart Regeneration. *Cell*. 2019 Feb 21;176(5):1128–1142.e18.
500. Schellings MWM, Vanhoutte D, van Almen GC, Swinnen M, Leenders JGG, Kubben N, et al. Syndecan-1 amplifies angiotensin II-induced cardiac fibrosis. *Hypertens Dallas Tex 1979*. 2010 Feb;55(2):249–56.
501. Lunde IG, Herum KM, Carlson CC, Christensen G. Syndecans in heart fibrosis. *Cell Tissue Res*. 2016 Sep;365(3):539–52.

502. Frangogiannis NG. Syndecan-1. *Hypertension*. 2010 Feb 1;55(2):233–5.
503. Fears CY, Woods A. The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2006 Sep;25(7):443–56.
504. Christensen G, Herum KM, Lunde IG. Sweet, yet underappreciated: Proteoglycans and extracellular matrix remodeling in heart disease. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2019 Jan;75–76:286–99.
505. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol Cell Biol*. 2011 Feb;89(2):207–15.
506. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, et al. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature*. 1993 Oct 21;365(6448):756–9.
507. Chatterjee M, Borst O, Walker B, Fotinos A, Vogel S, Seizer P, et al. Macrophage migration inhibitory factor limits activation-induced apoptosis of platelets via CXCR7-dependent Akt signaling. *Circ Res*. 2014 Nov 7;115(11):939–49.
508. Xu X, Pang J, Chen Y, Bucala R, Zhang Y, Ren J. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Deficiency Exacerbates Aging-Induced Cardiac Remodeling and Dysfunction Despite Improved Inflammation: Role of Autophagy Regulation. *Sci Rep*. 2016 Mar 4;6:22488.
509. Voss S, Krüger S, Scherschel K, Warnke S, Schwarzl M, Schrage B, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Expression Increases during Myocardial Infarction and Supports Pro-Inflammatory Signaling in Cardiac Fibroblasts. *Biomolecules*. 2019 Jan 23;9(2):E38.
510. Dayawansa NH, Gao X-M, White DA, Dart AM, Du X-J. Role of MIF in myocardial ischaemia and infarction: insight from recent clinical and experimental findings. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2014 Aug;127(3):149–61.

6. Annexes

A. Cardiomyocytes and Macrophages Discourse on the Method to Govern Cardiac Repair.



Cardiomyocytes and Macrophages Discourse on the Method to Govern Cardiac Repair

Ingrid Gomez, Vincent Duval and Jean-Sébastien Silvestre*

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), UMRS-970, Paris Centre de Recherche Cardiovasculaire, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Paolo Madeddu,
University of Bristol, United Kingdom

Reviewed by:

Federico Quaini,
Università degli Studi di Parma, Italy

Rosalinda Madonna,
University of "G. d'Annunzio" Chieti -
Pescara, Italy

Antonio Paolo Beltrami,
Università degli Studi di Udine, Italy

*Correspondence:

Jean-Sébastien Silvestre
jean-sebastien.silvestre@inserm.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Cardiovascular Biologics and
Regenerative Medicine,
a section of the journal
Frontiers in Cardiovascular Medicine

Received: 17 April 2018

Accepted: 05 September 2018

Published: 02 October 2018

Citation:

Gomez I, Duval V and Silvestre J-S
(2018) Cardiomyocytes and
Macrophages Discourse on the
Method to Govern Cardiac Repair.
Front. Cardiovasc. Med. 5:134.
doi: 10.3389/fcvm.2018.00134

In response to pathophysiological stress, the cardiac tissue undergoes profound remodeling process that incorporates the elimination of dying resident cells, compensatory hypertrophy of functional cardiomyocytes, growth and remodeling of the vascular compartment and formation of a fibrotic scar. Accumulating evidences indicate that cardiac remodeling is, at least in part, controlled by a complex crosstalk between cardiomyocytes and macrophages. The strategic location of abundant macrophages to the proximity of cardiomyocytes suggest that they could regulate the fate of cardiomyocytes in the injured heart. As such, macrophages appear as critical support cells for cardiomyocytes and play central roles in cardiac hypertrophy, fibrosis and remodeling. Notably, the cardiac tissue expands heterogeneous population of cardiac macrophages through local proliferation of resident macrophage as well as recruitment and differentiation of blood-derived monocytes. It has also been suggested that cardiac-resident macrophages display distinct functional properties from that of monocyte-derived macrophages in cardiac tissue. Furthermore, macrophages are an overflowing source of biological entities with non-canonical roles on cardiac conduction or cardiomyocyte proliferation by regulating action potential diffusion or cardiac cell cycle reentry. Alternatively, stressed cardiomyocytes can trigger the release of a broad repertoire of instructive signals that can regulate macrophage number, skew their phenotype and therefore direct their beneficial or deleterious actions. In this review, we highlight recent discoveries describing how the intricate dialogue between cardiomyocytes and macrophages can shape the deleterious or healing signaling mechanisms in the injured cardiac tissue.

Keywords: heart, inflammation, macrophages, heart failure, myocardial infarction

Pathological conditions (hypertension, heart valve disease, myocardial infarction, cardiomyopathy) result in cardiomyocyte hypertrophy and cardiac remodeling progression associated with systolic and diastolic dysfunction. This adverse ventricular remodeling precipitates the occurrence of heart failure, arrhythmia, or sudden death. Hypoxia, neuro-humoral activation, and mechanical stress initiate multiple signaling pathways leading to cardiomyocyte death and hypertrophic growth of surviving cardiomyocytes. Nevertheless, the heart also entails different types of non-myocyte cells, including vascular cells, fibroblasts and inflammatory cells. Notably, emerging evidences indicate that cardiac remodeling is regulated by direct and indirect communications between cardiomyocytes and inflammatory cells. In response to

pathophysiological stress, the abundance of inflammatory cells and particularly, that of macrophages, and their proximity to cardiomyocytes, position them to critically regulate cardiomyocyte homeostasis in the injured heart. As such, macrophages appear as critical support cells for cardiomyocytes and play central roles in cardiac hypertrophy, fibrosis and remodeling. In this review, we highlight recent advances, mainly related to experimental observations, in our understanding of the decisive interaction between macrophages and cardiomyocytes.

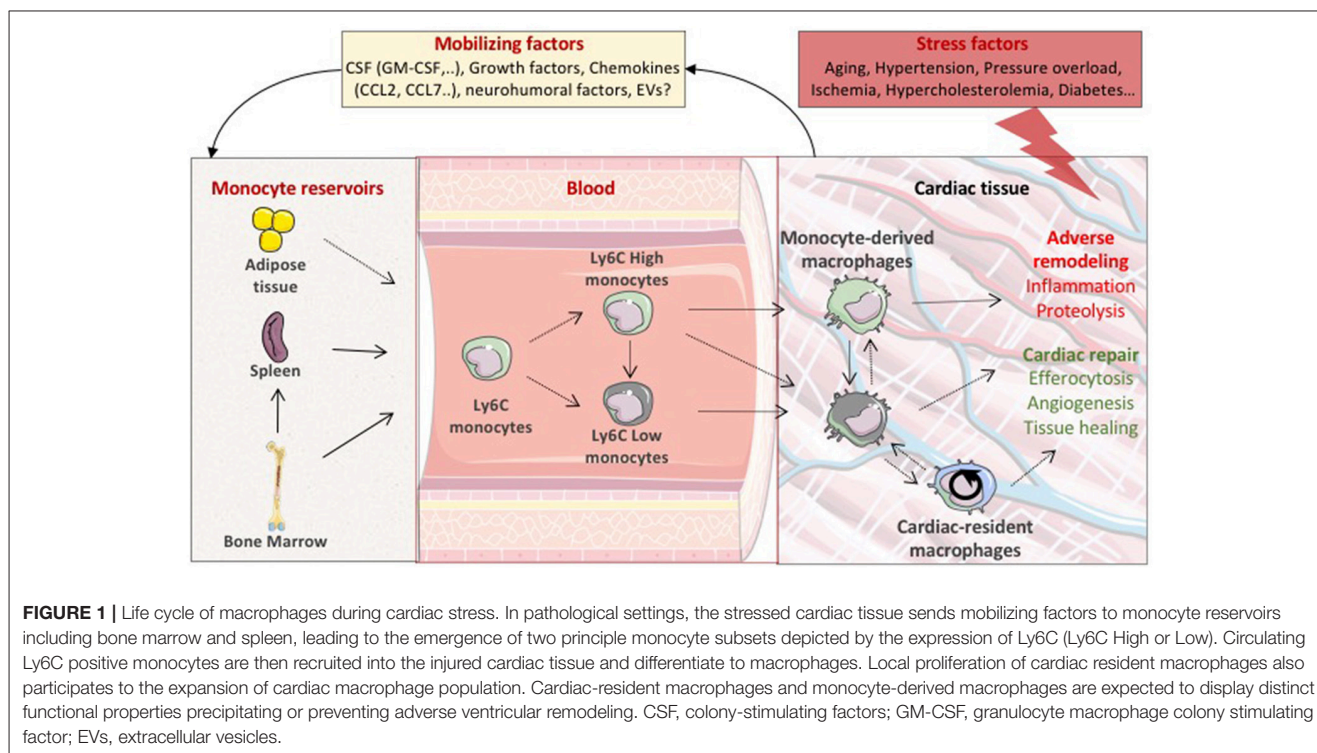
ORIGIN OF CARDIAC MACROPHAGES

During early gestation, around embryonic day 7, primitive hematopoiesis occurs and macrophages expand in the extra-embryonic yolk sac. Subsequently, erythromyeloid precursors emerge from the yolk sac, and generate fetal macrophages. The onset of vascularization is associated with erythromyeloid precursors migration to the fetal liver. Concomitantly, hematopoietic stem cells (HSCs) arise from the aorta-gonad-mesonephros and migrate to the fetal liver. In the perinatal period, bone marrow serves as a major reservoir of HSCs and synthesizes the complete repertoire of immune cells (1).

The development of genetic fate-mapping techniques allows to classify and track distinct macrophage subsets, and when associated with parabiotic and adoptive-transplant studies, permits to discern the origin of tissue macrophages. Using this combination of methods, it has become obvious that most of cardiac macrophages derives from precursor of embryonic origin, but not from circulating monocytes after birth (2). Murine cardiac macrophages (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺CD64⁺ or CD68⁺) are further categorized by expression of CCR2 (C-C chemokine receptor type 2), MHC-II (major histocompatibility complex II), and the lymphocyte antigen 6 complex (Ly6C). High and low expression of Ly6C can be used to discriminate inflammatory and reparative macrophages but the use of both CCR2 and MHC-II is useful to distinguish three separate and discrete cardiac macrophages pools from different origins. In steady state, the adult heart contained two resident macrophages subsets, MHC-II^{low}CCR2⁻ and MHC-II^{high}CCR2⁻ cells. These macrophages are separate from the blood monocyte pool and originate mainly from yolk sac- and fetal liver- embryonic progenitors (2, 3). The third macrophage pool expresses CCR2 (MHC-II^{high}CCR2⁺) but is smaller numerically and is derived entirely from blood monocytes (2, 3). In the steady state, tissue-resident macrophages constitute the main subset of cardiac macrophages and are preserved through tissue proliferation (2). Nevertheless, it has been suggested that self-renewal of cardiac-resident macrophages declines with aging and that a substantial pool of cardiac resident macrophages is replenished by monocyte-derived macrophages, even in the lack of pathological triggers and inflammation (4). Indeed, using alternative gating strategy based on MHC-II and CX3CR1 expression, it has been shown that the proliferation capacity of embryo-derived cardiac macrophages is progressively reduced from the peri-natal period (4).

Of note, comprehensive transcriptional analysis of resident macrophages suggests that resident macrophages isolated from various organs are transcriptionally different from each other (5, 6). It is therefore likely that the tissue niche provides instructive signals coordinating macrophage phenotype and that the cardiac environment shapes the gene repertoire and controls macrophage-related functions. Furthermore, alteration of this cardiac niche is expected to affect the transcriptional network of cardiac macrophages resulting in a continuum of polarization states in the pathological heart.

Physiological and pathological settings adjust the number of each cardiac macrophage pools. Macrophage number could depend on local expansion of resident macrophage or recruitment and differentiation of blood-derived monocytes. In the absence of circulating monocytes, such as in CCR2 deficient mice, resident cells can repopulate the pool of cardiac macrophages. After transient depletion of macrophages with clodronate liposomes, circulating monocytes infiltrate the myocardium and are able to differentiate into long lasting populations of cardiac macrophages. Furthermore, CCR2⁻ macrophages disappeared after a cardiac insult and blood monocytes fully replenish heart macrophages (2, 7). Hence, after a cardiac insult, it is likely that bone marrow-derived monocyte populations represent the major cardiac macrophage substitute. Notably, in the bone marrow, a CCR2⁺CD150⁺CD48⁻ Lineage⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ hematopoietic subset has been identified as the main precursor of myeloid cells after ischemic insult (8). The cardiac tissue produces mobilizing factors such as granulocyte/macrophage colony-stimulating factor or CCL (CC motif chemokine ligand)2 and CCL7 that act distally to foster monocyte mobilization from the bone marrow to the blood (9–11). Bone marrow-derived HSCs lead to the emergence of two principle monocyte subsets depicted by the expression Ly6C. Classical Ly6C^{high} monocytes appear to originate from Ly6C⁺ monocyte progenitors, and non-classical Ly6C^{low} monocytes, which likely differentiate from Ly6C^{high} monocytes, through a Nr4a1-dependent transcriptional program (12–14). Bone marrow derived Ly6C monocytes are recruited into the injured cardiac tissue and differentiate to macrophages. In addition to the bone marrow, the spleen also acts as a reservoir for Ly6C^{high} monocytes and participates to cardiac macrophage repopulation [(15); **Figure 1**]. One can also speculate that additional compartment could participate to the inflammatory cell influx within the cardiac tissue. In this line of reasoning, the pericardial adipose tissue has been shown to contain a high density of lymphoid clusters (16). The white adipose tissue has also been identified as a reservoir of mast cell progenitors, that do not originate from the bone marrow, and are able to home to cardiac tissue through a stem cell factor dependent signaling (17). The putative contribution of adipose tissue to the monocyte and/or macrophage pool remains to be defined. Altogether, these results indicate that, following the disruption of homeostasis; multiple complementary pathways could participate to the dynamic regulation of the heterogeneous population of cardiac resident macrophages.



In macrophage-depleted mice, infarct healing is impaired, and myocardial rupture occurs suggesting a net beneficial role of the heterogeneous population of cardiac macrophages in cardiac repair (18–20). Resident macrophages are expected to display functional properties distinct from that of monocyte-derived macrophages. Transcriptional analysis revealed that monocyte-derived macrophages synchronize cardiac inflammation, but are less efficient in antigen processing and clearance of dying cells (2). In particular, $CCR2^+$ macrophages contain distinct components of the NLRP3 inflammasome and are instrumental in IL-1 β release (2). On the same note, chemoattractants CXCL (C-X-C motif chemokine ligand)2 and CXCL5 produced by $CCR2^+$ resident macrophages have been shown to specifically contribute to the initial neutrophil extravasation into the ischemic area (21). Inhibition of monocyte and monocyte-derived macrophage recruitment improves outcome after acute MI and myocardial infarction-induced heart failure. Conversely, cardiac-resident macrophages (MHC-II^{low}CCR2⁻ and MHC-II^{high}CCR2⁻) seem to display robust proangiogenic and mitogenic properties, suggesting a reparative potential for these macrophage subsets [(22); Figure 1].

Nevertheless, it must be acknowledged that there is no consensus to harmonize the phenotypic classification of macrophages, which induces uncertainty in the characterization as well as function of the distinct sub-populations of cardiac macrophages. An ambiguity amplified by the use of enzymatic digestion methods designed to isolate cardiac inflammatory cells that alter the levels of cell-surface markers and by the shared expression of some markers such as CD11b, Ly6C or F4/80 on dendritic cells or myeloid derived suppressor cells (23).

Although macrophages are clearly present in human heart (24), information regarding their function, origin and heterogeneity in steady state and pathological conditions are lacking. Nevertheless, two distinct populations of macrophages have been identified in left ventricular myocardial specimens from patients with dilated and ischemic cardiomyopathies (25). $CCR2^+$ and HLA-DR High (the human homolog of MHC II) macrophages are monocyte-derived cells with specific pro-inflammatory potential whereas $CCR2^-$ and HLA-DR High macrophages are resident cells with reparative properties [(25); Table 1].

MACROPHAGES AND OUTSIDE-IN SIGNALING WITHIN CARDIOMYOCYTES

Canonical Role of Macrophages

The interaction between macrophages and cardiomyocytes hypertrophy and survival has been studied in experimental model of acute injury (mainly acute myocardial infarction) or heart failure following pressure overload, hypertensive treatment, or myocardial infarction. Whatever the incentive stimulus, the failing heart contains increased number of macrophages that expand by both local proliferation of resident macrophage and further recruitment and differentiation of circulating monocyte (2, 7, 26, 27). Interactions of cardiac macrophages with other non-myocyte cells including inflammatory cells, vascular cells and fibroblasts shape the dysfunctional heart. These cardiac macrophages also secrete factors that directly or indirectly alter the cardiac extracellular matrix network. Hence, the net impact of cardiac macrophages on cardiomyocyte likely relies

TABLE 1 | Immunophenotypic properties of different subsets of embryo- and monocyte-derived cardiac macrophages.

		Origin of cardiac M ϕ	Inflammatory cell signature markers	M ϕ signature markers	Specific signature markers
Mice	Gating strategy 1	Embryo-derived M ϕ	CD45+, CD11b+, Auto+, Ly6C-	CD64+, Mertk+, F4/80+	MHCII High/Low and CCR2-
		Monocyte-derived M ϕ	CD45+, CD11b+, Auto+, Ly6C-	CD64+, Mertk+, F4/80+	MHCII High and CCR2+
	Gating strategy 2	Embryo-derived M ϕ	CD11b+, Ly6C Low, CD11c Low-Int	CD14+, CD64+, F4/80+, Mertk+	CX3CR1+ and MHCII-
		Monocyte-derived M ϕ	CD11b+, Ly6C Low, CD11c Low-Int	CD14+, CD64+, F4/80+, Mertk+	CX3CR1 \pm and MHCII+
Human	Gating strategy 3	Resident M ϕ	CD45+	CD14+, CD64+, Mertk+, CD68+	CCR2- and HLA-DR High
		Monocyte-derived M ϕ	CD45+	CD14+, CD64+, Mertk+, CD68+	CCR2+ and HLA-DR High

Gating strategy 1, 2, and 3 from Epelman et al. (2), Molawi et al. (4), and Bajpai et al. (25), respectively. M ϕ indicates macrophages; Auto, auto-fluorescence; int, intermediate.

on pleiotropic effects involving regulation of distinct and complementary processes. Furthermore, the molecular cascades involved in macrophage specific effects on cardiomyocytes are poorly understood. Nevertheless, the cardiac influx of macrophages on pressure overload, for example, precedes signs of hypertrophy and heart failure, suggesting a direct contribution to cardiomyocyte hypertrophy and survival [(28); Figure 2].

Considering their abundance, diversity, and phenotypic plasticity, macrophages represent a major reservoir of cytokines. Inflammatory signals induce interleukin(IL)6 release by macrophages and neutralizing IL-6 reduces cardiomyocyte hypertrophy (29, 30). Acutely, IL-6 also prevents cardiomyocytes against oxidative stress-induced cellular damages. IL-6 receptor cooperates with at least one subunit of the signal-transducing protein gp130. Of note, complete loss of gp130 results in massive induction of myocyte apoptosis and dilated cardiomyopathy in response to pressure-overload (31). Alternatively, in chronically exposed myocytes, IL-6 family signaling reduces the basal contractility and the beta-adrenergic responsiveness of the myocytes (32).

Specific subtype of pro-inflammatory CCR2 positive macrophages is a major purveyor of IL-1 β (2). Interestingly, in a phase 3 trial, the use of canakinumab, an IL-1 β neutralizing antibody, has been shown to decrease the incidence of repetitive atherothrombotic event in patients with myocardial infarction already on state of the art treatment (33). Inflammatory macrophages also release IL-18, another member of the IL-1 family (34, 35). IL-18 enhances cardiomyocyte hypertrophy and exacerbates cardiac dysfunction as well as fibrosis in infarcted and non-infarcted heart (36, 37). IL-18 could also precipitate adverse ventricular remodeling by reducing capillary density in the ischemic tissue (38). Toll-like receptor activation induces the production of tumor necrosis factor (TNF α) from macrophages. In a genetic heart failure model, TNF- α has been shown to confer cardioprotection by maintaining normal intercalated disc structure and mitochondrial integrity as well as cardiomyocyte function (39). Transforming growth factor (TGF) β produced by cardiac macrophages triggers extracellular matrix deposition (40) but is also a direct mediator of the hypertrophic growth response of the heart (41). Myeloid-derived growth factor is secreted by macrophages and stimulates

cardiomyocyte survival (42). In addition, macrophages synthesize IL-10 and leukemia inhibitory factor, which subsequently abrogate apoptosis of hypoxic cardiomyocytes (43).

Beyond cytokine production, macrophages are an overflowing source of biological entities with pro-hypertrophic and survival potential. For example, Galectin-3, a macrophage-derived mediator, contributes to cardiac hypertrophy (44). Removal of micro(mi)RNA-155 in macrophages reduces cardiac hypertrophy and cardiac dysfunction following pressure overload (28). Mineralocorticoid receptor deletion in macrophages abrogates cardiac hypertrophy after aortic constriction (45) or in the setting of hypertension (46, 47). Mice with macrophage harboring prolyl hydroxylase domain protein 2 deficiency display attenuated cardiac hypertrophy and contractile dysfunction after hypertensive treatment (48).

Non-canonical Role of Macrophages Cardiac Conduction

Recent work also reveals that resident cardiac macrophages establish direct connections to cardiomyocytes via connexin 43 gap junctions in the atrioventricular node. *In vitro*, neonatal cardiomyocytes cause rhythmic depolarizations in macrophages, which in turn, alters the electrophysiological properties of cardiomyocytes. Since macrophages are poorly polarized cells, their coupling with cardiomyocytes depolarizes them. While in the “working” cardiomyocytes an increase of the resting potential inactivates the sodium channels and slows the conduction, the depolarization of the atrioventricular node cardiomyocyte depends on the calcium channels, whose voltage-dependent inactivation is shifted toward higher positive voltages. Activation of a rhodopsin 2 channel specifically expressed in macrophages causes sodium entry and depolarization, improving nodal conduction. Conversely, inactivation of connexin 43 specifically in macrophages, or the congenital deficiency of macrophages, affect the propagation of cardiac electrical impulses, attesting to the existence of a functional connection between resident macrophages and specialized cardiomyocytes within the nodal tissue (24). Macrophages could also regulate conduction abnormalities beyond the atrioventricular node, including the course of atrial fibrillation

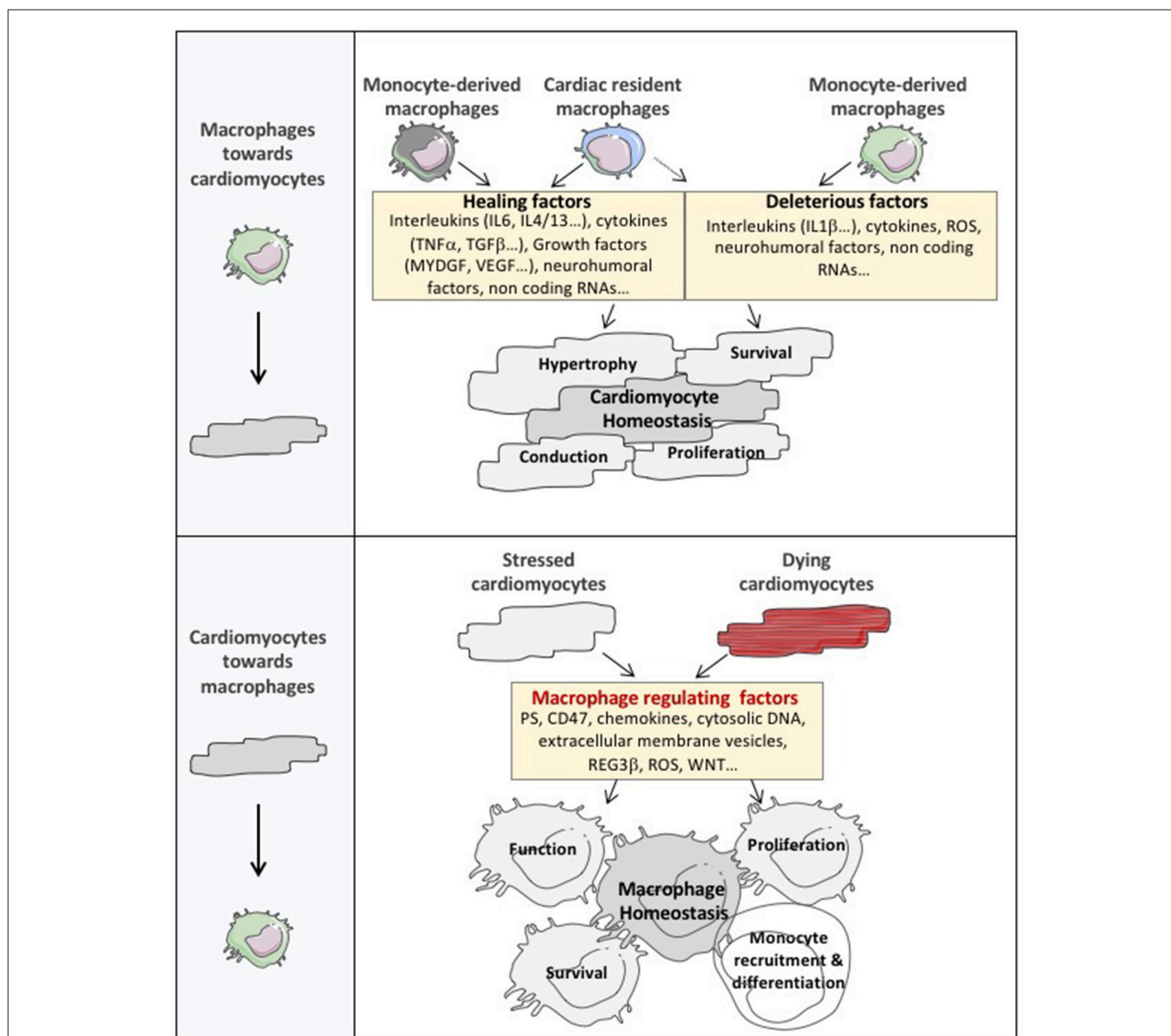


FIGURE 2 | The cardiomyocyte and macrophage cross-talk in cardiac tissue. The expanded cardiac macrophage population plays an important role in the regulation of cardiac dysfunction by secreting factors that directly or indirectly alter cardiomyocyte homeostasis. Notably, considering their abundance, diversity, and phenotypic plasticity, macrophages represent a major reservoir of factors controlling cardiomyocyte hypertrophy, survival and contractility. Furthermore, cardiac macrophages exert non-canonical roles on cardiac conduction or cardiomyocyte proliferation by regulating action potential diffusion or cardiac cell cycle reentry. Nevertheless, the communication between cardiomyocytes and macrophages operates in both directions and cardiomyocytes dialogue toward cardiac macrophages to drive their number, function and phenotype through the release of a broad catalog of macrophage regulating factors. MYDGF, myeloid derived growth factor; PS, phosphatidyl serine; ROS, reactive oxygen species; DNA, deoxyribonucleic acid; REG3β, regenerating islet-derived protein 3-beta.

or ventricular arrhythmias induced by ischemia. Clinically, atrioventricular block is a common indication for implantation of cardiac pacemakers, but many cases of atrioventricular block occur for unknown reasons. Macrophage phenotype and number are modified after acute myocardial infarction and heart failure, conditions associated with sudden cardiac death and ventricular arrhythmias. In this regard, recent work has shown that diabetic inflammation causes secretion

by resident macrophages of IL-1β, which destabilizes the electrical activity of cardiomyocytes potentially promoting the occurrence of ventricular arrhythmias (49). Other cardiac inflammatory diseases, including Chagas disease, Lyme disease, and myocarditis, initiate conduction defects. In these pathological conditions, cardiac macrophages could also participate to the development of atrioventricular block in addition to cardiomyocytes and specialized conductive

tissue deregulations. Conduction system development or genetic abnormalities could also be dependent of cardiac macrophage-related actions.

Cardiomyocyte Regeneration

Change in monocyte/macrophage gene expression is associated with decrease in cardiomyocyte proliferation with aging (50). In the neonatal heart, clodronate liposome-induced phagocytic cell depletion abrogates heart regeneration. Human fetal and adult mononuclear phagocytes show distinct pro-inflammatory features after LPS stimulation (2). Furthermore, it has been shown that in response to injury, resident CCR2⁻ reparative cardiac macrophages dominate in the neonatal cardiac tissue and directly foster cardiomyocyte proliferation (22). Comparative analyses have been performed in many species revealing that the regenerative capacity of the cardiac tissue sparsely exists across the animal kingdom, and seems to correlate with immature immune system. As an example, zebrafish exhibits unchallenged ability to regenerate cardiac tissue. Interestingly, another teleost, the medaka, does not share this capacity. Comparative transcriptomic analyses following cardiac cryoinjury in Zebrafish and medaka point to major differences in immune cell dynamics between these two models. Delayed macrophage recruitment in zebrafish hampers cardiomyocyte proliferation and scar resolution. Delayed and reduced macrophage recruitment is observed in medaka, along with inefficient cardiac regeneration. Stimulating Toll-like receptor signaling in medaka activates immune cell dynamics and galvanizes cardiomyocyte proliferation and scar resolution (51). During the regenerative process, cardiomyocytes undergo a transcriptional reversal of cell differentiation program characterized, at least in part, by recrudescence of embryonic gene expression. Interestingly, IL-13 has been identified as a potential upstream regulator of the core network, which induced cardiomyocyte cell cycle entry, in part by the STAT3 pathway (52). Altogether, these studies provide further insight into the complex role of the immune response during cardiac repair, and suggest that macrophage could serve as a platform to release cytokines and growth factors, promoting cardiomyocyte proliferation, at least in neonatal mammalian heart.

CARDIOMYOCYTES AND OUTSIDE-IN SIGNALING WITHIN CARDIAC MACROPHAGES

The communication between cardiomyocytes and macrophages operates in both directions and cardiomyocytes dialogue toward cardiac macrophages using different languages (Figure 2).

First, dying cardiomyocytes send some “eat me” signals to stimulate clearance of dying cells and prevent collateral myocyte loss and infarct expansion. Efficient phagocytic clearance of cardiac apoptotic cells by macrophages involved the coordinated role of 2 major mediators of efferocytosis, the myeloid-epithelial-reproductive protein tyrosine kinase (MerTK) and the milk fat globule epidermal growth factor

8 (MFG-E8). Macrophage defective for efferocytosis leads to cardiac dysfunction (53, 54). Interestingly in ischemic heart, dying cardiomyocytes send unappropriated signals, such as upregulation of integrin-associated protein CD47 or shedding of macrophage MerTK, that impair phagocytic removal by cardiac macrophages (55, 56). Notably, resident MHCII^{low}CCR2⁻ cells are characterized by elevated expression of MerTK and, release pro-reparative cytokines, such as TGF- β , in response to apoptotic cell engulfment (57). Of interest, non-professional phagocytes including cardiac myofibroblasts, have also been shown to efficiently engulf dead cells in the infarcted heart. These cardiac myofibroblasts secrete MFG-E8 promoting efferocytosis and acquisition of anti-inflammatory properties (58). Communication between professional and non-professional phagocytes likely coordinates phagocytosis of dying cells in the vicinity of the damage (59). As a prototypic example, in epithelial tissue, following clearance of apoptotic cells, macrophages release soluble growth factors, such as insulin-like growth factor 1, which redirect the phagocytosis of neighbor epithelial cells toward uptake of smaller vesicular components (60). Nevertheless, the existence of this crosstalk between macrophages and non-professional phagocytes remains to be detailed in the pathological cardiac tissue.

Second, in pathological conditions, activated cardiomyocytes can release a broad panel of instructive signals that could control macrophage number and skew their phenotype. For example, neutrophils and macrophages produce the cytokine oncostatin M, which galvanizes the cardiomyocytes to produce the regenerating islet-derived protein 3- β . Subsequently, regenerating islet-derived protein 3- β improves monocyte-derived macrophage number in the cardiac tissue (61). Other molecular entities delivered by hypoxic cardiomyocytes such as inhibitors of the WNT pathway, radical oxygen species or the release of cytosolic nucleic acid also modulate the number and phenotype of cardiac macrophages (62–64). In hypertensive heart failure model, microarray and immunohistochemistry analysis revealed a cardiomyocyte specific upregulation of 12/15-lipoxygenase, a major enzyme metabolizing arachidonic acid into hydroxy-eicosatetraenoic acids. Cardiomyocyte overexpression of 12/15-lipoxygenase increases cardiac CCL2 contents leading to accumulation of inflammatory macrophages and systolic dysfunction (65). Extensive amount of evidences highlights that cell-to-cell communication involves extracellular vesicles (EVs). EVs regulate major biological functions, including inflammation. Presence of EVs in cardiomyocyte cytoplasm has been revealed in human hearts. Culture cardiomyocytes are also able to release EVs *in vitro* (66). Acute myocardial infarction in mice transiently enhances EV levels in the left ventricle. Both large (252 ± 18 nm) and small (118 ± 4 nm) EVs are produced and mainly emerge from cardiomyocytes. Of note, large EVs, but not small EVs, are able to control IL-6, CCL2, and CCL7 release from cardiac monocytes (67). Hypoxic cardiomyocytes have also been shown to release high rate of small EVs (mainly exosomes) containing excessive expression of TNF- α (68). Mixed EV population or small EVs (mainly exosomes) have emerged as critical agents of cardiac repair triggered by different type of cell therapy (69–71). EV-related effects could be mediated by cell-surface

receptor activation or delivery of multiple components within the targeted cells. Notably, small EV isolated from cardiosphere-derived cells are enriched in several miRNAs, such as miR-181b, and have been shown to specifically target CD68-positive cardiac macrophages switching their phenotype toward a reparative state (72). Cardiac EVs have also been identified in fragments of the interventricular septum obtained from patients undergoing extracorporeal circulation for aortic valve replacement suggesting that cardiomyocyte-derived EVs could constitute a major component of the cardiomyocyte/macrophage crosstalk (67). One can also speculate that these cardiac EVs could reach the bone marrow and/or the spleen, where they could stimulate a distinct myeloid-biased progenitor subset or monocyte mobilization. Nevertheless, the specific role of large or small cardiac EVs on different subset of inflammatory compounds as well as characterization of their core signaling mediator need to be further explored. Finally, the mechanical deformation of cardiomyocytes by pathways dependent on Mitogen Activated Protein Kinases is sufficient to increase the population of macrophages in the healthy myocardium (26).

FUTURE DIRECTIONS

Hence, cardiomyocytes and macrophages form an interspersed network and dialogue with each other to profile the multiple processes shaping the cardiac tissue. In pathological settings, the exact roles of resident embryonically derived- and monocyte-derived macrophage subsets on cardiomyocyte homeostasis remain to be fully defined. Of note, the use of strategies designed to inhibit CCR2 signaling or endothelial cell-dependent adhesion is of interest to abrogate monocyte-derived macrophages upregulation but likely induces non-specific effects on other inflammatory cell subtypes and, more importantly, hampers the direct impact of monocytes on cardiac remodeling. Such side effects may lead to confounding outcomes and misinterpretation of cardiac macrophages related-actions. For example, monocyte-derived macrophages likely display both positive and negative potential on cardiomyocyte and cardiac tissue. As such, CD206⁺F4/80⁺CD11b⁺ macrophages exhibit strengthened reparative abilities after myocardial infarction. This

macrophage subpopulation emerges from bone marrow HSCs through a kinase TRIB1 dependent pathway (73). In addition, IL-4 administration increases the number of reparative macrophages and enhances the post-myocardial infarction prognosis in mice (73). In the stressed heart, one can also speculate that the inflammatory landscape could skew the status of cardiac-resident macrophages from a reparative to a deleterious phenotype. Therefore, studies using specific resident macrophage depletion or distinct resident macrophage gene deletion need to be developed. Nevertheless, cardiac tissue provides a revealing example where macrophage number and phenotype, duration of macrophage-related signaling, from acute to chronic, could balance the protective and pathogenic transition of cardiac tissue.

Inflammation-dependent remodeling process has been predominantly described in acute injury, such as acute myocardial infarction. However, the impact of these inflammatory signalings remain mostly undefined in chronic pathological settings (74). Notably, further studies need to explore the mechanisms underlying the direct roles of macrophages on cardiomyocyte survival and hypertrophy and if specific macrophage sub-population could regulate the progression from compensated hypertrophy to heart failure. Finally, the precise identification of the molecular and cellular signals sent from cardiomyocytes toward macrophages would likely improve our understanding of cardiac macrophage physiology and both their beneficial and deleterious actions.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IG, VD, and J-SS perform literature search and writing. All authors approved the manuscript.

FUNDING

This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20160334910 to J-SS and IG), Fondation de France (FDF 00066471 to J-SS), French National Research Agency (ANR to J-SS) and institutional grants from Paris Descartes University and the French National Institute for Health and Medical Research.

REFERENCES

- Epelman S, Lavine KJ, Randolph GJ. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* (2014) 41:21–35. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.013
- Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, Sojka DK, Carrero JA, Calderon B, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* (2014) 40:91–104. doi: 10.1016/j.immuni.2013.11.019
- Leid J, Carrelha J, Boukarabila H, Epelman S, Jacobsen SE, Lavine KJ. Primitive embryonic macrophages are required for coronary development and maturation. *Circ Res.* (2016) 118:1498–511. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.308270
- Molawi K, Wolf Y, Kandalla PK, Favret J, Hagemeyer N, Frenzel K, et al. Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *J Exp Med.* (2014) 211:2151–8. doi: 10.1084/jem.20140639
- Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat Immunol.* (2012) 13:1118–28. doi: 10.1038/ni.2419
- Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell* (2014) 159:1312–26. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.018
- Heidt T, Courties G, Dutta P, Sager HB, Sebas M, Iwamoto Y, et al. Differential contribution of monocytes to heart macrophages in steady-state and after myocardial infarction. *Circ Res.* (2014) 115:284–95. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.303567
- Dutta P, Sager HB, Stengel KR, Naxerova K, Courties G, Saez B, et al. Myocardial infarction activates CCR2(+) hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell* (2015) 16:477–87. doi: 10.1016/j.stem.2015.04.008
- Anzai A, Choi JL, He S, Fenn AM, Nairz M, Rattik S, et al. The infarcted myocardium solicits GM-CSF for the detrimental oversupply of inflammatory leukocytes. *J Exp Med.* (2017) 214:3293–310. doi: 10.1084/jem.20170689
- Tsou CL, Peters W, Si Y, Slaymaker S, Aslanian AM, Weisberg SP, et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow

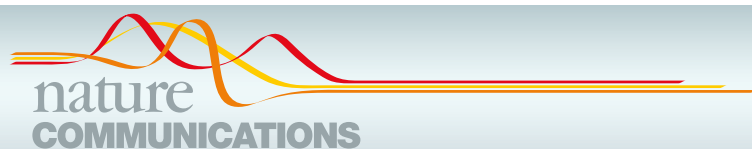
- and recruitment to inflammatory sites. *J Clin Invest.* (2007) 117:902–9. doi: 10.1172/JCI29919
11. Zouggari Y, Ait-Oufella H, Bonnin P, Simon T, Sage AP, Guerin C, et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat Med.* (2013) 19:1273–80. doi: 10.1038/nm.3284
 12. Hettlinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol.* (2013) 14:821–30. doi: 10.1038/ni.2638
 13. Hanna RN, Carlin LM, Hubbeling HG, Nackiewicz D, Green AM, Punt JA, et al. The transcription factor NR4A1 (Nur77) controls bone marrow differentiation and the survival of Ly6C⁺ monocytes. *Nat Immunol.* (2011) 12:778–85. doi: 10.1038/ni.2063
 14. Yona S, Kim KW, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* (2013) 38:79–91. doi: 10.1016/j.immuni.2012.12.001
 15. Swirski FK, Nahrendorf M, Etzrodt M, Wildgruber M, Cortez-Retamozo V, Panizzi P, et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* (2009) 325:612–6. doi: 10.1126/science.1175202
 16. Horckmans M, Bianchini M, Santovito D, Megens RTA, Springael JY, Negri I, et al. Pericardial adipose tissue regulates granulopoiesis, fibrosis, and cardiac function after myocardial infarction. *Circulation* (2018) 137:948–60. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028833
 17. Ngkelo A, Richart A, Kirk JA, Bonnin P, Vilar J, Lemitre M, et al. Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction. *J Exp Med.* (2016) 213:1353–74. doi: 10.1084/jem.20160081
 18. Nahrendorf M, Swirski FK, Aikawa E, Stangenberg L, Wurdinger T, Figueiredo JL, et al. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med.* (2007) 204:3037–47. doi: 10.1084/jem.20070885
 19. van Amerongen MJ, Harmsen MC, van Rooijen N, Petersen AH, van Luyn MJ. Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice. *Am J Pathol.* (2007) 170:818–29. doi: 10.2353/ajpath.2007.060547
 20. Zandbergen HR, Sharma UC, Gupta S, Verjans JW, van den Borne S, Pokharel S, et al. Macrophage depletion in hypertensive rats accelerates development of cardiomyopathy. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* (2009) 14:68–75. doi: 10.1177/1074248408329860
 21. Li W, Hsiao HM, Higashikubo R, Saunders BT, Bharat A, Goldstein DR, et al. Heart-resident CCR2(+) macrophages promote neutrophil extravasation through TLR9/MyD88/CXCL5 signaling. *JCI Insight* (2016) 1:e87315. doi: 10.1172/jci.insight.87315
 22. Lavine KJ, Epelman S, Uchida K, Weber KJ, Nichols CG, Schilling JD, et al. Distinct macrophage lineages contribute to disparate patterns of cardiac recovery and remodeling in the neonatal and adult heart. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2014) 111:16029–34. doi: 10.1073/pnas.1406508111
 23. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun.* (2016) 7:12150. doi: 10.1038/ncomms12150
 24. Hulsmans M, Clauss S, Xiao L, Aguirre AD, King KR, Hanley A, et al. Macrophages facilitate electrical conduction in the heart. *Cell* (2017) 169:510–22.e20. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.050
 25. Bajpai G, Schneider C, Wong N, Bredemeyer A, Hulsmans M, Nahrendorf M, et al. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat Med.* (2018) 24:1234–45. doi: 10.1038/s41591-018-0059-x
 26. Sager HB, Hulsmans M, Lavine KJ, Moreira MB, Heidt T, Courties G, et al. Proliferation and recruitment contribute to myocardial macrophage expansion in chronic heart failure. *Circ Res.* (2016) 119:853–64. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309001
 27. Ismahil MA, Hamid T, Bansal SS, Patel B, Kingery JR, Prabhu SD. Remodeling of the mononuclear phagocyte network underlies chronic inflammation and disease progression in heart failure: critical importance of the cardiopleuric axis. *Circ Res.* (2014) 114:266–82. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301720
 28. Heymans S, Corsten ME, Verheesen W, Carai P, van Leeuwen RE, Custers K, et al. Macrophage microRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure. *Circulation* (2013) 128:1420–32. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001357
 29. Diaz JA, Booth AJ, Lu G, Wood SC, Pinsky DJ, Bishop DK. Critical role for IL-6 in hypertrophy and fibrosis in chronic cardiac allograft rejection. *Am J Transplant.* (2009) 9:1773–83. doi: 10.1111/j.1600-6143.2009.02706.x
 30. Kobara M, Noda K, Kitamura M, Okamoto A, Shiraishi T, Toba H, et al. Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res.* (2010) 87:424–30. doi: 10.1093/cvr/cvq078
 31. Hirota H, Chen J, Betz UA, Rajewsky K, Gu Y, Ross J Jr, et al. Loss of a gp130 cardiac muscle cell survival pathway is a critical event in the onset of heart failure during biomechanical stress. *Cell* (1999) 97:189–98. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80729-1
 32. Yu X, Kennedy RH, Liu SJ. JAK2/STAT3, not ERK1/2, mediates interleukin-6-induced activation of inducible nitric-oxide synthase and decrease in contractility of adult ventricular myocytes. *J Biol Chem.* (2003) 278:16304–9. doi: 10.1074/jbc.M212321200
 33. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory therapy with Canakinumab for atherosclerotic disease. *N Engl J Med.* (2017) 377:1119–31. doi: 10.1056/NEJMoa1707914
 34. Yoshimoto T, Nagai N, Ohkusu K, Ueda H, Okamura H, Nakanishi K. LPS-stimulated SJL macrophages produce IL-12 and IL-18 that inhibit IgE production in vitro by induction of IFN-gamma production from CD3intIL-2R beta+ T cells. *J Immunol.* (1998) 161:1483–92.
 35. Rodriguez-Menocal L, Faridi MH, Martinez L, Shehadeh LA, Duque JC, Wei Y, et al. Macrophage-derived IL-18 and increased fibrogen deposition are age-related inflammatory signatures of vascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2014) 306:H641–53. doi: 10.1152/ajpheart.00641.2013
 36. Toldo S, Mezzaroma E, O'Brien L, Marchetti C, Seropian IM, Voelkel NF, et al. Interleukin-18 mediates interleukin-1-induced cardiac dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2014) 306:H1025–31. doi: 10.1152/ajpheart.00795.2013
 37. Carbone S, Lee PJ, Mauro AG, Mezzaroma E, Buzzetti R, Van Tassel B, et al. Interleukin-18 mediates cardiac dysfunction induced by western diet independent of obesity and hyperglycemia in the mouse. *Nutr Diabetes* (2017) 7:e258. doi: 10.1038/nutd.2017.1
 38. Mallat Z, Silvestre JS, Le Ricousse-Roussanne S, Lecomte-Raclat L, Corbaz A, Clergue M, et al. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates ischemia-induced neovascularization in mice hindlimb. *Circ Res.* (2002) 91:441–8.
 39. Papatheanasiou S, Rickelt S, Soriano ME, Schips TG, Maier HJ, Davos CH, et al. Tumor necrosis factor-alpha confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18. *Nat Med.* (2015) 21:1076–84. doi: 10.1038/nm.3925
 40. Damilano F, Franco I, Perrino C, Schaefer K, Azzolino O, Carnevale D, et al. Distinct effects of leukocyte and cardiac phosphoinositide 3-kinase gamma activity in pressure overload-induced cardiac failure. *Circulation* (2011) 123:391–9. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.950543
 41. Schultz Jel J, Witt SA, Glascock BJ, Nieman ML, Reiser PJ, Nix SL, et al. TGF-beta1 mediates the hypertrophic cardiomyocyte growth induced by angiotensin II. *J Clin Invest.* (2002) 109:787–96. doi: 10.1172/JCI0214190
 42. Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T, Brinkmann E, Fischer P, Meyer GP, et al. Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Eur Heart J.* (2008) 29:2851–8. doi: 10.1093/eurheartj/ehn456
 43. Dhingra S, Sharma AK, Arora RC, Slezak J, Singal PK. IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. *Cardiovasc Res.* (2009) 82:59–66. doi: 10.1093/cvr/cvp040
 44. Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, et al. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. *Circulation* (2004) 110:3121–8. doi: 10.1161/01.CIR.0000147181.65298.4D
 45. Li C, Zhang YY, Frieler RA, Zheng XJ, Zhang WC, Sun XN, et al. Myeloid mineralocorticoid receptor deficiency inhibits aortic constriction-induced cardiac hypertrophy in mice. *PLoS ONE* (2014) 9:e110950. doi: 10.1371/journal.pone.0110950

46. Rickard AJ, Morgan J, Tesch G, Funder JW, Fuller PJ, Young MJ. Deletion of mineralocorticoid receptors from macrophages protects against deoxycorticosterone/salt-induced cardiac fibrosis and increased blood pressure. *Hypertension* (2009) 54:537–43. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.131110
47. Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, Frieler RA, Berger S, Schutz G, et al. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice. *J Clin Investig.* (2010) 120:3350–64. doi: 10.1172/JCI41080
48. Ikeda J, Ichiki T, Matsuura H, Inoue E, Kishimoto J, Watanabe A, et al. Deletion of phd2 in myeloid lineage attenuates hypertensive cardiovascular remodeling. *J Am Heart Assoc.* (2013) 2:e000178. doi: 10.1161/JAHA.113.000178
49. Monnerat G, Alarcon ML, Vasconcellos LR, Hochman-Mendez C, Brasil G, Bassani RA, et al. Macrophage-dependent IL-1beta production induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. *Nat Commun.* (2016) 7:13344. doi: 10.1038/ncomms13344
50. Aurora AB, Porrello ER, Tan W, Mahmoud AI, Hill JA, Bassel-Duby R, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Investig.* (2014) 124:1382–92. doi: 10.1172/JCI72181
51. Lai SL, Marin-Juez R, Moura PL, Kuenne C, Lai JKH, Tseke AT, et al. Reciprocal analyses in zebrafish and medaka reveal that harnessing the immune response promotes cardiac regeneration. *Elife* (2017) 6:e25605. doi: 10.7554/eLife.25605
52. O'Meara CC, Wamstad JA, Gladstone RA, Fomovsky GM, Butty VL, Shrikumar A, et al. Transcriptional reversion of cardiac myocyte fate during mammalian cardiac regeneration. *Circ Res.* (2015) 116:804–15. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304269
53. Wan E, Yeap XY, Dehn S, Terry R, Novak M, Zhang S, et al. Enhanced efferocytosis of apoptotic cardiomyocytes through myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase links acute inflammation resolution to cardiac repair after infarction. *Circ Res.* (2013) 113:1004–12. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301198
54. Howangyin KY, Zlatanova I, Pinto C, Ngkelo A, Cochain C, Rouanet M, et al. Myeloid-epithelial-reproductive receptor tyrosine kinase and milk fat globule epidermal growth factor 8 coordinately improve remodeling after myocardial infarction via local delivery of vascular endothelial growth factor. *Circulation* (2016) 133:826–39. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020857
55. Zhang S, Yeap XY, Grigoryeva L, Dehn S, DeBerge M, Tye M, et al. Cardiomyocytes induce macrophage receptor shedding to suppress phagocytosis. *J Mol Cell Cardiol.* (2015) 87:171–9. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.08.009
56. Zhang S, Yeap XY, DeBerge M, Naresh NK, Wang K, Jiang Z, et al. Acute CD47 blockade during ischemic myocardial reperfusion enhances phagocytosis-associated cardiac repair. *JACC Basic Transl Sci.* (2017) 2:386–97. doi: 10.1016/j.jacbs.2017.03.013
57. DeBerge M, Yeap XY, Dehn S, Zhang S, Grigoryeva L, Misener S, et al. MerTK Cleavage on resident cardiac macrophages compromises repair after myocardial ischemia reperfusion injury. *Circ Res.* (2017) 121:930–40. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311327
58. Nakaya M, Watari K, Tajima M, Nakaya T, Matsuda S, Ohara H, et al. Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction. *J Clin Investig.* (2017) 127:383–401. doi: 10.1172/JCI83822
59. DeBerge M, Zhang S, Grinton K, Grigoryeva L, Hussein I, Vorovich E, et al. Efferocytosis and outside-in signaling by cardiac phagocytes. links to repair, cellular programming, and intercellular crosstalk in heart. *Front Immunol.* (2017) 8:1428. doi: 10.3389/fimmu.2017.01428
60. Han CZ, Juncadella IJ, Kinchen JM, Buckley MW, Klibanov AL, Dryden K, et al. Macrophages redirect phagocytosis by non-professional phagocytes and influence inflammation. *Nature* (2016) 539:570–4. doi: 10.1038/nature20141
61. Lorchner H, Poling J, Gajawada P, Hou Y, Polyakova V, Kostin S, et al. Myocardial healing requires Reg3beta-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nat Med.* (2015) 21:353–62. doi: 10.1038/nm.3816
62. Meyer IS, Jungmann A, Dieterich C, Zhang M, Lasitschka F, Werkmeister S, et al. The cardiac microenvironment uses non-canonical WNT signaling to activate monocytes after myocardial infarction. *EMBO Mol Med.* (2017) 9:1279–93. doi: 10.15252/emmm.201707565
63. Mongue-Din H, Patel AS, Looi YH, Grieve DJ, Anilkumar N, Sirker A, et al. NADPH oxidase-4 driven cardiac macrophage polarization protects against myocardial infarction-induced remodeling. *JACC Basic Transl Sci.* (2017) 2:688–98. doi: 10.1016/j.jacbs.2017.06.006
64. King KR, Aguirre AD, Ye YX, Sun Y, Roh JD, Ng RP Jr, et al. IRF3 and type I interferons fuel a fatal response to myocardial infarction. *Nat Med.* (2017) 23:1481–7. doi: 10.1038/nm.4428
65. Kayama Y, Minamino T, Toko H, Sakamoto M, Shimizu I, Takahashi H, et al. Cardiac 12/15 lipoxygenase-induced inflammation is involved in heart failure. *J Exp Med.* (2009) 206:1565–74. doi: 10.1084/jem.20082596
66. Bang C, Batkai S, Dangwal S, Gupta SK, Foinquinos A, Holzmann A, et al. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *J Clin Investig.* (2014) 124:2136–46. doi: 10.1172/JCI70577
67. Loyer X, Zlatanova I, Devue C, Yin M, Howangyin KY, Klaihmon P, et al. Intra-cardiac release of extracellular vesicles shapes inflammation following myocardial infarction. *Circ Res.* (2018) 123:100–6. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311326
68. Yu X, Deng L, Wang D, Li N, Chen X, Cheng X, et al. Mechanism of TNF-alpha autocrine effects in hypoxic cardiomyocytes: initiated by hypoxia inducible factor 1alpha, presented by exosomes. *J Mol Cell Cardiol.* (2012) 53:848–57. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.10.002
69. Gallet R, Dawkins J, Valle J, Simsoló E, de Couto G, Middleton R, et al. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodeling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *Eur Heart J.* (2017) 38:201–11. doi: 10.1093/eurheartj/ehw240
70. Kervadec A, Bellamy V, El Harane N, Arakelian L, Vanneau V, Cacciapuoti I, et al. Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure. *J Heart Lung Transpl.* (2016) 35:795–807. doi: 10.1016/j.healun.2016.01.013
71. El Harane N, Kervadec A, Bellamy V, Pidal L, Neametalla HJ, Perier MC, et al. Acellular therapeutic approach for heart failure: in vitro production of extracellular vesicles from human cardiovascular progenitors. *Eur Heart J.* (2018) 39:1835–47. doi: 10.1093/eurheartj/ehy012
72. de Couto G, Gallet R, Cambier L, Jaghatspanyan E, Makkar N, Dawkins JF, et al. Exosomal MicroRNA transfer into macrophages mediates cellular postconditioning. *Circulation* (2017) 136:200–14. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024590
73. Shiraiishi M, Shintani Y, Shintani Y, Ishida H, Saba R, Yamaguchi A, et al. Alternatively activated macrophages determine repair of the infarcted adult murine heart. *J Clin Investig.* (2016) 126:2151–66. doi: 10.1172/JCI85782
74. Dick SA, Epelman S. Chronic heart failure and inflammation: what do we really know? *Circ Res.* (2016) 119:159–76. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308030

Conflict of Interest Statement: 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 © 2018 Gomez, Duval and Silvestre. 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.

B. Cytotoxic CD8 + T cells promote granzyme B-dependent adverse post-ischemic cardiac remodeling



ARTICLE



<https://doi.org/10.1038/s41467-021-21737-9>

OPEN

Cytotoxic CD8⁺ T cells promote granzyme B-dependent adverse post-ischemic cardiac remodeling

Icia Santos-Zas¹, Jeremie Lemarié^{1,15}, Ivana Zlatanova^{1,15}, Marine Cachanado², Jean-Christophe Seghezzi³, Hakim Benamer⁴, Pascal Goube⁵, Marie Vandestienne¹, Raphael Cohen¹, Maya Ezzo¹, Vincent Duval¹, Yujiao Zhang¹, Jin-Bo Su⁶, Alain Bizé⁶, Lucien Sambin⁶, Philippe Bonnin⁷, Maxime Branchereau⁸, Christophe Heymes⁸, Corinne Tanchot¹, José Vilar¹, Clement Delacroix¹, Jean-Sebastien Hulot¹, Clement Cochain⁹, Patrick Bruneval^{1,10}, Nicolas Danchin¹¹, Alain Tedgui¹, Ziad Mallat^{1,12}, Tabassome Simon^{2,13}, Bijan Ghaleh⁶, Jean-Sébastien Silvestre¹ & Hafid Ait-Oufella^{1,14}✉

Acute myocardial infarction is a common condition responsible for heart failure and sudden death. Here, we show that following acute myocardial infarction in mice, CD8⁺ T lymphocytes are recruited and activated in the ischemic heart tissue and release Granzyme B, leading to cardiomyocyte apoptosis, adverse ventricular remodeling and deterioration of myocardial function. Depletion of CD8⁺ T lymphocytes decreases apoptosis within the ischemic myocardium, hampers inflammatory response, limits myocardial injury and improves heart function. These effects are recapitulated in mice with *Granzyme B*-deficient CD8⁺ T cells. The protective effect of CD8 depletion on heart function is confirmed by using a model of ischemia/reperfusion in pigs. Finally, we reveal that elevated circulating levels of GRANZYME B in patients with acute myocardial infarction predict increased risk of death at 1-year follow-up. Our work unravels a deleterious role of CD8⁺ T lymphocytes following acute ischemia, and suggests potential therapeutic strategies targeting pathogenic CD8⁺ T lymphocytes in the setting of acute myocardial infarction.

¹Université de Paris, PARCC, INSERM, F-75015 Paris, France. ²Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, APHP.SU; Department of Clinical Pharmacology and Clinical Research Platform (URCEST-CRB-CRC-EST), Hôpital Saint Antoine, Paris, France. ³Service de cardiologie, Centre Hospitalier de Compiègne, Compiègne, France. ⁴Service de cardiologie, Institut Cardiovasculaire Paris Sud, Paris, France. ⁵Service de cardiologie, Centre Hospitalier de Corbeil, Corbeil, France. ⁶Inserm U955-IMRB, Equipe 03, UPEC, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France. ⁷Inserm U965, Department of Physiology, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Hôpital Lariboisière, France. ⁸Inserm U1048-Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), université Paul Sabatier, Toulouse, France. ⁹Institute of Experimental Biomedicine, University Hospital Würzburg, Würzburg, Germany. ¹⁰Service d'anatomopathologie, Hôpital Européen G. Pompidou, Assistance Publique, Hôpitaux de Paris, Paris, France. ¹¹Service de cardiologie, Hôpital Européen G. Pompidou, Assistance Publique, Hôpitaux de Paris, Paris, France. ¹²Division of Cardiovascular Medicine, University of Cambridge, Addenbrooke's Hospital, Cambridge CB2 2QQ, UK. ¹³Sorbonne Université, UPMC-site St Antoine, Service de Pharmacologie, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, APHP.SU; Department of Clinical Pharmacology and Clinical Research Platform (URCEST-CRB-CRC-EST), Hôpital Saint Antoine, Paris, France. ¹⁴Sorbonne Université, Service de médecine intensive-Réanimation, Assistance Publique, Hôpitaux de Paris, Paris, France. ¹⁵These authors contributed equally: Jeremie Lemarié, Ivana Zlatanova. ✉email: hafid.aitoufella@inserm.fr

Acute coronary syndrome including myocardial infarction (MI) is the most prevalent manifestation of cardiovascular diseases and is associated with high mortality and morbidity. Nevertheless, considerable advances have been achieved in the early management of acute coronary thrombotic occlusion, including rapid mechanical restoration of coronary artery blood flow and anti-platelet therapies¹. Consequently, early mortality of patients with MI has declined over the last decades in the United States² and Europe³. However, long-term effects of ischemia-related cardiac damage continue to be a clinical and social burden, due to increased risk of arrhythmias, heart failure, and repetitive hospitalizations⁴. Therefore, more efforts have to be deployed toward the development of therapeutic approaches targeting pathophysiological pathways involved in post-ischemic cardiac remodeling.

There is a large body of human and experimental evidence showing that the immune response is involved in the long-term cardiac complications of coronary occlusion⁵. In human and experimental MI, interruption of blood supply leads to rapid death of cardiac myocytes in the ischemic heart. Thereafter, inflammatory signals trigger the recruitment and proliferation of immune/inflammatory cells, which contribute to left ventricle (LV) remodeling, at least in part, by modulating the production and degradation of extracellular matrix proteins, as well as the clearance of dead cardiac myocytes and their debris. Among several immune cell types that populate the infarcted myocardium, CD4⁺ T cells have been shown to infiltrate heart tissue within the first week following acute MI⁶. Re-supplementation experiments showed that CD4⁺ T cells contribute to myocardial ischemia-reperfusion injury through IFN- γ production. Conversely, natural regulatory T cells (Tregs) have been found to protect against deleterious inflammatory remodeling following MI^{7,8}. Treg depletion using an anti-CD25 antibody impaired left ventricular dilation and survival, whereas expanding Tregs in vivo attenuated myocardial pro-inflammatory cytokine expression and leukocyte recruitment^{7,8}. T cell receptor (TCR)-independent⁹ and -dependent mechanisms¹⁰ are involved in CD4⁺ T cell-related effects following myocardial ischemia-reperfusion.

However, the role of cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes, another subset of T cells that orchestrate immune responses against viruses and tumors, remains unclear in the context of acute heart ischemia. Although CD8⁺ T cells have been detected in the heart following coronary artery occlusion¹¹ in rodents, some authors suggested that CD8⁺ T cells had no pathogenic role¹², whereas others have reported that a subset of CD8⁺ T cells expressing the type 2 angiotensin II receptor may be protective¹³. In a human observational study, an acute reduction in blood CD8⁺ T lymphocyte count has been reported within 1 h after coronary artery reperfusion, the drop of CD8⁺ T cells being more important in patients who developed heart microvascular obstruction¹⁴.

Here, we showed that, following acute MI in mice, CD8⁺ T lymphocytes are recruited in the ischemic heart and foster cardiomyocyte death through the local release of Granzyme B, leading to enhanced myocardial inflammation, tissue injury, and deterioration of myocardial function. We also unraveled that immunotherapy based on the administration of neutralizing antibody directed against CD8⁺ T cells promotes cardiac repair in a mouse model of MI as well as in a pig model of cardiac ischemia-reperfusion.

Results

Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes are recruited and activated in the ischemic heart tissue after MI. First, we characterized the kinetics of inflammatory cell recruitment within the injured

myocardium. We used an experimental model of acute MI in C57BL/6J mice induced by permanent coronary artery ligation and we analyzed cell suspensions of digested hearts at different time points after the onset of ischemia, by flow cytometry. We found that CD3⁺CD8⁺ T (Fig. 1A–C) and CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes accumulated in the injured myocardium as early as day 1 and peaked at day 3 after MI. Infiltration of CD4⁺ T cell was 2-fold higher than that of CD8⁺ T cells (Fig. 1D). Immunohistological analyses confirmed the increased accumulation of CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes in both peri-infarct and infarct areas after MI compared to sham-operated animals (Fig. 1C and Supplementary Figs. 1–3). At day 1, infiltrating CD8⁺ T cells were mostly naive and the proportion of CD44⁺CCR7^{high} central memory and CD44⁺CCR7^{low} effector memory CD8⁺ T cells increased over time (Fig. 1E and Supplementary Fig. 4). Flow cytometry analyses showed that the proportion of CD8⁺ T cells expressing CD69 and CD107a increased during the first week after MI in the heart (Fig. 1F), as well as in the draining mediastinal lymph nodes (Supplementary Fig. 5). Local activation and degranulation of recruited cytotoxic CD8⁺ T cells were confirmed by the detection of Granzyme B within the ischemic heart tissue at day 1 after MI at both protein (Fig. 1G) and mRNA levels (Fig. 1H). Immunofluorescence staining showed colocalization of Granzyme B and CD8⁺ T cells. Of note, Granzyme B was mainly detected in the cytoplasm of T cells in non-ischemic areas, and around CD8⁺ T cells in ischemic areas, suggesting active CD8⁺ T cell degranulation in the infarcted myocardium (Fig. 1G and Supplementary Fig. 6).

Previous studies suggest that CD4⁺ T cells may orchestrate myeloid and lymphoid cell recruitment^{15,16}. We quantified T subsets at day 1 and day 3 after MI in mice treated with anti-CD4 depleting monoclonal antibody or isotype control. At day 1, CD8⁺ T cell number was decreased in blood (Supplementary Fig. 7a), but increased in spleen after CD4⁺ T cell depletion (Supplementary Fig. 7b, c). At day 3, we observed that CD4⁺ T cell depletion (Fig. 1I) led to a 50% reduction in infiltrating CD8⁺ T cells in heart tissue ($P < 0.01$) (Fig. 1J, K), indicating that CD4⁺ T cells partly controlled CD8⁺ T cell mobilization from spleen into peripheral blood and ultimately their infiltration into the infarcted heart.

These findings indicate that circulating CD8⁺ T cells are recruited into the myocardium following MI, are activated and release Granzyme B, suggesting a potential role of CD8⁺ T cell-mediated immune response in this setting.

CD8⁺ T lymphocyte depletion prevents adverse ventricular remodeling and improves cardiac function after acute MI in mice.

To directly assess the role of CD8⁺ T lymphocytes in cardiac remodeling after acute MI, we depleted CD8⁺ T lymphocytes using a CD8-specific monoclonal antibody (CD8 mAb)¹⁷ 1 h after coronary ligation. CD8 mAb treatment rapidly depleted CD8⁺ T cells (>98%) within 6 h after mAb injection (Supplementary Fig. 8) in the peripheral blood (Fig. 2A and Supplementary Fig. 9), the cardiac tissue (Fig. 2B), and the spleen (Supplementary Fig. 10). Complete CD8⁺ T cell depletion was confirmed by immunofluorescence in ischemic heart tissue (Fig. 2C and Supplementary Fig. 8). CD8⁺ T cell depletion did not significantly impact survival following MI (at day 21, 76% in control group versus 92% in CD8-depleted group, $P = 0.28$). We next assessed cardiac function by echocardiography 9 and 28 days after MI. CD8 mAb-induced T cell depletion led to smaller end-systolic ($P < 0.01$) and end-diastolic left ventricular volumes ($P < 0.05$) (Fig. 2D), and to a significant improvement in left ventricular fractional shortening (Fig. 2D and Supplementary Fig. 11)

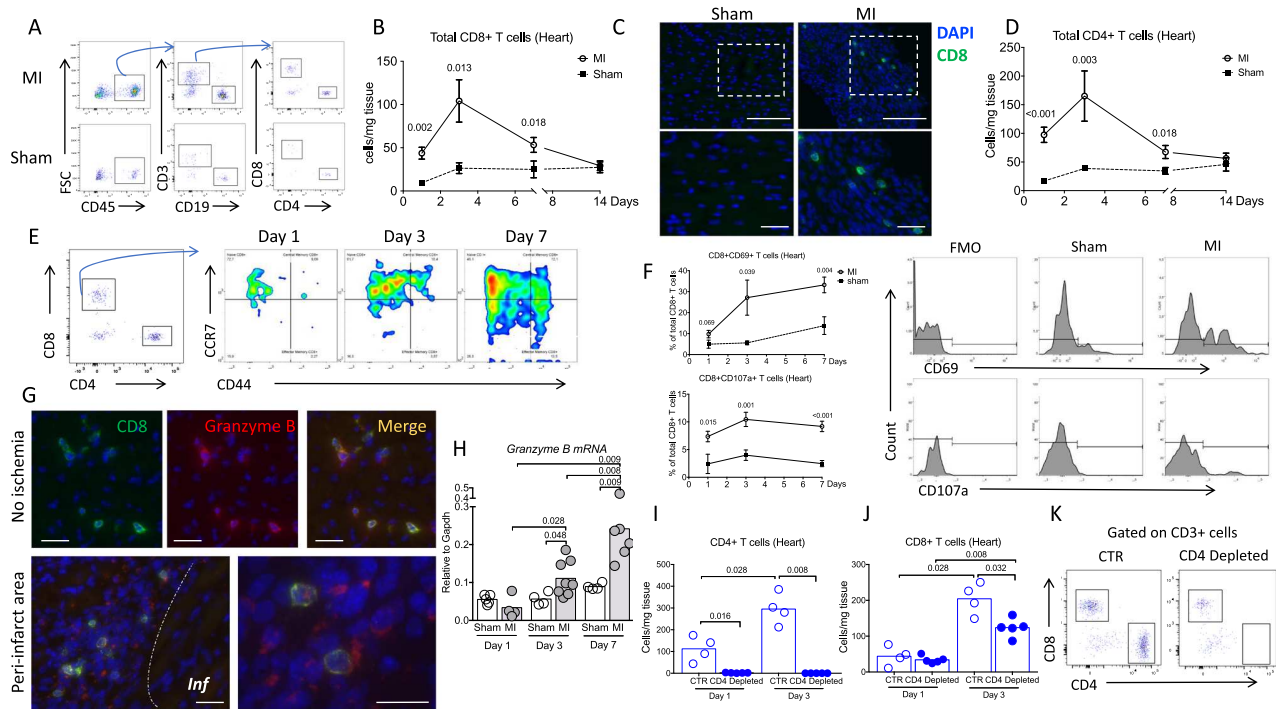


Fig. 1 Cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes are activated and recruited to the ischemic tissue after myocardial infarction. **A** Representative examples of CD4⁺ and CD8⁺ T cell staining in the heart of C57BL/6J mice following coronary ligation (MI) or sham surgery. **B** Kinetic of CD8⁺ T cell infiltration in the myocardium, performed at days 0, 1, 3, 7, and 14 after surgery in MI (white circle, $n = 9/12/12/5$, respectively, at day 1/3/7/14) and sham-operated mice (black box, $n = 6$ /time point); data are presented as mean \pm SEM. **C** Immunostaining in the ischemic myocardium at day 3 after MI or sham showing CD8⁺ T infiltration (green) in the ischemic heart tissue, scale bar 40 μ m. **D** Kinetic of CD4⁺ T cell infiltration in the myocardium, performed at days 0, 1, 3, 7, and 14 after surgery in MI (white circle, $n = 10/9/12/5$, respectively, at day 1/3/7/14) and sham-operated mice (black box, $n = 6$ /time point); data are presented as mean \pm SEM. **E** Flow cytometry characterization of CD8⁺ T cell subsets in the ischemic heart at days 1, 3, and 7 after MI including naive (CD3⁺CD8⁺CCR7^{high}CD44⁻), effector memory (CD3⁺CD8⁺CCR7^{low}CD44⁺), and central memory (CD3⁺CD8⁺CCR7^{high}CD44⁺) subsets. **F** Representative examples and quantitative analysis of CD8⁺ T cells expressing CD69 or CD107a within the ischemic heart tissue in MI (white circle, $n = 6/9/12$, respectively, at day 1/3/7) and sham-operated mice (black box, $n = 6$ /time point); data are presented as mean \pm SEM. **G** Immunostaining in the ischemic myocardium at day 3 after MI showing CD8⁺ T cells (green), and Granzyme B (Red) and merged area (Yellow), *Inf* for infarct area; scale bar 40 μ m. **H** mRNA levels of Granzyme B within the injured myocardium on days 1, 3, and 7 after coronary ligation (gray, $n = 5/4/5$ at day 1/3/7) or sham (white, $n = 4/8/6$ at day 1/3/7). **I** C57Bl6 WT mice received intraperitoneal injection of isotype control (CTR, blue borderline, $n = 4$ /time point) or anti-CD4 depleting monoclonal antibody (blue filled, $n = 5$ /time point) (150 μ g/mice) 1 day before coronary occlusion. CD4⁺ T cell depletion was confirmed in the heart by flow cytometry at day 1 and day 3 following MI. **J, K** Quantification and representative example of CD8⁺ T cell count in the heart of control ($n = 4$ /time point) or CD4-depleted ($n = 5$ /time point) mice at day 1 and day 3 after MI. *P* values were calculated using two-tailed Mann-Whitney test (**B, D, F, H, I, J**). *Inf*, infarct; MI, myocardial infarction; FMO, fluorescent minus one.

compared to isotype-treated control mice at both time points. At day 28, left ventricular pressures were measured using an intra-cardiac probe, confirming that CD8 depletion preserved both diastolic and systolic LV functions (Fig. 2E). Of interest, left ventricular myocardial contractility was also improved by CD8 T cell depletion ($P < 0.001$) (Fig. 2F).

CD8 mAb-induced improvement in cardiac function was associated with abrogation of adverse LV remodeling. Infarct size (Fig. 2G and Supplementary Fig. 12) ($P < 0.001$) and interstitial fibrosis ($P < 0.05$) assessed by collagen content, were reduced in CD8 mAb-treated mice compared to isotype-treated control animals, at day 21 post-MI (Fig. 2H). The protective effect of CD8 T cell depletion was also confirmed on female C57BL/6 mice (Supplementary Fig. 13). CD8 T cell depletion decreased collagen synthesis as revealed by the reduction of *Colla1* and *Colla3* mRNA levels (Supplementary Fig. 14). Such protective effect of CD8 depletion was maintained at day 56 following MI (Supplementary Fig. 15). In summary, these results show that systemic CD8⁺ T cell depletion significantly reduces post-ischemic heart injury, prevents adverse ventricular remodeling, and improves cardiac function after acute MI.

CD8⁺ T cells' pathogenic activity requires TCR engagement.

To assess the putative role of antigen recognition by CD8⁺ T cells, we used OT-I mice, in which the majority of CD8⁺ T cells exclusively recognize an irrelevant ovalbumin-derived peptide via their TCR. In a first set of experiments, coronary artery ligation was performed in male OT-I mice and 1 h later, animals were injected either with an isotype control or an anti-CD8-depleting antibody (Fig. 3A). In this setting, CD8 T cell depletion (Fig. 3B) did not impact infarct size at day 21 post-MI (Fig. 3C, D). To further substantiate the role of TCR-mediated pathogenic activity of CD8⁺ T cells, we injected *Rag1*^{-/-} mice with CD8⁺ T cell-depleted splenocytes, re-supplemented with wild-type (WT) or OT-I CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 3E). Survival at day 21 was not statistically different between groups despite a trend toward a better survival in OT-I CD8⁺ T cell-supplemented group (Fig. 3F). Animals re-supplemented with OT-I CD8⁺ T cells displayed less cardiac damage with a reduction in the infarct size (Fig. 3G) ($P = 0.054$) and a better cardiac function (Fig. 3H) ($P < 0.01$) than animals re-supplemented with WT CD8⁺ T cells.

Finally, we employed a third approach to address the importance of CD8⁺ T antigen-specific response using *CMY-mOva* mice.

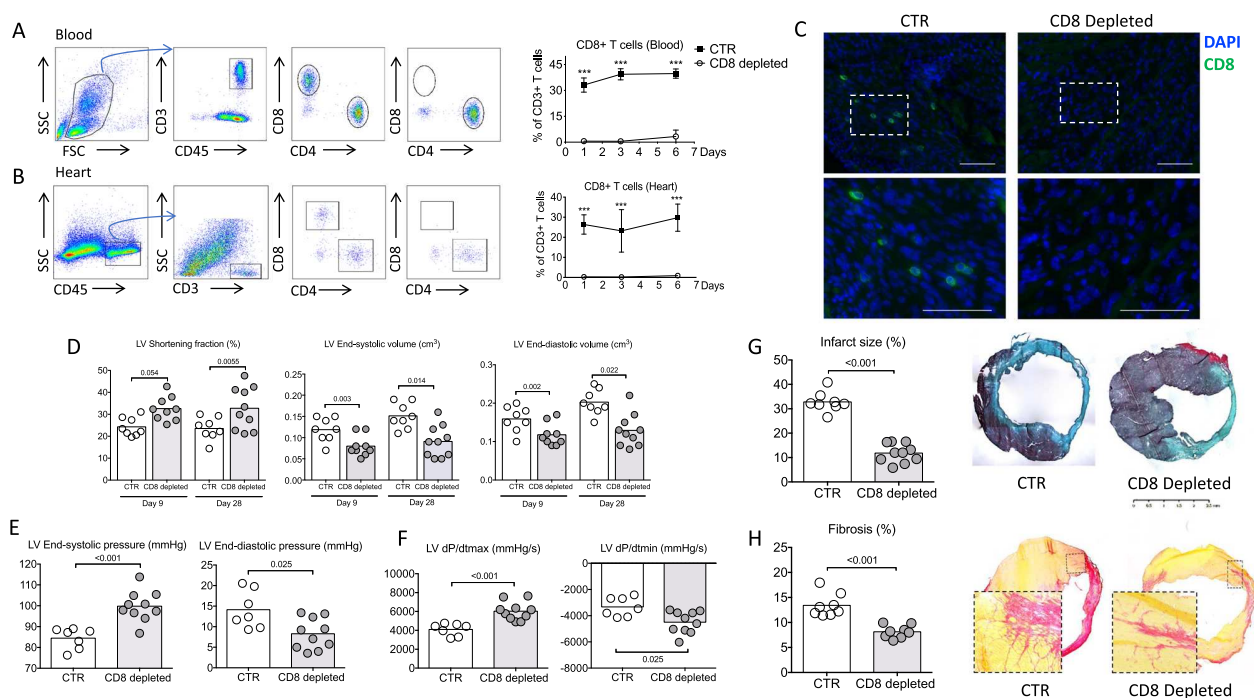


Fig. 2 CD8⁺ T cell depletion improves heart function and reduces infarct size. **A** Representative examples (left) and quantitative analysis (right) of CD8⁺ T cell staining in the blood of C57BL/6J mice treated with isotype control (CTR, black box) or with the CD8 mAb (CD8 depleted, white circle) ($n = 6$ mice per group/time point); data are presented as mean \pm SEM, $***P < 0.001$. **B** Representative examples (left) and quantitative analysis (right) of CD8⁺ T cell staining in the heart of C57BL/6J mice treated with isotype control (CTR) or with the CD8 mAb (CD8 depleted) ($n = 6$ mice per group/time point); data are presented as mean \pm SEM, $***P < 0.001$. **C** Representative examples of CD8⁺ T cell staining in the peri-infarct area of C57BL/6J mice treated with isotype control (CTR) or with the CD8 mAb (CD8 depleted) at day 3, scale bar 40 μm . **D** Echocardiography analysis after anti-CD8 therapy. We measured LV shortening fraction (SF), LV volume at end systole and end diastole (*CTR white, $n = 8$ and CD8 depleted gray $n = 9-10$). **E** Systolic and diastolic pressure measured in the LV, and **F** related function parameters using intracardiac probe at day 28 (CTR $n = 7$ and CD8 depleted $n = 9-10$). **G** Representative photomicrographs and quantitative analysis of infarct size evaluation evaluated by Masson trichrome staining, in the 2 groups of mice (CTR $n = 8$ and CD8 depleted $n = 10$). **H** Representative photomicrographs and quantitative analysis of myocardial fibrosis evaluated by Sirius Red staining, in the 2 groups of mice (CTR $n = 8$ and CD8 depleted $n = 9$). LV, left ventricle. P values were calculated using two-tailed Mann-Whitney test (**A**, **B**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**).

CMy-mOva mice is a transgenic mouse line that expresses cardiac myocyte restricted membrane-bound ovalbumin¹⁸ that can be recognized by OT-I CD8⁺ T cells. Three days before MI, *CMy-mOva* mice were injected either with WT or OT-I purified CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 3I). The injection of OT-I CD8⁺ T lymphocytes enhanced *Granzyme B* mRNA content in the ischemic heart 2 days after MI when compared to control group (Fig. 3J). In addition, the injection of OT-I CD8⁺ T lymphocytes increased mortality rate (85% versus 40%, $P < 0.01$) (Fig. 3K) and infarct size among rare survivors (Fig. 3L) when compared to animals receiving WT CD8⁺ T cells.

CD8⁺ T lymphocyte depletion reduces cardiomyocyte apoptosis and pro-inflammatory responses after acute MI. We next assessed the potential mechanisms involved in CD8⁺ T cell-mediated effects on cardiac remodeling and function. We first assessed the effect of CD8⁺ T cell deficiency on other actors of the inflammatory reaction. As shown in Supplementary Figs. 16–21, CD8⁺ T cell depletion had no impact on the number of CD4⁺ T cells, B cells, NK, NKT, classical monocytes, neutrophils, macrophages, and dendritic cells in the ischemic heart tissue.

Cytotoxic activity of CD8⁺ T cells in the context of cancer¹⁹ or virus infection²⁰ is mainly mediated by the release of Perforin/Granzyme B²¹. Of note, Granzyme B colocalized with apoptotic cells in the ischemic heart tissue (Supplementary Fig. 22). CD8⁺ T cell depletion reduced Granzyme B content in the ischemic

heart tissue at both mRNA (Fig. 4A) and protein levels (Fig. 4B). Such decrease in cardiac Granzyme B content was associated with a significant reduction of TUNEL⁺ apoptotic myocardial cells (Fig. 4C and Supplementary Fig. 23) and a diminution of infarct area 3 days after MI (Supplementary Fig. 24). Treatment with CD8 mAb also reduced local pro-inflammatory cytokine levels at day 7 after MI. Of note, *Tnf- α* , *Il-1 β* , and *Il-6* mRNA levels were significantly lower ($P < 0.05$) in infarct hearts of CD8-depleted mice compared to the control group (Fig. 4D). In addition, we found a marked decrease of *Mmp9* gene expression (Fig. 4E) and a substantially lower metalloproteinase activity (Fig. 4F) in the heart of mice treated with anti-CD8-depleting antibody. Such alteration in the inflammatory landscape without any difference in the number of infiltrating leukocyte subsets suggests a mAb CD8-mediated immune phenotypic switch toward an anti-inflammatory profile. As such, cardiac macrophages displayed a reparative anti-inflammatory signature as revealed by the reduction of *Il-1 β* , *Tnf- α* , and *iNos* mRNA levels in macrophages of anti-CD8-treated mice (Supplementary Fig. 25). On the same note, the number of reparative macrophage expressing CD206 was increased in the heart of CD8-depleted animals at day 7 (Supplementary Fig. 26).

Global Granzyme B deficiency limits cardiac damage after acute MI. These findings prompted us to investigate the direct cytotoxic role of Granzyme B in post-ischemic cardiac

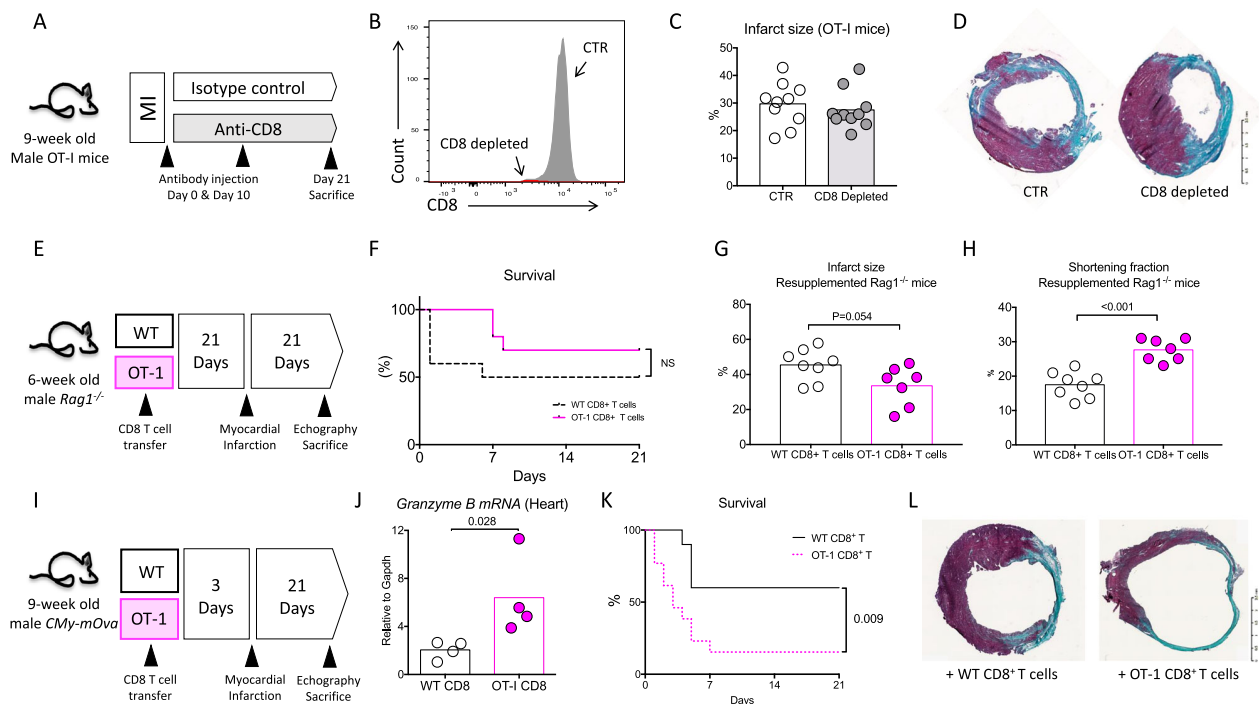


Fig. 3 CD8⁺ T cells pathogenic activity requires antigen-specific stimulation. **A** Male 9-week-old OT-1 mice were treated with isotype control (CTR, white) or the CD8 mAb (CD8 depleted, gray). **B** CD8 depletion (red) was confirmed in the spleen at day 21 using flow cytometry. **C, D** Representative photomicrographs and quantitative analysis of infarct size evaluation using Masson trichrome staining, in the 2 groups of OT-1 mice (CTR $n = 10$ and CD8 depleted $n = 9$). **E** *Rag1*^{-/-} mice injected with CD8-depleted splenocytes re-supplemented with WT (white) or OT-1 (pink) CD8⁺ T cells, 3 weeks before MI. **F** Survival rate following MI (from 2 experiments, WT $n = 16$ and OT-1 $n = 13$). **G** Quantitative analysis of infarct size evaluation assessed by Masson trichrome staining in the 2 groups of mice (WT $n = 8$ and OT-1 $n = 7$). **H** Echocardiography analysis 21 days after MI and assessment of LV shortening fraction (SF) in the 2 groups of re-supplemented mice (WT $n = 8$ and OT-1 $n = 7$). **I** *CMY-mOva* mice were injected with WT (white) or OT-1 (pink) CD8⁺ T cells, 3 days before MI. **J** *Granzyme B* mRNA expression in the ischemic heart at day 2 after MI in *CMY-mOva* mice injected with WT or OT-1 CD8⁺ T cells ($n = 4$ /group). **K** Survival rate following MI (pooled 2 experiments, WT $n = 10$ and OT-1 $n = 12$). **L** Representative examples of infarct size after Masson trichrome staining. *P* values were calculated using two-tailed Mann-Whitney test (**C, G, H, J**). Difference in survival was evaluated using log-rank test (**F, K**).

remodeling. First, MI was induced in *C57bl6* WT and Granzyme B-deficient (*Gzmb*^{-/-}) adult mice. Granzyme B deficiency was confirmed by immunostaining in the spleen of *Gzmb*^{-/-} mice as well as in the heart (Supplementary Fig. 27). Following acute MI, CD8⁺ T cell infiltration was observed in the ischemic heart of *C57bl6* and *Gzmb*^{-/-} mice (Supplementary Fig. 28). A significant reduction of TUNEL⁺ apoptotic cells was found within the injured myocardium ($P < 0.001$) (Fig. 4G), as well as a local reduction of *Il-1 β* , *Il-6*, *Tnf- α* , and *Mmp9* mRNA levels ($P < 0.01$) in *Gzmb*^{-/-} mice compared to WT control group (Fig. 4H and Supplementary Fig. 29). Finally, at day 21 following MI, the infarct size was markedly reduced in *Granzyme B* deficient animals (-55% , $P < 0.05$) (Fig. 4I), and overall survival trended toward improvement (88% vs 64%, $P = 0.12$) (Supplementary Fig. 30). These experiments suggest that Granzyme B per se may have direct cytotoxic activity on cardiomyocytes. To test this hypothesis, mouse cardiomyocytes were co-cultured in vitro with purified WT or *Gzmb*^{-/-} splenic CD8⁺ T cells. After 24 h, T cells were removed and cardiomyocyte apoptosis was monitored for an additional 24-h period using caspase-3 fluorescent dye. CD8⁺ T cell activation was achieved using dynabeads mouse T activator CD3/CD28 (Supplementary Fig. 31). Pre-incubation with activated CD8⁺ T cells did not increase cardiomyocyte apoptosis when compared to pre-incubation with non-activated CD8⁺ T cells at low concentrations (Cardiomyocyte/CD8 ratio 1/1 and 1/3) (Fig. 4J). However, at higher concentrations (ratio 1/5 and 1/10), activated CD8⁺ T cells strongly promoted

cardiomyocyte apoptosis measured as Caspase 3/7⁺ cells (Fig. 4J). Cytotoxicity of CD8⁺ T cells was abolished in case of Granzyme B deficiency (Fig. 4K). We also hypothesized that the effect of CD8⁺ T lymphocytes expressing Granzyme B exceeds a simple cytotoxic action and could impair cardiomyocyte function. For this purpose, cardiomyocytes isolated from adult *C57Bl/6J* mice were co-cultured overnight with purified WT or *Gzmb*^{-/-} splenic CD8⁺ T cells at low concentrations, i.e., 1/3 ratio. Cardiomyocyte contractility was evaluated using computer-assisted sarcomere shortening measurements. Interestingly, decreased sarcomere shortening was observed in cardiomyocytes co-cultured with activated WT CD8⁺ T cells, compared with cardiomyocytes co-cultured with control WT CD8⁺ T cells or activated *Gzmb*^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 4L). Altogether, our results suggest that low number of CD8⁺ T cells curb cardiomyocyte contractility, and that high number of CD8⁺ T cells precipitates cardiomyocyte death.

Granzyme B-deficient CD8⁺ T lymphocytes fail to affect cardiac remodeling and function after acute MI. To further substantiate the role of CD8⁺ T cell-derived Granzyme B, we injected *Rag1*^{-/-} mice either with CD8⁺ T cell-depleted splenocytes, CD8⁺ T-depleted splenocytes re-supplemented with WT or *Gzmb*^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 5A). The purity of the CD8⁺ T lymphocytes is shown in Supplementary Fig. 32. We first verified that re-supplementation with WT or *Gzmb*^{-/-} CD8⁺ T

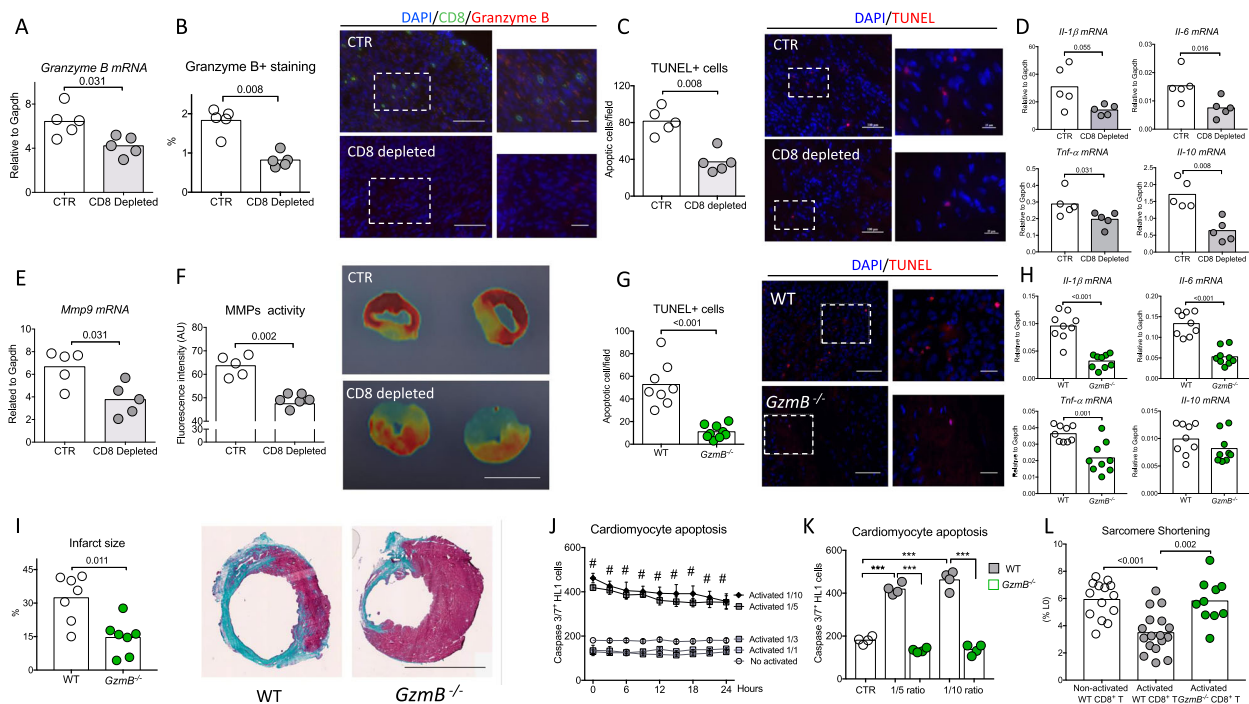


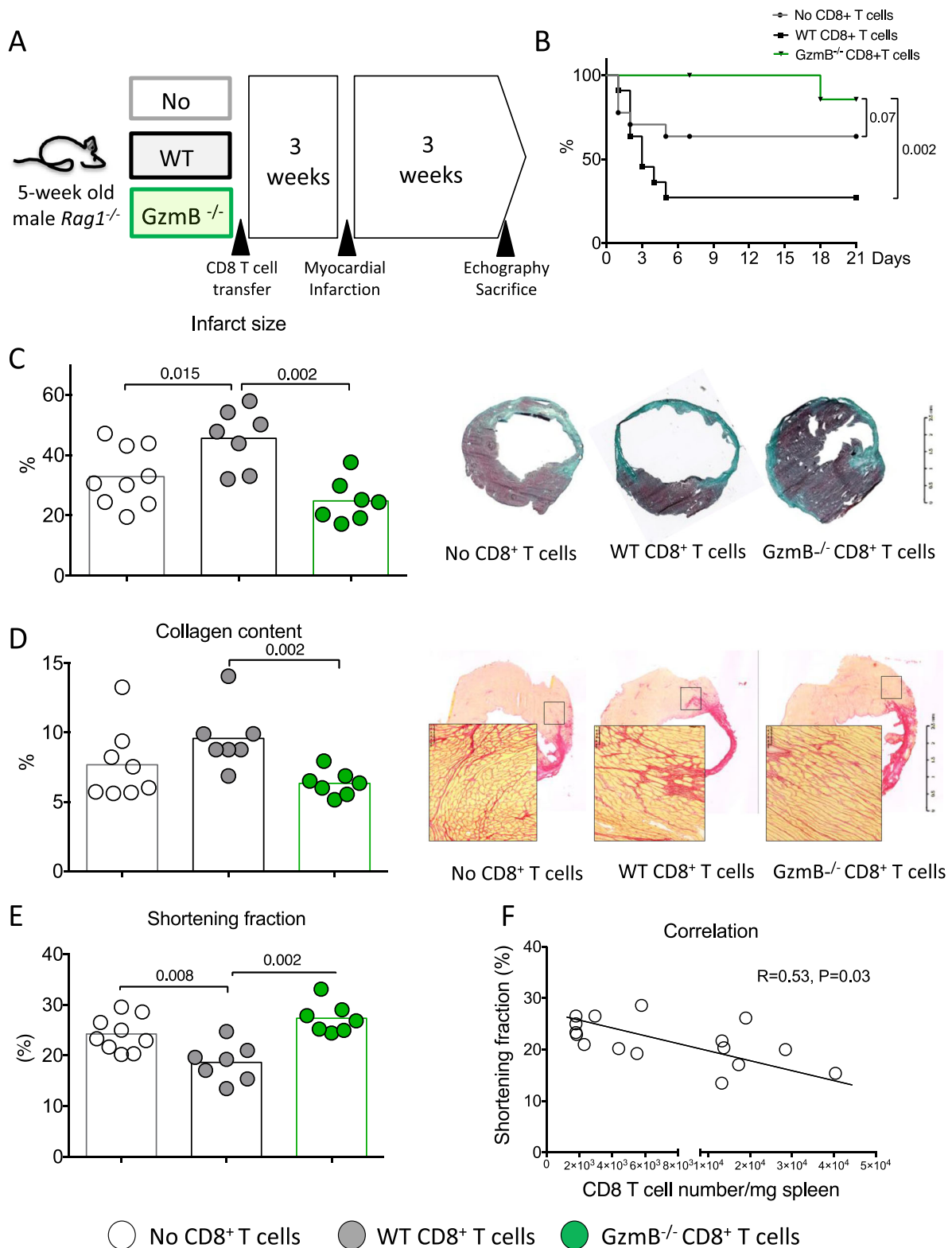
Fig. 4 CD8⁺ T lymphocyte depletion or Granzyme B global deficiency reduces cardiomyocyte apoptosis and pro-inflammatory responses within the ischemic heart tissue. **A** Representative histograms of mRNA levels of Granzyme B within the injured myocardium on day 3 after MI in CTR (white) and CD8-depleted (gray) mice ($n = 5$ /group). **B** Representative examples (right) and quantitative analysis (left) of Granzyme B staining in the ischemic heart of C57BL/6J mice with or without CD8 depletion ($n = 5$ /group); scale bars 50 and 25 μm . **C** Representative examples (right) and quantitative analysis (left) of TUNEL+ cells (Red) in the peri-infarct area of C57BL/6J mice ($n = 5$ /group); scale bars 50 and 25 μm . **D** Representative histograms of mRNA levels of Il-1 β , I-6, Tnf- α , and Il-10 within the injured myocardium on day 7 after MI ($n = 5$ /group). **E** Representative histograms of mRNA levels of *Mmp9* within the injured myocardium on day 7 after MI ($n = 5$ /group). **F** Quantification (left) and representative photomicrographs (right) of matrix metalloproteinase (MMP)-sense 680 activity in the ischemic heart measured by ex vivo reflectance epifluorescence imaging at day 7 (CTR $n = 5$ and CD8 depleted $n = 6$), scale bar 2.5 mm. **G** Acute MI was induced on C57bl6 wild-type (WT, white) mice or *Granzyme B* deficient (*Gzmb*^{-/-}, green) mice. Representative examples (right) and quantitative analysis (left) of TUNEL+ cells in the peri-infarct area of WT C57BL/6J or *Gzmb*^{-/-} mice at day 3 after MI (WT $n = 8$ and *Gzmb*^{-/-} $n = 9$); scale bars 50 and 25 μm . **H** Il-1 β , I-6, Tnf- α , and Il-10 mRNA levels measured by qPCR in infarcted heart at day 3 after MI ($n = 9$ /group). **I** Representative photomicrographs (left) and quantitative analysis (right) of infarct size evaluation using Masson trichrome staining, in the 2 groups of mice ($n = 7$ /group); scale bar 2.5 mm. **J** Purified non-activated or activated WT CD8⁺ T cells were co-cultured with cardiomyocytes at different ratios (Cardiomyocyte/CD8⁺ T cells) for 24 h before their removal. Apoptotic cardiomyocytes labeled with an active caspase-3 fluorescent dye was monitored for 24 h ($n = 4$ -5/conditions), Data are presented as mean \pm SEM, # $P < 0.001$ for activated CD8⁺ T cells 1/5 versus non-activated CD8⁺ T cells or activated CD8⁺ T cells 1/1 or activated CD8⁺ T cells 1/3; # $P < 0.001$ for activated CD8⁺ T cells 1/10 versus non-activated CD8⁺ T cells or activated CD8⁺ T cells 1/1 or activated CD8⁺ T cells 1/3. **K** WT or *Gzmb*^{-/-} CD8⁺ T cells were co-cultured with cardiomyocytes for 24 h at 1/5 and 1/10 ratio and cardiomyocyte apoptosis using an active caspase-3 fluorescent dye was quantified. Cardiomyocyte and non-activated CD8⁺ T cells co-culture was named CTR condition ($n = 4$ /condition) *** $P < 0.001$. **L** Isolated cardiomyocytes were co-cultured overnight with CD8⁺ T cells isolated from WT or *Gzmb*^{-/-} mice and cardiomyocyte sarcomere shortening was measured (non-activated $n = 14$, activated $n = 17$ and *Gzmb*^{-/-} $n = 10$) at a ratio 1/3. P values were calculated using two-tailed Mann-Whitney test (**A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I**, **J**) or Kruskal-Wallis test (**K**, **L**). TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling; MMP, matrix metalloprotease.

lymphocytes significantly increased CD8⁺ T cell numbers in spleens and hearts of *Rag1*^{-/-} mice compared to mice injected with CD8⁺ T cell-depleted splenocytes only (Supplementary Fig. 33).

We then examined the consequences of Granzyme B deficiency in CD8⁺ T lymphocytes on post-ischemic cardiac remodeling. Transfer of WT CD8⁺ T cells into *Rag1*^{-/-} mice reduced survival (Fig. 5A, B) and left ventricular shortening fraction (Fig. 5E) ($P < 0.05$) after MI compared to the transfer of CD8-depleted splenocytes. In our re-supplementation experiment, we observed a significant negative correlation between WT CD8⁺ T cell number and cardiac function (Fig. 5F). This pathogenic effect on mortality and LV systolic function was abrogated after re-supplementation with *Gzmb*^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 5B-E). CD8⁺ T cell supplementation also increased infarct size ($P = 0.04$; Fig. 5C) and collagen content (Fig. 5D), which was

prevented by re-supplementation with *Gzmb*^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 5C, D).

CD8⁺ T lymphocyte depletion is protective in a pig model of coronary ischemia /reperfusion. To confirm the pathogenic role of CD8⁺ T cells in MI and to substantiate the therapeutic interest of CD8-depleting antibody, we used a model of cardiac ischemia-reperfusion in pigs. To achieve CD8⁺ T depletion, we used an IgG2a mouse anti-swine monoclonal anti-CD8 antibody (clone 76-2-11) with known *in vitro*²² and *in vivo* activity against porcine CD8⁺ T cells^{23,24}. As shown in supplementary Fig. 34, pig anti-CD8 mAb treatment was efficient but induced delayed CD8⁺ T cell depletion when compared to mouse anti-CD8 mAb. Indeed, full CD8 depletion was obtained at day 3 after pig anti-CD8 mAb injection, whereas complete CD8⁺ T cell depletion was



obtained as early as 6 h following mAb injection in mice (Supplementary Fig. 8). Based on this observation, we designed a protocol (Supplementary Fig. 35) including 1 control group and 2 CD8-depleted groups receiving anti-CD8 antibody at 2 different time points to obtain either High depletion (>95% depletion at day 1 after MI) or low depletion (60% depletion at day 1 after MI)

(Fig. 6A, B). As previously validated by our group²⁵, coronary occlusion was maintained for 40 min (Supplementary Fig. 35) leading to transmural myocardial infarct. At day 14, we observed no difference in the infarct size between low CD8 depletion and control groups but we found a significant reduction of infarct size in high-CD8-depletion group (−60% vs control, $P < 0.01$)

Fig. 5 CD8⁺ T lymphocytes trigger adverse ventricular remodeling and alter heart function through the production of Granzyme B. **A** *Rag1*^{-/-} mice injected with either CD8-depleted splenocytes (White) or CD8 cell-depleted splenocytes re-supplemented with WT (gray) or *Gzmb*^{-/-} CD8⁺ T cells (green), 3 weeks before MI. **B** Survival curves following MI (from 3 experiments, No CD8 *n* = 15, WT CD8 *n* = 18, and *Gzmb*^{-/-} CD8 *n* = 8). **C** Representative photomicrographs and quantitative analysis of infarct size. **D** Collagen content in the peri-infarct area in the 3 groups of mice, scale bar 100 μ m. Results are pooled from three independent experiments including surviving mice (no CD8 *n* = 9, WT CD8 *n* = 7, and *Gzmb*^{-/-} CD8 *n* = 7). **E** Echocardiography analysis after 21 days of MI and assessment of LV shortening fraction (SF) in the 3 groups of mice (no CD8 *n* = 9, WT CD8 *n* = 7, and *Gzmb*^{-/-} CD8 *n* = 7). **F** Correlation between CD8⁺ T cell number in the spleen at day 21 and LV shortening fraction. Data from CD8-depleted splenocytes or CD8 cell-depleted splenocytes re-supplemented with WT CD8⁺ T cells have been included (*n* = 16). *P* values were calculated using two-tailed Kruskal-Wallis test (**C**, **D**, **E**). Difference in survival was evaluated using log-rank test (**B**) and correlation was studied using Spearman's test (**F**).

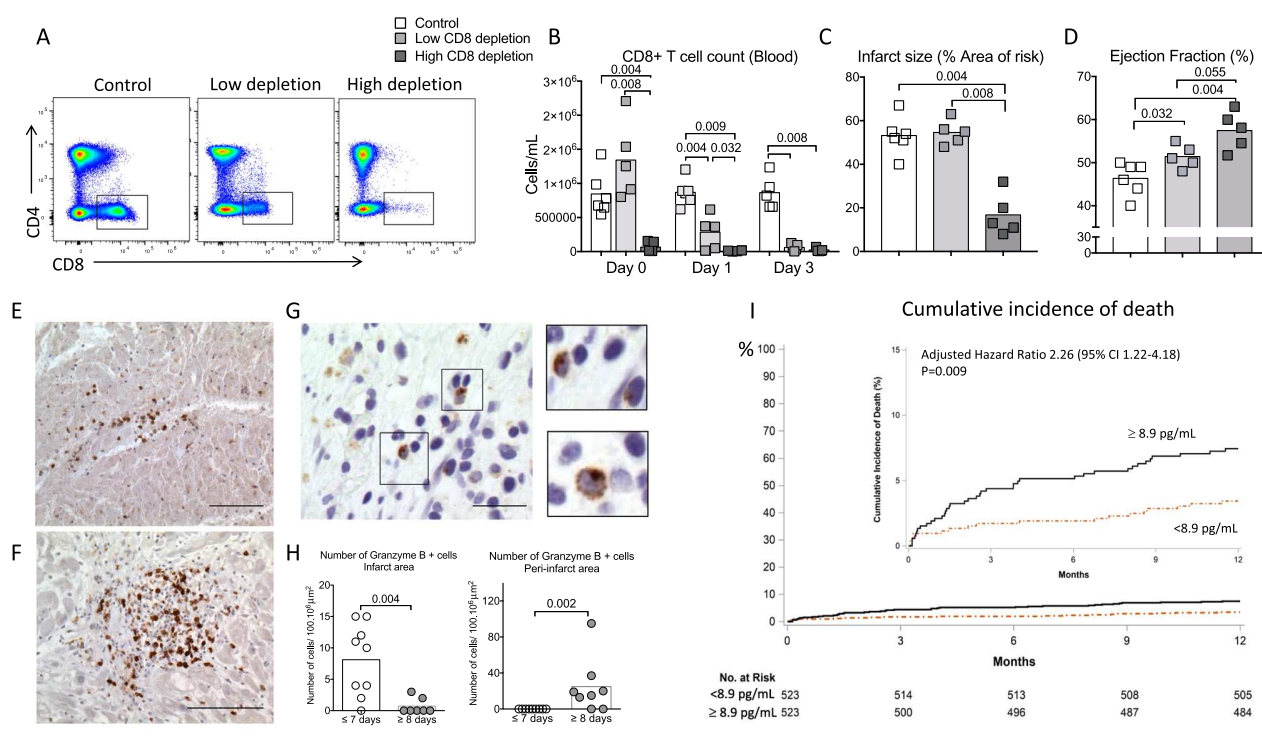


Fig. 6 Pathogenic role of CD8⁺ T cells in a model of myocardial ischemia/reperfusion in pig and relevance to the human disease. **A** Flow cytometry analysis of blood CD4⁺ T and CD8⁺ T subsets at day 1 after MI in control (PBS, CTR, *n* = 6), low (light gray, *n* = 5), and high (dark gray, *n* = 5) CD8-depleted groups. **B** Quantification of CD8⁺ T cell count in the blood at baseline, day 0, day 1, and day 3 after MI. **C** Representative picture and quantification of infarct size at day 14 in control, low, and high CD8-depleted groups. **D** Quantitative evaluation of left ventricle ejection fraction (Simpson) of CTR or CD8-depleted pigs. **E**, **F** Detection of CD8⁺ T cells (brown) in human heart biopsy of MI patients, using immunohistochemistry at day 3 (**E**, upper) and day 8 (**F**, lower) after MI, scale bar 50 μ m. **G** Detection of GRANZYME B⁺ cells (brown) in human heart biopsy of MI patients, using immunohistochemistry, scale bar 20 μ m. **H** Quantification of GRANZYME B⁺ cells (brown) in human heart biopsy of MI patients, using immunohistochemistry at different time points (*n* = 9 day \leq 7, *n* = 8 day \geq 8). **I** Survival according to baseline circulating GRANZYME B level (< or > median value) in patients with acute MI (*n* = 1046). High level of GRANZYME B at the admission for acute MI were independently predictive of death after 1 year of follow-up after multiple adjustments (see Methods and Supplementary Table 3). HR = hazard ratio. *P* values were calculated using two-tailed Mann-Whitney test (**H**) or Kruskal-Wallis test (**B**-**D**).

(Fig. 6C). Finally, both high and low CD8 depletion significantly improved the LV systolic function but the beneficial impact of CD8 depletion was more important in high-depletion group (Fig. 6D and Supplementary Figs. 36 and 37). In addition, CD8 depletion led to decreased Granzyme B plasma levels (Supplementary Fig. 38). Taken together, these results confirmed the pathogenic role of CD8⁺ T cells in reperfused acute MI in a large animal model.

Granzyme B and CD8⁺ T cells in human MI. In human heart biopsies obtained from acute MI patients (Supplementary Table 1), we detected CD8⁺ T cell infiltration in the ischemic heart tissue at day 3 (Fig. 6E) and day 8 after MI (Fig. 6F). GRANZYME B⁺ cells were mainly detected in the infarct area

within the first week of MI, but predominated in the peri-infarct region after day 7 (Fig. 6G, H).

Finally, we addressed the relevance of these findings to the human disease by assessing the relationship between circulating GRANZYME B levels and clinical outcomes among those 1046 patients (Supplementary Table 2) who contributed to a serum bank in FAST-MI, a nationwide cohort of consecutive adults with ST-segment-elevation or non-ST-segment-elevation MI hospitalized at intensive care unit with symptom onset \leq 48 h, in 213 centers representing 76% of French centers managing acute MI patients (NCT01237418). Interestingly, we found that acute MI patients with high circulating levels of GRANZYME B (>median 8.9 pg/mL) at their admission were at higher risk of death after 1 year of follow-up compared to patients with low levels even after adjustment for several multivariable risk factors (Supplementary

Table 3) (adjusted hazard ratio, HR = 2.26, 95% CI = 1.22–4.18, $P = 0.009$) (Fig. 6I).

Discussion

CD8⁺ T cells play a critical role in anti-viral²⁰ and anti-tumor¹⁹ immune responses. Recently, studies identified novel roles for CD8⁺ T lymphocytes in sterile chronic low-grade inflammation such as atherosclerosis²⁶. However, the contribution of CD8⁺ T cells to the inflammatory response secondary to other forms of acute injury, particularly post-ischemic injury is still poorly defined. Our results unravel a critical role for CD8⁺ T cell-dependent Granzyme B production in the pathogenic response to acute MI injury.

In a mouse model of MI with permanent coronary ligation, we showed that activated CD8⁺ T cells expressing CD69 and CD107a markers were recruited within the ischemic myocardium. Such CD8⁺ T cell infiltration in the heart has also been observed in experimental transient ischemia²⁷. In humans, CD8⁺ T cells were identified in the ischemic heart tissue at an early stage after MI, but predominated in the peri-infarct region 1 week after MI. We also observed that CD8⁺ T cell recruitment in cardiac muscle was partially mediated by CD4⁺ T lymphocytes. Similarly, in the context of myocarditis, CD4⁺ T cells have been shown to drive CD8⁺ T cell trafficking through the release of IL-21¹⁶.

Combining “loss of function” using CD8 cell-depleting treatment with anti-CD8 mAb and “gain of function” strategy based on CD8⁺ T cell supplementation in *Rag1*^{-/-} mice, we showed that CD8⁺ T cells promoted deleterious post-ischemic cardiac remodeling at early (day 21) and late stages (day 56) in a murine model of permanent coronary occlusion, as well as in a pig model of coronary ischemia-reperfusion. In mice, CD8⁺ T cells fostered adverse ventricular remodeling through their pro-apoptotic effects. On the same note, CD8⁺ T cells can trigger neuron cell death in vitro and CD8⁺ T cell depletion limited brain apoptotic area in a mouse model of stroke²⁸. Effector mechanisms likely involved in CD8⁺ T cell-mediated cell death include Perforin/Granzyme pathway, two death receptor molecules of the TNF receptor family, such as Fas and pro-inflammatory cytokines, including Interferon- γ . We focused here on the role of Granzyme B, a serine protease released by cytotoxic T cells activating apoptosis pathways and triggering caspase activation indirectly. This protease was detected in the peri-infarct area at early time points following coronary occlusion and co-localized with both infiltrating CD8⁺ T cells and TUNEL⁺ cells. Interestingly, we found that Granzyme B was detected in T cell cytoplasm in non-ischemic area, whereas Granzyme B was found around CD8⁺ T cells in the peri-infarct area, suggesting a mechanism of local degradation. Granzyme B has been previously identified as a major toxic protein in auto-immune diseases such as diabetes²⁹, as well as in cardiovascular diseases such as stroke²⁸. In our study, Granzyme B mediated the deleterious effect of CD8⁺ T cells after MI. In vitro, we showed that activated purified CD8⁺ T cell induced cardiomyocyte apoptosis, and cell death was abolished when CD8⁺ T cells where isolated from *Gzmb*^{-/-} mice. Furthermore, the deleterious cardiac effects of CD8⁺ T cell reconstitution in *Rag1*^{-/-} mice were blunted when animals were repopulated with *Gzmb*^{-/-} CD8⁺ T cells. Importantly, GRANZYME B-expressing T cells were detected in human heart tissue of MI patients, and we found that high plasma levels of Granzyme B within 48 h of admission for acute MI was associated with increased risk of 1-year mortality. On the same note, the number of circulating CD8⁺ CD28⁺ T cell was associated with more severe ischemic heart dysfunction in a small cohort of MI patients³⁰. Hence, one can speculate that GRANZYME B plasma levels could be used as a biomarker to select patients who may

benefit from anti-CD8-depleting antibody in acute MI. Such personalized approach should be tested in the future when human anti-CD8 mAb treatment will be available.

CD8⁺ T cell depletion led to a switch of the immune response within the ischemic heart toward a less inflammatory profile. Local reduction of pro-inflammatory cytokines was unlikely due to decreased leukocyte recruitment, since NK, NKT, neutrophil, classical monocyte, B cell as well as CD4⁺ T cell counts were similar in the infarcted heart of control and CD8-depleted groups. Local deviation of the immune response following CD8 treatment was probably due to a switch of the macrophage profile toward an anti-inflammatory phenotype. Inflammatory macrophages in a classic activation mode, dominated at days 1–3 post-MI, whereas reparative macrophages in an alternative activation mode were the major subsets at days 5–7 post-MI in mouse heart. Pro-inflammatory macrophages secrete cytokines, chemokines, growth, and matrix metalloproteinase (MMPs), whereas anti-inflammatory macrophages are pro-reparative³¹. Local reduction of cardiomyocyte apoptosis and consecutive DAMPs release following CD8 depletion may explain such deviation of macrophage phenotype toward an anti-inflammatory profile³². Of note, in *Cd8^{atm1mak}* mice, a genetically modified mouse model characterized by CD8 T cell deficiency, CD8⁺ T cells have been shown to play a dual and contradictory role. Indeed, animals lacking functional CD8⁺ T cells had increased cardiac rupture despite having better overall survival after MI³³. These results should be analyzed with caution since an effect of *Cd8a* gene mutation on other immune cells, as well as confusing genetic compensation, could not be ruled out in this mouse model³⁴. In this line of reasoning, an increased Th1 responses and an impaired B cell humoral activity have already been reported in *Cd8^{atm1mak}* mice³⁵. In our study, conclusions are supported by different complementary approaches including a very specific monoclonal-targeted strategy with selective CD8⁺ T cell depletion in immunocompetent adult mice.

Decreased apoptosis and generation of secondary necrotic cells most likely accounted for the low inflammatory profile observed in infarcted hearts of CD8-depleted mice. Similarly, *Gzmb*^{-/-} mice exhibited reduced apoptosis and pro-inflammatory cytokine expression. Finally, we showed that TCR engagement was critical for CD8⁺ T cell cytotoxic activity. CD8 depletion in OT-I mice had no effect on post-ischemic cardiac remodeling. Repopulation of *Rag1*^{-/-} mice with purified OT-I CD8⁺ T cells had less deleterious consequences than those of WT CD8⁺ T cells, in terms of infarct size and LV systolic function. In line with these findings, transfer of OT-I CD8⁺ T cells in *CM γ -mOva* mice expressing membrane-bound ovalbumin specifically on cardiomyocytes led to elevated Granzyme B content in the ischemic heart, high mortality rate, and pronounced deleterious cardiac remodeling in survivors after MI. Hence, our results indicate that, in acute MI, CD8⁺ T cells are activated by autoantigens presented by MHC class I molecules. Further studies are required to identify the specific peptides recognized by CD8⁺ T cells. Cardiac contractile proteins may represent such candidates. Previous works have shown that α -myosin heavy chain is a pathogenic autoantigen for CD4⁺ T cells in a mouse model of spontaneous myocarditis³⁶.

Our study delineates an important contributory role for CD8⁺ T cells during the immune-inflammatory responses that lead to tissue damage following acute MI. Conversely to B cells or CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells have no major role in regulating immune cell recruitment within the site of injury. CD8⁺ T cells are quickly recruited within the ischemic heart tissue and are activated in an antigen-specific manner. Activated CD8⁺ T cells release Granzyme B that has cytotoxic activity in the heart promoting cardiomyocyte death and a sterile pro-inflammatory immune

response. As a consequence, CD8⁺ T cell depletion substantially limits heart cell apoptosis, myocardial inflammation, infarct size, and finally improves myocardial function. The positive association of GRANZYME B circulating levels with poor outcome in patients with acute MI strongly supports the clinical relevance of our findings to the human disease.

Experiments in female pigs were performed to confirm the pathogenic role of CD8⁺ T cells in a large model of heart ischemia-reperfusion, mimicking percutaneous transluminal coronary angioplasty during human acute MI. We found beneficial effect of CD8⁺ depletion in this pig model but the mechanism of protection was probably different between high- and low-CD8-depletion groups. High CD8 depletion may be protective through a reduction of cardiomyocyte apoptosis and infarct size, a mechanism that we previously found in mouse models of permanent coronary artery occlusion. Beneficial effect of low CD8 was unlikely due to decreased cardiac cell apoptosis but may be due to a protective effect on cardiomyocyte function. Such a hypothesis was supported by in vitro experiments showing that low number of activated CD8⁺ T cells are able to impair cardiomyocyte contractility in a Granzyme B-dependent manner without inducing cell death. Balloon occluder implantation to induce transient coronary artery occlusion in pig was done surgically 14 days before heart ischemia and long-term surgery-induced inflammation could not be ruled out.

We believe that the present study paves the way for the development of therapeutic approaches based on the administration of humanized CD8-depleting antibodies during the acute phase of MI. Because of pharmacodynamic characteristics of anti-swine monoclonal anti-CD8 antibody, anti-CD8 mAb has to be injected before ischemia-reperfusion procedure to induce high CD8 depletion. Obviously, such a therapeutic strategy could not be used in human MI to limit deleterious post-ischemic cardiac remodeling, but underscores the need for developing an anti-human anti-CD8 mAb that induces full and rapid CD8⁺ T cell depletion to translate cardiac benefit from animal to human.

Methods

Mice models. All experiments were conducted according to the French veterinary guidelines and those formulated by the European Community for experimental animal use and were approved by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. The protocol was approved by the ethical committee CEEA34 Université de Paris (APAFIS #10554-2017041016471398). All the animals were maintained under identical standard conditions (housing, regular care and normal chow). Mice were maintained in isolated ventilated cages under specific pathogen-free conditions.

Myocardial infarction. All mice were on full C57BL/6J background. C57BL/6 (Janvier, France), *Gzmb*^{-/-}, *Rag1*^{-/-}, and *OT-I* mice (Jackson, USA) as well as *CMY-mOva* mice (A. Lichtman's lab, USA)¹⁸ were 9-week-old at the time of MI. Myocardial infarction was induced by left anterior descending coronary artery ligation³⁷. Mice were anesthetized using ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) via intraperitoneal (i.p.) injection, then intubated and ventilated using a small animal respirator. The chest wall was shaved and a thoracotomy was performed in the fourth left intercostal space. The LV was visualized, the pericardial sac was then removed, and the left anterior descending artery was permanently ligated using a 7/0 non-absorbable monofilament suture (Peters surgical, France) at the site of its emergence under the left atrium. Significant color changes at the ischemic area were considered indicative of successful coronary occlusion. The thoracotomy was closed with 6/0 non-absorbable monofilament sutures (Peters surgical, France). The same procedure was performed for sham-operated control animals except that the ligation was left untied. The endotracheal tube was removed once spontaneous respiration resumed, and animals were placed on a warm pad maintained at 37 °C until the mice were completely awake.

To determine the recruitment and activation of CD8⁺ T lymphocytes in the ischemic heart muscle after MI, *C57bl6* WT mice were subjected to permanent coronary ligation; sham *C57bl6* WT mice were used as control in this set of experiments (the same MI procedure was performed for the sham-operated mice except that the coronary ligation was not tied). Mice were sacrificed at different time points for flow cytometry and histological analysis. In order to assess the role of CD4⁺ T cells in the recruitment of CD8⁺ T cells in ischemic cardiac muscle,

C57bl6 WT mice were injected i.p. with a depleting rat anti-mouse CD4 monoclonal antibody (100 µg/mouse, Biotem Clone YTS 169.4)³⁸ or with a rat IgG2b isotype control (R&D Systems; Abingdon, UK) 24 h before MI. These mice were sacrificed 1 day or 3 days after the surgery for flow cytometry analysis.

To evaluate the role of CD8⁺ T cells in post-ischemic cardiac remodeling, *C57bl6* WT mice were injected i.p. with a depleting rat anti-mouse CD8 monoclonal antibody (100 µg/mouse, Biotem Clone YTS 169.4)³⁸ or with a rat IgG2b isotype control (R&D Systems; Abingdon, UK) 1 h after coronary artery ligation. In order to maintain cell depletion for an extended period, mice were re-injected at day 7 and day 14 after MI. Animals were sacrificed 24 h, 3 days, 7 days, and 14 days after surgery for flow cytometry and histological analysis.

To investigate if TCR engagement aggravates CD8 cardiac cytotoxicity, we used two genetically modified mice models: (1) *C57BL/6-Tg(TcrαTcrβ)1100Mjb/J* mouse is also known as OT-I (Charles River). The transgenic T cell receptor of OT-I mouse was designed to recognize ovalbumin peptide residues in the context of H2Kb (CD8 co-receptor interaction with MHC class I). This results in MHC class I-restricted, ovalbumin-specific. The CD8⁺ T cells of OT-I mouse primarily recognize OVA peptide when presented by the MHC I molecule; (2) *CMY-mOva* mouse is a transgenic mouse line with cardiomyocyte restricted membrane-bound ovalbumin expression¹⁸. OT-I mice were injected i.p. with a rat anti-mouse CD8 monoclonal antibody (100 µg/mouse, Biotem Clone YTS 169.4)³⁸ or with a rat IgG2b isotype control (R&D Systems; Abingdon, UK) 1 h after MI. In order to maintain cell depletion for an extended period, mice were re-injected at day 7 and day 14 after MI. Next, 6-week-old immunodeficient *Rag1*^{-/-} mice were used as recipients for CD8⁺ T cell repopulation studies 21 days prior MI. Purified WT CD8⁺ T cells or OT-I CD8⁺ T cells were obtained from *C57bl6* WT mice or OT-I mice, respectively. Cells were resuspended in phosphate-buffered saline (6 × 10⁶ cells/200 µL/ mouse) and transferred to *Rag1*^{-/-} mice by i.v. injection. Finally, 8 weeks old *CMY-mOva* mice received either 6 × 10⁶ WT CD8⁺ T lymphocytes or 6 × 10⁶ OT-I CD8⁺ T lymphocytes 3 days before MI. In all these experiments, OT-I, *Rag1*^{-/-}, and *CMY-mOva* mice were sacrificed 21 days after MI for histological analysis.

In order to show that Granzyme B specifically released by CD8⁺ T cells mediates cardiac cytotoxicity, immunodeficient *Rag1*^{-/-} mice received either 4 × 10⁶ CD8⁺ T cell-depleted splenocytes (including all spleen leukocyte subsets except CD8⁺ T cells), CD8⁺ T cell-depleted splenocytes re-supplemented with 6 × 10⁶ WT purified CD8⁺ T lymphocytes, or 6 × 10⁶ purified *Gzmb*^{-/-} CD8⁺ T lymphocytes. Mice were then allowed to recover for 3 weeks before they were challenged with MI. Repopulation was checked at day 3 following MI in the spleen and the heart. Recipient *Rag1*^{-/-} mice were sacrificed 21 days after surgery for histological analysis.

Echocardiographic measurements. Transthoracic echocardiography was performed at 9, 21, and 28 days after surgery using an echocardiograph (ACUSON S3000™ ultrasound, Siemens AG, Erlangen Germany) equipped with a 14-MHz linear transducer (1415SP). The investigator was blinded to group assignment. Animals were anesthetized by isoflurane inhalation. Two-dimensional parasternal long-axis views of the LV were obtained for guided M-mode measurements of the LV internal diameter at end diastole (LVDD) and end systole (LVDS), as well as the interventricular septal wall thickness, and posterior wall thickness at the same points. Fractional shortening percentage (%FS) was calculated by the following formula: %FS = [(LVDD – LVDS)/LVDD] × 100. Invasive left ventricular hemodynamic indices were measured in anesthetized mice with a 2F dual-field combination pressure-conductance catheter (model SPR-819, Millar Instruments) as previously described³⁹.

CD8⁺ T cell purification and transplantation. CD8⁺ T cells were isolated from *C57BL/6J*, *Gzmb*^{-/-}, or OT-I spleens and purified using a CD8⁺ T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) according to the manufacturer's protocol. In brief, CD8⁺ T cells were negatively selected using a cocktail of antibody-coated magnetic beads (CD4, CD11b, CD11c, CD19, CD45R (B220), CD49b (DX5), CD105, Anti-MHC-class II, Ter-119, and TCRγ/δ) followed by cell separation using LS magnetic columns (Miltenyi Biotec; Paris, France), yielding CD8⁺ T cells with >95% purity. Then cells were: (a) intravenously injected 21 days prior MI in *Rag1*^{-/-} mice or 3 days before MI in *CMY-mOva* mice and (b) cultured for in vitro experiments.

CD8⁺ T cell activation. CD8⁺ T cells were isolated as described above and cultured in activation medium containing RPMI-1640 supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin (Gibco, ThermoFisher), 50 U/mL IL2, 10 ng/mL IL12 (R&D Systems; Abingdon, UK), and dynabeads mouse T activator CD3/CD28 (Gibco, ThermoFisher) in a ratio of 1:1 with respect to CD8⁺ T cell count.

HL1 cardiomyocytes culture. Cells were seeded into 24-well plates (coated with gelatin-fibronectin (Sigma-Aldrich) overnight, 37 °C) at a density of 20 × 10³ cells/mL/well and maintained for 2 days in Growth Medium containing Claycomb Medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 U/mL streptomycin (Gibco, ThermoFisher), 1% norepinephrine 10 mM (Sigma-Aldrich), and 1% L-Glutamine 100X (Sigma-Aldrich).

Co-culture and apoptosis experiment. Activated CD8⁺ T cells were co-cultured with HL1 cardiomyocytes in different ratios (1:1, 1:5, and 1:10) with respect to cardiomyocyte count. Following co-culture for 24 h, CD8⁺ T cells were removed and HL1 cardiomyocytes were labeled with the addition of 5 μ M Caspase-3/7 Green Apoptosis Reagent (Incucyte, Welwyn Garden, UK) to the growth medium. After 30 min at 37 °C in dark, apoptosis in real-time was evaluated with a microscope Nikon Eclipse, Ti. Time-lapse images were captured at 10 min intervals.

Co-culture and cardiomyocyte contractility. Cardiomyocytes were isolated using a simplified Langendorff-free method as previously reported⁴⁰ with minor modifications. Briefly, C57/BL6J mice aged 10–12 weeks were anesthetized, their chests were washed with 70% ethanol and opened to expose the heart. The descending aorta was cut and 7 mL of EDTA buffer (130 mmol/L of NaCl; 5 mmol/L of KCl; 0.5 mmol/L of Monosodium Phosphate; 10 mmol/L of HEPES, 10 mmol/L of Glucose, 10 mmol/L of 2,3-Butanedione 2-monoxime, 10 mmol/L of Taurine, 5 mmol/L of EDTA) was injected into the right ventricle. Ascending aorta was then clamped using atraumatic forceps and the heart was transferred to a 60-mm dish containing fresh EDTA buffer. The petri dish was fixed on a heating block to reach a temperature of 37 °C. The heart was then perfused in the LV with a set up using a 26 G needle connected to a line and a syringe and then subjected to sequential injections of 10 mL of EDTA buffer, 10 mL of perfusion buffer (130 mmol/L of NaCl; 5 mmol/L of KCl; 0.5 mmol/L of Monosodium Phosphate; 10 mmol/L of HEPES, 10 mmol/L of Glucose, 10 mmol/L of 2,3-Butanedione 2-monoxime, 10 mmol/L of Taurine, 1 mmol/L of MgCl₂), and 45 mL of collagenase buffer (105 U/mL of Collagenase II; 130 U/mL of Collagenase IV; 10 U/mL of Protease XIV; diluted in perfusion buffer) using a syringe pump fixed at a steady rate of 80 mL/h. At the end of the digestion, the atria and remaining aorta were excised and discarded. Cellular dissociation was completed by gentle mechanical trituration, and enzyme activity was stopped by adding 5 mL of stop buffer (10% FBS; 100 mmol/L of CaCl₂; diluted in perfusion buffer). Cell suspension was passed through a 100- μ m filter to remove non-digested tissue. Calcium concentration in the cardiomyocytes was gradually restored to physiological levels by adding an increased quantity of calcium buffer 5 times every 4 min. Concentration of viable rod-shaped cardiomyocytes were quantified using a hemocytometer. The cardiomyocytes were then resuspended in prewarmed plating media (M199, Gibco; 5% FBS; 10 mmol/L of 2,3-Butanedione 2-monoxime, Sigma Aldrich) and plated at a density of 20,000 cardiomyocytes/well, onto laminin (50 μ g/mL) precoated 25 mm \times 25 mm glass coverslips in a humidified tissue culture incubator (37 °C, 5% CO₂). After 2 h, media was changed to fresh, prewarmed culture media (M199, Gibco; 5% BSA; 1X ITS supplement, Sigma Aldrich; 10 mmol/L of 2,3-Butanedione 2-monoxime, Sigma Aldrich. 1X CD lipid. Chemically Defined Lipid Concentrate, Thermo Scientific). Activated WT or *Gzmb*^{-/-} purified spleen CD8⁺ T lymphocytes were co-cultured with cardiomyocytes in 1:3 ratio with respect to cardiomyocyte count. Following co-culture for 12 h, CD8⁺ T cells were discarded and the medium replaced with prewarmed culture media. Sarcomere shortening was measured on myocytes incubated in fresh prewarmed culture media and field stimulated at 1 Hz (20 V, 1 ms). Data were recorded at room temperature (20 °C) using Ionoptix Imaging System coupled to a microscope (\times 40; ZEISS) and analyzed using SarcLen software (IonWizard 6 Software; Ionoptix, Milton, MA, USA).

Histopathological and immunofluorescence analyses. Cardiac healing following MI was assessed at different time points. Hearts were excised, rinsed in PBS, and frozen in liquid nitrogen. For tissue morphology analysis after MI, hearts were cut along their length into 7- μ m thick cardiac muscle cryosections (CM 3050S, Leica). Serial sections were mounted on microscope slides ($n = 10$), each section being spaced from the next one by 550 μ m. In this way, 6–7 cuts/heart (site where the suture was observed), allowed entire heart tissue analysis. Masson's trichrome and Sirius Red stainings were performed for infarct size and interstitial fibrosis evaluation, respectively. Infarct size was calculated as a percentage of infarct area to total LV circumference. The collagen volume fraction was calculated as the ratio of the total area of interstitial fibrosis to the myocyte area in the entire visual field of the section.

Heart sections for immunofluorescence analysis were fixed with paraformaldehyde 4%, permeabilized using 0.2% Triton X100 in Phosphate Buffer Solution (PBS) 30 min at room temperature, blocked with PBS-T (0.2% Triton X100, 10% goat serum, 0.2% BSA in PBS) for 1 h, and incubated with primary antibodies diluted in PBS-T overnight at 4 °C. CD8 T lymphocyte infiltration was detected using an anti-CD8 antibody (Abcam, 1:200); Granzyme B detection in ischemic heart tissue was performed using an anti-Granzyme B antibody (R&D Systems 1:100); Sections were washed with PBS and incubated with a mixture of appropriate secondary antibodies for 1 h at room temperature: Cyanine 3 Goat anti-rat and Cyanine 5 Donkey anti-goat, respectively (Jackson ImmunoResearch). 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) was used to counterstain cell nuclei. To evaluate cell apoptosis (day 3 post-MI), immunofluorescence analyses were performed using a TUNEL assay kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) according to manufacturer's instructions. The digital images of immunofluorescence were acquired with a Zeiss Axioimager Z2 Apotome. Two microscopic fields in the infarcted area (in the case of CD8⁺ T cells and Granzyme B staining) and in both sides of peri-infarct area (in the case of TUNEL staining) from each heart were examined using ImageJ64. All illustrative stainings were repeated once (totally two independent experiments, $n = 5$ /group/experiment).

TTC staining. To evaluate infarct size at early time points (3 days after MI), 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) was used. TTC staining identifies metabolically active tissue and is helpful to measure tissue viability. Hearts were removed and sectioned into 2 mm thick slices in a semi frozen state. The slices were then immersed for 40 min in 1% TTC solution at 37 °C. Once the color had been established, slices were fixed in 4% PAF overnight at room temperature. Slices were photographed and infarcted heart tissue areas were calculated using ImageJ64 blindly.

Ex vivo reflectance epifluorescence imaging. Mice were anaesthetized with isoflurane and received intravenously 150 μ L of a fluorescent imaging probe MMP-sense 680 (NEV 10126, PerkinElmer) 24 h before sacrifice. This agent is optically silent in its un-activated state and becomes highly fluorescent following activation by MMPs including MMP-2, -3, -9, and -13. Images of ischemic hearts were acquired using a fluorescence molecular imaging system (FMT 2500TM, VisEn Medical)⁴¹.

Cell suspension preparation for flow cytometry. Mice were sacrificed at 12 h and on days 1, 3, 5, 7, 14, and 21 post-MI ($n = 5$ –10 mice per time point). Peripheral blood was drawn via inferior vena cava puncture using a syringe primed with heparin solution. For blood staining, erythrocytes were lysed using BD FACS lysis solution (BD Biosciences). Spleens were surgically removed and dissociated, obtaining a single cell suspension that was filtered through 40- μ m nylon mesh (BD Biosciences). Cell suspensions were centrifuged at 400g for 15 min at 4 °C. Red blood cells were removed using a red blood lysis buffer (Sigma-Aldrich) and splenocytes were washed with PBS supplemented with 3% FBS. LV of infarcted and control mice were harvested, minced with fine scissors, and gently passed through a Bel-Art Scienceware 12-Well Tissue Disaggregator (Fisher Scientific). Cells were collected, filtered through 40- μ m nylon mesh (BD Biosciences), and centrifuged at 400g for 15 min. Red blood cells were removed by incubation in red blood cell lysis buffer (Sigma-Aldrich) and single cell suspension were washed with PBS supplemented with 1% fetal bovine serum.

Flow cytometry. General characteristics of antibodies are summarized in Supplementary Tables 4 and 5. Surface stainings were performed before permeabilization when intracellular labeling were necessary. Cells were incubated in Fixation/Permeabilization buffer (eBiosciences) for 45 min, washed with permeabilization buffer (eBiosciences), and stained with the appropriate marker for intracellular stainings. Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) parameters were used to gate live cells excluding red blood cells, debris, and cell aggregates in total splenocytes. Cells were analyzed using a BD CantoII or BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences).

Quantitative real-time PCR. Quantitative real-time PCR was performed on a Step-one Plus (Applied Biosystems) qPCR machine. GAPDH was used to normalize gene expression. The primer sequences are described in Supplementary Table 6.

Myocardial infarction in pigs. The studies were conducted according to relevant ethical guidelines and the protocol was approved by the ethical committee ComEth Anses/EnvA/UPEC (APAFIS #3841-2016012815406796). Pigs (Land race White crossed, Lebeau, Gambais France) were pretreated with azaperon (8 mg/kg IM) and atropine (50 μ g/kg). After administration of ketamine (20 mg/kg i.v.), anesthesia was induced and maintained by isoflurane (2.5%). Animals also received morphine (2 mg/kg) intravenously. After administration of rocuronium (2.5 mg/kg), fluid-filled Tygon catheters was implanted in the descending thoracic aorta, left atrium, and pulmonary artery for the measurement of arterial blood pressures, administration of lidocaine in case of arrhythmias, and drug administration, respectively. A balloon occluder was inserted around the left descending coronary artery to induce its occlusion and reperfusion. Catheters were exteriorized between the scapulae. Chest was closed in layers. For postoperative care, animals were treated with fentanyl (patch, 100 μ g/h for 2 days) and long-acting amoxicillin (15 mg/kg every 2 days for 10 days). Two weeks after surgery, animals were sedated with tiletamine and zolazepam (both 10 mg/kg) and then anesthetized with thiopental (50 mg/kg/h for 25 min). The animals were intubated and properly ventilated and the balloon occluder was inflated for 40 min to occlude the left descending coronary artery followed by reperfusion. PBS or depleting anti-CD8 monoclonal antibody (76-2-11, JgG2a mouse anti-swine, 15 mg/kg)²⁴ was administered intravenously either 3 days before coronary occlusion (high CD8 depletion) or 60 min after reperfusion (low CD8 depletion) (Supplementary Fig. 32). The animals returned to their cage for 14 days. At day 14 after MI, animals underwent echocardiographic examination. This was performed and analyzed by the same sonographer blinded to treatment information. Using a Vivid 7 ultrasound unit (General Electric Medical System, Horten, Norway) under ECG monitoring, echocardiographic images were acquired in pigs placed in standing position in a sling and sedated with propofol (induction dose: 2 mg/kg, i.v.; maintenance dose: 5 mg/kg/h), using a 4.3-MHz transducer. Echocardiographic images at apical 4-chamber and 2-chamber views were acquired blindly. For each image, three consecutive cardiac cycles were stored digitally for offline analysis (EchoPac 6.0, GE Healthcare). Left ventricular (LV) ejection fraction

was calculated by the biplane Simpson method using both the apical 4-chamber and 2-chamber views. At sacrifice, pigs were re-anesthetized and the balloon occluder was inflated again. Crystal violet solution (0.8%) was administered intravenously to delineate the previously occluded vascular bed (area at risk, AAR). The heart was excised, and the LV was cut into slices that were weighed and incubated in 1% TTC, 37 °C) to detect MI. Slices were overnight fixed in 5% formaldehyde and then photographed. Using a computerized planimetric program (ImageJ, NIH, Bethesda, MD, USA), the AAR, the infarcted and salvaged zones were delimited and quantitated blindly. The AAR was identified as the non-violet region and was expressed as a percentage of the LV weight. Infarcted area was identified as the TTC-negative zone and was expressed either as a percentage of AAR. The viable tissue or salvaged area was expressed as percentage of AAR.

Immunostaining on human ischemic heart tissue. All the patients gave informed consents for the surgical procedure. All the patients had LV assist device (HeartMate II or HeartWare) implantation for severe cardiac failure. For implantation of the device, the apex of the LV was opened and tissue samples were excised. Tissues were fixed in formalin and paraffin embedded. The tissue sections were stained with H&E for pathological diagnostic procedure allowing dating of MI in addition to clinical dating. On remnant sections, immunohistochemistry was performed with anti-CD8 (clone SP239, Abcam) diluted at 1:500 and anti-GRANZYME B (clone GrB-7, Dako) diluted at 1:150 using an automated system (Roche Diagnostics France, Meylan, France). Quantification of GRANZYME B labeling: Given the very small granule pattern of GRANZYME B labeling, the immunostained sections were scanned at X40 magnification and individual labeled cells were numbered. All the fields of the paraffin sections were assessed and the number of positive cells was counted in the infarct and peri-infarct areas at two different stages (≤ 7 days; > 7 days).

Population of patients with acute MI. The population selection methods of the French registry of Acute ST-elevation and non-ST-elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) have been described in detail in previous publications^{42,43}. Briefly, all patients ≥ 18 years of age were included in the registry if they had elevated serum markers of myocardial necrosis higher than twice the upper limit of normal for creatine kinase, creatine kinase-MB, or elevated troponins, and either symptoms compatible with acute MI and/or electrocardiographic changes on at least two contiguous leads with pathologic Q waves (≥ 0.04 s) and/or persisting ST elevation or depression > 0.1 mV. The time from symptom onset to intensive care unit admission had to be < 48 h. Patients were managed according to usual practice; treatment was not affected by participation in the registry. Of the 374 centers in France that treated patients with acute MI at that time, 223 (60%) participated in the registry. Among these, 100 centers recruited 1029 patients who contributed to a serum bank. For the present study, 1046 samples were available for GRANZYME B measurement. Their baseline characteristics were comparable to the overall population of the registry. More than 99% of patients were Caucasians. Follow-up data were collected by contacting the patients' physicians, the patients themselves, or their family, and registry offices of their birthplace. Data obtained from 1-year follow-up were $> 99\%$ complete. We have complied with all relevant ethical regulations. Written informed consent was provided by each patient. The study was approved by the Committee for the Protection of Human Subjects in Biomedical Research of Saint Antoine University Hospital (Ethical Committee) and the data file was declared to the Commission Nationale Informatique et Liberté (ClinicalTrials.gov NCT01237418). Human Granzyme B analysis was carried out using the Granzyme B Human ELISA Kit (Invitrogen, ThermoFisher), following the manufacturer's instructions.

Statistical analysis. Values are expressed as mean \pm SEM. Differences between values were examined using the non-parametric Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test and were considered significant at $P < 0.05$. Shapiro-Wilk test was used for assessment of normality. Kaplan-Meier survival curves were constructed and analyzed using log-rank (Mantel-Cox) test. An outcome event was defined as all-cause death during the 1-year follow-up period. The primary endpoint was defined as all-cause death and was adjudicated by a committee whose members were unaware of patients' medications and blood measurements. Continuous variables are described as mean \pm SD or median, Q1, Q3, and categorical variables as frequencies or percentages. Baseline demographic and clinical characteristics, treatment factors, and therapeutic management during hospitalization were compared among patients inferior or superior to the Granzyme B median level (8.9 pg/mL) using chi-square or Fisher's exact tests for discrete variables and by unpaired *t*-tests or Wilcoxon sign-rank tests for continuous variables. Survival curves according to the GRANZYME B median level are estimated using the Kaplan-Meier estimator. We used a multivariable Cox proportional-hazards model to assess the independent prognostic value of variables with the primary endpoint during the 1-year follow-up period. The multivariable model comprised sex, age, body mass index, current smoking, family history of coronary disease, history of hypertension, hypercholesterolemia, previous MI, previous stroke or transient ischemic attack (TIA), previous cancer, CPK peak, heart failure, renal failure, diabetes, Killip class, left ventricular ejection fraction, STEMI or reperfusion, and hospital management (including reperfusion therapy, coronary artery bypass surgery, statins, beta

blockers, clopidogrel, diuretics, low-molecular-weight heparin, GPIIb/IIIa inhibitors) (See Supplemental Table 3). Results are expressed as hazard ratios for Cox models with 95% confidence intervals (CIs). All statistical tests were two-sided and performed using SAS software version 9.4.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author on reasonable request. Source data are provided with this paper.

Received: 30 July 2020; Accepted: 9 February 2021;

Published online: 05 March 2021

References

- Frangogiannis, N. G. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodeling. *Nat. Rev. Cardiol.* **11**, 255–265 (2014).
- Rosamond, W. D. et al. Twenty-two-year trends in incidence of myocardial infarction, coronary heart disease mortality, and case fatality in 4 US communities, 1987–2008. *Circulation* **125**, 1848–1857 (2012).
- Puymirat, E. et al. Association of changes in clinical characteristics and management with improvement in survival among patients with ST-elevation myocardial infarction. *JAMA* **308**, 998–1006 (2012).
- Lavoie, L., Khoury, H., Welner, S. & Briere, J. B. Burden and prevention of adverse cardiac events in patients with concomitant chronic heart failure and coronary artery disease: a literature review. *Cardiovasc. Ther.* **34**, 152–160 (2016).
- Nahrendorf, M. Myeloid cell contributions to cardiovascular health and disease. *Nat. Med.* **24**, 711–720 (2018).
- Hofmann, U. & Frantz, S. Role of lymphocytes in myocardial injury, healing, and remodeling after myocardial infarction. *Circ. Res.* **116**, 354–367 (2015).
- Weirather, J. et al. Foxp3+ CD4+ T cells improve healing after myocardial infarction by modulating monocyte/macrophage differentiation. *Circ. Res.* **115**, 55–67 (2014).
- Santos-Zas, I., Lemarie, J., Tedgui, A. & Ait-Oufella, H. Adaptive immune responses contribute to post-ischemic cardiac remodeling. *Front. Cardiovasc. Med.* **5**, 198 (2018).
- Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* **296**, 301–305 (2002).
- Anzai, A. et al. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling. *Circulation* **125**, 1234–1245 (2012).
- Yan, X. et al. Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell Cardiol.* **62**, 24–35 (2013).
- Yang, Z. et al. Myocardial infarct-sparing effect of adenosine A2A receptor activation is due to its action on CD4+ T lymphocytes. *Circulation* **114**, 2056–2064 (2006).
- Curato, C. et al. Identification of noncytotoxic and IL-10-producing CD8+AT2R+ T cell population in response to ischemic heart injury. *J. Immunol.* **185**, 6286–6293 (2010).
- Boag, S. E. et al. T lymphocytes and fractalkine contribute to myocardial ischemia/reperfusion injury in patients. *J. Clin. Invest.* **125**, 3063–3076 (2015).
- Hofmann, U. et al. Activation of CD4+ T lymphocytes improves wound healing and survival after experimental myocardial infarction in mice. *Circulation* **125**, 1652–1663 (2012).
- Liu, W. et al. IL-21R expression on CD8+ T cells promotes CD8+ T cell activation in coxsackievirus B3 induced myocarditis. *Exp. Mol. Pathol.* **92**, 327–333 (2012).
- Bourgeois, C., Kassiotis, G. & Stockinger, B. A major role for memory CD4 T cells in the control of lymphopenia-induced proliferation of naive CD4 T cells. *J. Immunol.* **174**, 5316–5323 (2005).
- Grabie, N. et al. IL-12 is required for differentiation of pathogenic CD8+ T cell effectors that cause myocarditis. *J. Clin. Invest.* **111**, 671–680 (2003).
- Yatim, N., Cullen, S. & Albert, M. L. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 262–275 (2017).
- Tscharke, D. C., Croft, N. P., Doherty, P. C. & La Gruta, N. L. Sizing up the key determinants of the CD8(+) T cell response. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 705–716 (2015).
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 388–400 (2015).
- Pescovitz, M. D., Lunney, J. K. & Sachs, D. H. Murine anti-swine T4 and T8 monoclonal antibodies: distribution and effects on proliferative and cytotoxic T cells. *J. Immunol.* **134**, 37–44 (1985).

23. Suzuki, T., Sundt, T. M. 3rd, Mixon, A. & Sachs, D. H. In vivo treatment with antiporcine T cell antibodies. *Transplantation* **50**, 76–81 (1990).
24. Allan, J. S. et al. Cardiac allograft vasculopathy is abrogated by anti-CD8 monoclonal antibody therapy. *Ann. Thorac. Surg.* **64**, 1019–1025 (1997).
25. Ghaleh, B. et al. Cardioprotective effect of sonic hedgehog ligand in pig models of ischemia reperfusion. *Theranostics* **10**, 4006–4016 (2020).
26. Cochain, C. & Zernecke, A. Protective and pathogenic roles of CD8(+) T cells in atherosclerosis. *Basic Res. Cardiol.* **111**, 71 (2016).
27. Rusinkevich, V. et al. Temporal dynamics of immune response following prolonged myocardial ischemia/reperfusion with and without cyclosporine A. *Acta Pharm. Sin.* **40**, 1168–1183 (2019).
28. Mracsko, E. et al. Antigen dependently activated cluster of differentiation 8-positive T cells cause perforin-mediated neurotoxicity in experimental stroke. *J. Neurosci.* **34**, 16784–16795 (2014).
29. Thomas, H. E., Trapani, J. A. & Kay, T. W. The role of perforin and granzymes in diabetes. *Cell Death Differ.* **17**, 577–585 (2010).
30. Zhang, L., Wang, Z., Wang, D., Zhu, J. & Wang, Y. CD8(+)-CD28(+) T cells might mediate injury of cardiomyocytes in acute myocardial infarction. *Mol. Immunol.* **101**, 74–79 (2018).
31. Cheng, Y. & Rong, J. Macrophage polarization as a therapeutic target in myocardial infarction. *Curr. Drug Targets* **19**, 651–662 (2018).
32. O'Rourke, S. A., Dunne, A. & Monaghan, M. G. The role of macrophages in the infarcted myocardium: orchestrators of ECM remodeling. *Front. Cardiovasc. Med.* **6**, 101 (2019).
33. Ilatovskaya, D. V. et al. CD8(+) T-cells negatively regulate inflammation post-myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **317**, H581–H596 (2019).
34. El-Brolosy, M. A. & Stainier, D. Y. R. Genetic compensation: a phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet.* **13**, e1006780 (2017).
35. Hornquist, E., Grdic, D., Mak, T. & Lycke, N. CD8-deficient mice exhibit augmented mucosal immune responses and intact adjuvant effects to cholera toxin. *Immunology* **87**, 220–229 (1996).
36. Lv, H. et al. Impaired thymic tolerance to alpha-myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **121**, 1561–1573 (2011).
37. Zouggari, Y. et al. B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nat. Med.* **19**, 1273–1280 (2013).
38. Bourgeois, C. & Stockinger, B. CD25+CD4+ regulatory T cells and memory T cells prevent lymphopenia-induced proliferation of naive T cells in transient states of lymphopenia. *J. Immunol.* **177**, 4558–4566 (2006).
39. Shioura, K. M., Geenen, D. L. & Goldspink, P. H. Assessment of cardiac function with the pressure-volume conductance system following myocardial infarction in mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H2870–H2877 (2007).
40. 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).
41. Giraud, A. et al. Gingival fibroblasts protect against experimental abdominal aortic aneurysm development and rupture through tissue inhibitor of metalloproteinase-1 production. *Cardiovasc. Res.* **113**, 1364–1375 (2017).
42. Simon, T. et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N. Engl. J. Med.* **360**, 363–375 (2009).
43. Puymirat, E. 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* **136**, 1908–1919 (2017).

Acknowledgements

This work was supported by Inserm, ANR (ANR-16-CE14-0016 to H.A.O., P.B., T.S., and J.-S.S.), la Fondation Lefoulon-Delalande (Y.S.Z.), Inserm Transfert (I.S.Z., A.B., B.G.,

and H.A.O.). We are indebted to Andrew Lichtman and Ralf Dressel for providing CMyc-mOva mice. We thank Carmen Marchiol and Gilles Renault (Plateforme Imageries du Vivant Institut Cochin – INSERM 1016) for their help in ultrasound evaluation of cardiac function. We are also indebted to the patients who accepted to participate and to all physicians who took care of them. We acknowledge the help of ICTA (Fontaine-lès-Dijon, France) and the clinical research team of Unité de Recherche Clinique de l'Est Parisien (URCEST, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris), Vincent Bataille, Ph.D. (ADIMEP, Toulouse) for data collection and data management. Our gratitude also to the French Society of Cardiology for sponsorship and to Elodie Drouet, M.Sc., who supervised patient follow-up.

Author contributions

I.S.Z., J.L., I.Z., M.V., R.C., M.E., J.B.S., C.H., C.D., J.S.H., C.C., P.B., V.D., Y.Z., M.B., A.B., and L.S. performed the experiments, acquired and interpreted the data. P.B. performed and interpreted the ultrasound studies. T.S. and N.D. were responsible for the FAST-MI cohort and interpreted the statistical data. J.V., E.D., J.C.S., H.B., and P.G. contributed to data acquisition and analysis. I.S.Z. performed the biomarkers measurements. M.C. performed the statistical analysis on the human data. P.B. analyzed and interpreted staining on human heart tissues. A.T., Z.M., and B.G. contributed to study design and data interpretation. A.T. and Z.M. reviewed the manuscript for important intellectual content. C.T. provided the CD8 mAb. I.S.Z., J.-S.S., and H.A.O. designed the experiments, analyzed and interpreted the data. J.-S.S. and H.A.O. wrote the manuscript.

Competing interests

H. Ait-Oufella applied a patent on the protective effect of CD8 depletion and Granzyme B blockade after acute myocardial infarction. The other authors declare no competing interests.

Additional information


Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21737-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to H.A.-O.

Peer review information *Nature Communications* thanks Daniela Cihakova and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021