



HAL
open science

Rôle de la clusterine à la phase aigüe de l'infarctus du myocarde

Louwana Allawa

► **To cite this version:**

Louwana Allawa. Rôle de la clusterine à la phase aigüe de l'infarctus du myocarde. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2022. Français. NNT : 2022ANGE0077 . tel-04813432

HAL Id: tel-04813432

<https://theses.hal.science/tel-04813432v1>

Submitted on 2 Dec 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.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : Physiologie, Physiopathologie, Biologie Systémique Médicale

Par

Louwana ALLAWA

Rôle de la clusterine à la phase aigüe de l'infarctus du myocarde

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 21 novembre 2022
Unité de recherche : MITOVASC UMR Inserm U1083 - CNRS 6015
Thèse N° : 211764

Rapporteurs avant soutenance :

Denis ANGOULVANT

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Université de Tours

François ROUBILLE

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
CHU de Montpellier

Composition du Jury :

Président :

Pascale JEANNIN

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
CRCI²NA Inserm U1307 – CNRS UMR 6075, Angers

Examineur :

Thomas BOCHATON

Praticien Hospitalier Universitaire
Université Claude Bernard Lyon 1

Directeur de thèse :

Fabrice PRUNIER

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
MITOVASC UMR Inserm U1083 - CNRS 6015, Angers

Co-encadrant de thèse : Sophie TAMAREILLE

Ingénieur d'Études
MITOVASC UMR Inserm U1083 - CNRS 6015, Angers

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussignée **ALLAWA Louwana**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiante le **03/10/2022**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.



« Un savant dans son laboratoire n'est pas seulement un technicien : c'est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées. Nous devons avoir un moyen pour communiquer ce sentiment à l'extérieur, nous ne devons pas laisser croire que tout progrès scientifique se réduit à des machines et des engrenages. »

Marie Curie

DEDICACE

Je dédie du profond de mon cœur ce travail de thèse à tous ceux qui me sont
chers,

À Papa, Abed

Je n'aurai pas pu accomplir cette importante tâche de ma vie sans toi. Merci pour ton affection et ton soutien sans jugement durant toutes les années de mes études. Merci pour tous les sacrifices que tu as fait pour moi. Papa, te rendre fier de ta fille a toujours été ma plus grande motivation dans la vie.

À Maman, Adriana

À qui m'a fait confiance et laissée choisir ma route, en m'encourageant, en me donnant la force pour que rien ne m'arrête et que je puisse m'accomplir. À qui m'a appris toujours que rien n'est impossible. Maman, si je suis arrivée à réaliser mon rêve, sache que c'est grâce à toi, à ta générosité, à ta tendresse, à ton amour inconditionnel et à tes prières. Tu es la meilleure maman qui peut exister sur terre.

À mes frères, {Mohamed, Majd & Jad}

Malgré la distance qui nous sépare, vous m'avez offert le soutien le plus remarquable, j'espère pouvoir le rendre un jour. Peu importe quand, peu importe comment, je sais que je pourrais toujours compter sur vous.

À ma petite sœur, Majdeline

Merci pour tous les moments de joie que tu m'apportes. Les appels vidéo étaient un des meilleurs remèdes aux mauvaises journées que j'ai passées. Merci d'être là.
Je t'aime fort.

À mon petit frère, Abed junior

Bien que tu aies grandi loin de moi, sache que je ne cesse de regarder tes photos et tes vidéos à chaque fois que mes parents me les envoient.

À toi mon Liban,

J'ai grandi dans l'espérance qu'un jour tu iras mieux.

D'ici là, je ne cesserai jamais de t'aimer.

REMERCIEMENTS

Pour commencer, parce qu'il existe un début à tout, je souhaite tout particulièrement remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur **Fabrice Prunier**, pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du laboratoire MITOVASC. Merci pour votre soutien et pour la confiance que vous m'avez accordée en acceptant d'encadrer ce travail ainsi que pour tous vos conseils qui ont permis de mener à bien ce travail de recherche.

J'adresse également mes vifs remerciements à ma co-encadrante de thèse, Madame le Docteur **Sophie Tamareille**, non seulement pour son investissement profond dans ce travail mais pour son encouragement continu, sa grande gentillesse et son bon esprit. Sophie, je te remercie vivement de m'avoir aidée à améliorer mes compétences et l'autonomie dans mon travail, et aussi pour toutes les discussions enrichissantes, ta patience, ton aide constante, ta disponibilité permanente, pour avoir consacré beaucoup de temps à relire et corriger maintes fois ce manuscrit. Plus personnellement, merci de m'avoir redonné confiance en moi et en mon projet quand j'étais un peu dans le noir. Je suis à jamais reconnaissante.

J'exprime ma gratitude et mon profond respect à Monsieur le Professeur **Denis Angoulvant**, ainsi qu'à Monsieur le Professeur **François Roubille** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Je tiens aussi à remercier Monsieur le Docteur **Thomas Bochaton** tout d'abord pour la collaboration faite dans ce travail de thèse et ensuite pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à Madame le Professeur **Pascale Jeannin** d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en tant que président du jury, après avoir suivi l'avancée de mes travaux de recherche durant mes années de thèse, en tant que membre de mon comité de suivi de thèse. Je vous remercie aussi pour la collaboration faite dans ce travail de thèse, ce fut un grand privilège de pouvoir bénéficier de votre expertise et de vos conseils.

Je souhaiterais aussi remercier Monsieur le Docteur **Daniel Henrion**, directeur de laboratoire MITOVASC, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour sa gentillesse et pour son soutien.

Je remercie également Monsieur le Professeur **Laurent Macchi** d'avoir accepté d'être membre de mon comité de suivi de thèse et ainsi d'avoir évalué mon travail au cours de mes années de thèse.

Je voudrais également remercier Monsieur le Docteur **Yves Delneste** pour ses conseils et ses remarques, toutes pertinentes durant toutes nos réunions.

Je n'oublie pas Madame le Docteur **Emilie Martinez** et Monsieur le Docteur **Jacques Noireaud**, qui m'ont fait découvrir le monde de la recherche lors de mon stage de 2 mois en Master 1 au laboratoire SOPAM (Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques). C'est grâce à vous que mon envie de travailler dans la recherche s'est concrétisée et j'éprouve une profonde gratitude envers vous, pour m'avoir laissé ma chance.

Je tiens à remercier Madame le Docteur **Céline Beauvilain** pour son aide précieuse et également pour nous avoir permis d'accéder au modèle de souris CLU.

Je remercie aussi sincèrement **Pascale Pignon** et **Simon Blanchard** de l'équipe 4 du laboratoire Inserm U1307 - CNRS UMR 6075 - CRCI²NA (Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Intégrée Nantes Angers) pour l'aide sur de nombreuses expériences et leur collaboration.

Je souhaite remercier également **Catherine Guillet** et **Jérôme Cayon** de la plateforme PACeM (Plateforme d'Analyse Cellulaire et Moléculaire) pour leur expertise et leurs conseils en cytométrie/Rt-qPCR.

Je tiens à remercier **Antoine Poirier** pour toute l'aide apportée dans les travaux de cette thèse lors de son stage de master 2. Un tout grand merci.

J'adresse mes remerciements à toutes les personnes de laboratoire MITOVASC qui ont contribué de près ou de loin à ces travaux de thèse : **Agnès, Anne-Laure, Louis, Linda, Hélène** et **Aglaé**, sans oublier les membres de SCAHU (Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire) qui prennent soin de nos souris.

Justine et **Lucie**, je voulais dire que c'était très agréable de travailler avec vous ! Merci pour votre participation à mes travaux de thèse, pour votre gentillesse. Merci pour tout le temps que vous m'avez accordé, qui parfois, retarde vos expérimentations. Je suis très reconnaissante.

Je tiens tout particulièrement à remercier toutes celles et ceux qui ont fait de cette expérience une expérience joyeuse, mes amis de toujours : **Samar, Rima, Ahmad, Jacinthe, Charbel, Mirvana, Hajar, Asmaa** et **Joudy**.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES.....	I
LISTE DES TABLEAUX.....	II
LISTE DES ABREVIATIONS.....	III
INTRODUCTION.....	1
Chapitre 1 : Infarctus du myocarde et cardioprotection.....	2
I. Infarctus du myocarde.....	3
A. Prise en charge.....	4
B. Lésions d'ischémie-reperfusion au décours de l'IDM.....	5
1. La surcharge calcique.....	8
2. Le stress oxydant.....	9
3. L'inflammation.....	10
4. L'ouverture du mPTP.....	10
5. La mort cellulaire.....	11
II. Les stratégies de cardioprotection.....	17
A. Cardioprotection mécanique par le conditionnement ischémique local.....	20
B. Cardioprotection mécanique par conditionnement ischémique à distance.....	20
C. Cardioprotection pharmacologique.....	21
D. A la recherche de nouvelles cibles pour la cardioprotection.....	22
Chapitre 2 : Réponse inflammatoire au cours de l'infarctus du myocarde.....	24
I. Initiation de la réponse inflammatoire par les DAMPs.....	26
A. Les signaux de dangers endogènes ou DAMPs.....	27
1. HMGB1.....	28
2. ATP extracellulaire.....	29
3. ADN mitochondrial.....	29
4. Protéines de choc thermique.....	30
5. Fibronectine.....	32
6. ARN extracellulaire.....	33
7. Histones extracellulaires.....	34
B. Les récepteurs de signaux de dangers endogènes ou PRRs.....	36

1.	Les TLRs	37
2.	Le récepteur RAGE	40
3.	Les récepteurs de type NOD	41
4.	Les récepteurs purinergiques P2X ₇	43
5.	Les pentraxines	44
C.	Le facteur de transcription nucléaire κB (NF-κB).....	47
II.	Effecteurs cellulaires de la réponse inflammatoire	48
A.	Les neutrophiles	49
B.	Les monocytes et les macrophages	50
C.	Les fibroblastes cardiaques	52
D.	Les lymphocytes	52
III.	Cytokines pro-inflammatoires	54
A.	TNF-α	55
B.	IL-1	55
C.	IL-6	56
Chapitre 3 : La clusterine		57
I.	Synthèse et structure de la clusterine	58
II.	Expression, demi-vie et régulation de la clusterine	63
III.	Fonctions physiologiques de la clusterine	64
A.	La reproduction	64
B.	Le transport de lipides	65
C.	La clusterine entre apoptose et survie	66
D.	L'inhibition du complexe d'attaque membranaire du système du complément	70
E.	La clusterine : une protéine chaperonne extracellulaire.....	70
IV.	La clusterine dans des situations physiopathologiques	73
A.	Maladies neuro dégénératives	73
B.	Cancer	74
C.	Maladies cardiovasculaires.....	75
D.	Pathologies ischémiques	76
BUT DU TRAVAIL		78
MATERIELS ET METHODES		81
I.	Modèle in vitro d'hypoxie-réoxygénation	82
A.	Lignée cellulaire H9C2	82
B.	Modèle d'hypoxie-réoxygénation	82
C.	Quantification de la mortalité cellulaire.....	84

II.	Modèle <i>in vivo</i> d'ischémie-reperfusion	85
A.	Souris	85
B.	Modèle d'ischémie-reperfusion myocardique	85
C.	Quantification de la taille de l'infarctus	86
III.	Etude clinique	87
A.	Cohorte HIBISCUS-STEMI.....	87
B.	Donneurs sains	88
IV.	Méthodes d'analyses	88
A.	Analyse de l'expression des protéines par western Blot.....	88
1.	Extraction et dosage des protéines	88
2.	Western Blot	89
B.	Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR.....	90
1.	Extraction et dosage des ARN	90
2.	Transcription inverse et PCR quantitative.....	91
C.	Dosage immunologique.....	92
1.	Dosage de clusterine	92
2.	Dosage de nucléosomes.....	93
3.	Dosage du complexe clusterine-histones.....	93
V.	Analyses statistiques des résultats	93
RESULTATS ET DISCUSSION		95
Introduction		96
Résultats		98
Discussion		132
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES		134
CONCLUSION		141
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		143
ANNEXES		193

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : SCHEMA D'IDM MONTRANT UN CŒUR AVEC DES LESIONS TISSULAIRES DUES A UNE ARTERE OBSTRUEE	3
FIGURE 2: PROGRESSION DE LA NECROSE MYOCARDIQUE « WFP »	5
FIGURE 3: CINETIQUE D'EXTENSION DE L'IDM	7
FIGURE 4 : LES DIFFERENTES MEDIEURS A L'ORIGINE DES LESIONS D'I/R DANS L'IDM AIGU	8
FIGURE 5 : CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DE LA NECROSE	11
FIGURE 6 : CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DE L'APOPTOSE	12
FIGURE 7: MECANISMES UNIVERSELS DE LA LIBERATION DE DAMPs	16
FIGURE 8 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUES DANS LA CARDIOPROTECTION	18
FIGURE 9 : DIFFERENTES STRATEGIES DE CARDIOPROTECTION	19
FIGURE 10 : LES PHASES DE LA REPOSE INFLAMMATOIRE EN REPOSE A L'I/R MYOCARDIQUE	25
FIGURE 11 : SCHEMA RESUMANT L'INFLAMMATION MEDIEE PAR DAMP/PRR APRES UN IDM	26
FIGURE 12 : STRUCTURE DES HISTONES ET ASSEMBLAGE DES NUCLEOSOMES	35
FIGURE 13 : VOIES DE SIGNALISATION SIMPLIFIEES DES TLRs	38
FIGURE 14 : STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DE L'INFLAMMASOME NLRP3	43
FIGURE 15 : ÉVOLUTION TEMPORELLE DE L'INFILTRATION INFLAMMATOIRE AU SEIN DU MYOCARDE APRES L'IDM	54
FIGURE 16 : CLU : GENE ET TRANSCRITS	59
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DE LA CLU HUMAINE	61
FIGURE 18 : BIOGENESE DE LA CLU	62
FIGURE 19 : LA CLU ENTRE APOPTOSE ET SURVIE	69
FIGURE 20 : ROLES DES CHAPERONS EXTRACELLULAIRES DANS LA PROTEOSTASE	72
FIGURE 21 : PARTIES DE TRAVAIL DE LA THESE	80
FIGURE 22 : CHAMBRE A HYPOXIE	83
FIGURE 23 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL IN VITRO D'HYPOXIE/REOXYGENATION	84
FIGURE 24 : EVALUATION DE TAILLE DE L'INFARCTUS PAR PLANIMETRIE APRES LA SEQUENCE D' I/R	87

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : AGENTS PHARMACOLOGIQUES INFLAMMATOIRES EVALUES CHEZ L'HOMME DANS LE CONTEXTE DE L'IDM	23
TABLEAU 2 : PRINCIPAUX DAMPs ET LES RECEPTEURS IMPLIQUES DANS LEUR RECONNAISSANCE.	36
TABLEAU 3 : LISTE DES PRINCIPALES PROTEINES HOMOLOGUES A LA CLU.	57
TABLEAU 4 : ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES EN WESTERN BLOT.	90
TABLEAU 5 : LISTE DES AMORCES UTILISES POUR LA PCR QUANTITATIVE.	92

LISTE DES ABREVIATIONS

a.a. : Acides aminés

AAR : Aire à risque

ADNmt : ADN mitochondrial

AIF : Apoptosis-inducing factor

Akt : Protéine kinase B

AN : Aire nécrosée

AP-1 : Activator protein 1

AP-2 : Activator protein-2

APAF-1 : Apoptotic protease activationg factor 1

ApoER2 : Apolipoprotein E receptor 2

apoJ : Apolipoprotéine J

AREs : Androgen response elements

ARNex : ARN extracellulaires

ASAP : Alternative Splicing Annotation Project

ASC : Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain

ATP : Adénosine triphosphate

AVC : Accident vasculaire cérébral

A β : Peptide β -amyloïde

BID : BH3 interacting domain death agonist

CAM : Complexe d'attaque membranaire

CCL7 : C-C motif chemokine ligand 7

CD8 : Lymphocytes T cytotoxiques

cDAMPs : Constitutive DAMPs

CLI : Complement lysis inhibitor

CLU : Clusterine

CO₂ : Dioxyde de carbone

COMMD1 : Copper metabolism (Murr1) domain containing 1

CREs Cyclic-AMP response éléments

CRP : C-reactive protein

DAMPs : Damage associated molecular pattern

EGCG : Gallate épigallocatechine

eNOS : Monoxyde d'azote synthase endothéliale

ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinases

FADD : Fas-associated death domain protein

FasL : Fas ligand

FN : Fibronectine

FN-EDA: Fibronectine extra domaine A

GBD : Global burden of disease

GGA : Géranylgéranylacétone

G_{i/q} : Protéines G inhibitrices

GPX4 : Glutathione peroxydase de type 4

G_s : Protéines G stimulatrices

GSDMD : Gasdermine D

GSH : Glutathion

GSK-3β : Glycogene synthase kinase 3 β

H/R : hypoxie-réoxygénation

HDL : High density lipoprotein

HIBISCUS-STEMI : Cohort of patients to identify biological and imaging markers of cardiovascular outcomes in ST elevation myocardial infarction

HMG : High mobility group

HMGB : High mobility group box

HSF1 : Heat shock factor 1

HSPs : Heat shock proteins

I/R : Ischémie-reperfusion

ICAMs : Intracellular adhesion molecules

iCLU : Formes intracellulaires de CLU

iDAMPs : inducible DAMPs

IDM : Infarctus du myocarde

I κ B- α : Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha

IKK : I κ B kinase

IL-1 : Interleukine-1

IP : Iodure de propidium

JAK: Janus kinase

LDL : Low density lipoprotein

MA : Maladie d'Alzheimer

mK_{ATP} : Canaux potassiques ATP dépendants

MKKs : MAP kinases

MLKL : Mixed-lineage kinase domain-like 52 pseudokinase

MMPs : Matrix metalloproteinases

mPTP : Pore de transition de perméabilité mitochondrial

mTOR : Mammalian target of rapamycin

MyD88 : Myeloid differentiation primary response protein 88

N₂ : Azote

nCLU : Forme nucléaire de CLU

NETs : Neutrophil extracellular traps

NF-κB : Nuclear factor-kappa B

NK : Natural killer

NLR : Nucleotide oligomerization domain receptors

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NO : Monoxyde d'azote

O₂ : Oxygène

PAD4 : Peptidyl arginine déiminase 4

PAMPs : Pathogen associated molecular patterns

PI3K : Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate 3-kinase

PKA : protéine kinase A

PKC : protéine kinase C

PKG : protéine kinase G

PMNs : Leucocytes polymorphonucléaires

PostC : Postconditionnement ischémique

PPADS : Pyridoxalphosphate-6'-azophényl-2',4'-disulfonate

PréC : Préconditionnement ischémique

PRRs : Pattern recognition receptors

PTX3 : Pentraxine-3

RAGE : Receptor for advanced glycation end-products

RE : Réticulum endoplasmique

RIC : Conditionnement ischémique à distance

RIPK1 : Receptor interacting protein kinase 1

RIPK3 : Receptor interacting protein kinase 3

RISK : Reperfusion injury salvage kinase

ROS : Reactive oxygen species

RSL3 : RAS-selective lethal 3

SAFE : Survivor activating factor enhancement

SAP : Serum amyloid P-component

shARN : ARN en épingle à cheveux

siRNA : Small interfering RNA

SNP : Single nucleotide polymorphisms

SP-1 : Specificity protein-1

SPAM1 : Sperm adhesion molecule 1

STAT : Transducteur de signal et activateur de transcription

Système x_c^- : Système d'échange cystine/glutamate

TGF- β : Transforming growth factor β

TIRAP : TIR domain containing adaptator protein

TLRs : Récepteurs Toll-like

TNFR1 : Tumor necrosis receptor 1

TNFR2 : Tumor necrosis receptor 2

TNF- α : Tumor necrosis factor α

TRAM : TRIF-related adaptator molecule

Treg : Lymphocytes T régulateurs

TRIF : TIR-domain-containing adaptator inducing interferon beta

TTC : Chlorure de Triphényltétrazolium

UTR : Untranslated transcribed region

VCAM1 : Vascular cell adhesion molecule-1

VLDLR : Very low density lipoprotein receptor

WFP : Wavefront phenomenon

$\Delta\psi_m$: Potentiel de membrane mitochondriale

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Infarctus du myocarde et cardioprotection

Les pathologies ischémiques myocardiques sont une des principales causes de mortalité dans les pays industrialisés. Malgré les stratégies de la reperfusion coronarienne interventionnelle, la morbidité et la mortalité après un infarctus du myocarde (IDM) reste encore importante. La taille de l'IDM est un déterminant majeur du pronostic chez ces patients. Ainsi, les stratégies de cardioprotection visent à réduire la taille de l'infarctus. Cependant, un écart troublant existe entre les nombreuses études précliniques présentant une réduction de la taille de l'infarctus avec des interventions pharmacologiques et la faible translation en de meilleurs résultats cliniques chez les patients.

Pour cela, le principal objectif des axes de recherche au sein de notre équipe est d'étudier, à l'aide d'approches expérimentales et cliniques, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les lésions d'ischémie-reperfusion (I/R) cardiaques afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer la récupération fonctionnelle cardiaque, la qualité et la durée de vie après la survenue d'un IDM.

I. Infarctus du myocarde

Les maladies cardiovasculaires restent la première cause de mortalité dans le monde (« Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017 », 2018; Qureshi et al., 2012). Selon un rapport présenté en 2017 par l'étude « charge mondiale de la morbidité » (GBD, *global burden of disease*), ces maladies étaient responsables de 31,8 % de tous les décès dans le monde et au moins la moitié de tous les décès cardiovasculaires ont été causés par des cardiopathies ischémiques (« Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017 », 2018). Une des manifestations aiguës des cardiopathies ischémiques est « l'IDM ». L'IDM se définit comme une mort massive des cellules myocardiques à la suite d'une ischémie prolongée. L'ischémie correspond à une inadéquation entre l'apport d'oxygène (O₂) et de nutriments et les besoins énergétiques du cœur, liée ou non à une athéro-thrombose aiguë. Selon la quatrième définition universelle de l'IDM en 2018, l'IDM se définit par l'équation suivante : IDM = lésion myocardique aiguë (représentée par l'élévation de la troponine cardiaque) + clinique évocatrice d'une ischémie myocardique aiguë (représentée par : symptômes d'ischémie myocardique aiguë, modifications dynamiques de l'électrocardiogramme (ECG) ou apparition d'ondes Q pathologiques, apparition d'une anomalie de cinétique segmentaire ou de viabilité myocardique à l'imagerie, identification d'un thrombus coronaire spécifiquement pour l'IDM de type 1 (Figure1)) (Thygesen et al., 2018).

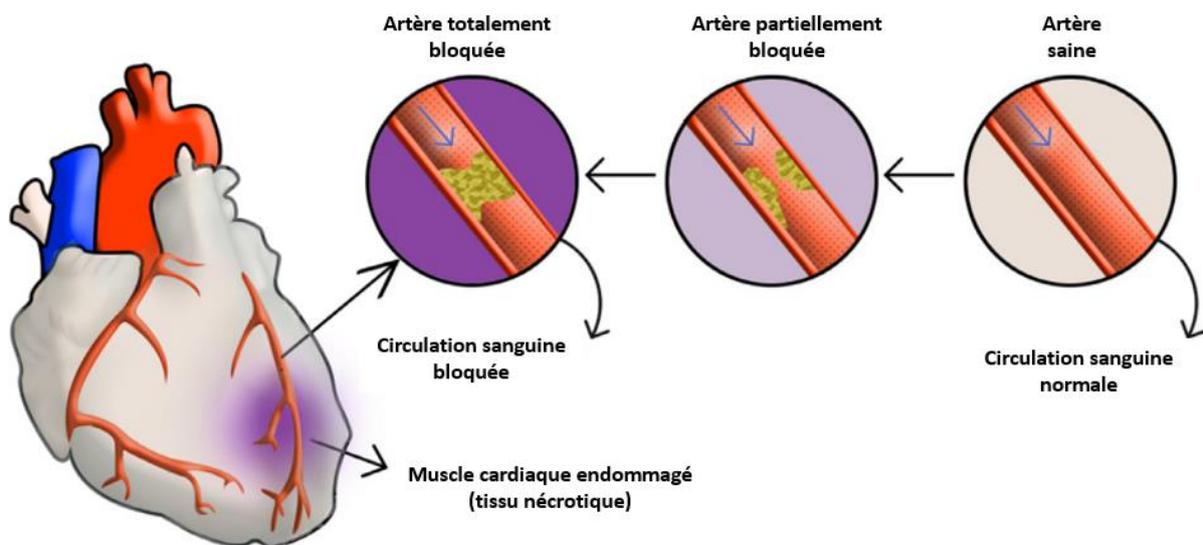


Figure 1 : Schéma d'IDM montrant un cœur avec des lésions tissulaires dues à une artère obstruée. Modifié d'après (Reyes-Retana & Duque-Ossa, 2021).

Plusieurs facteurs peuvent influencer la taille de l'infarctus. Parmi ces facteurs on retrouve :

- 1) la taille de l'aire à risque (AAR) qui correspond à la surface myocardique normalement vascularisée par l'artère coronaire occluse,
- 2) la durée de l'occlusion coronaire. Il a été montré qu'une ischémie de plus de 30 minutes provoque des lésions irréversibles chez le porc et l'homme (Spinale et al., 1989),
- 3) l'importance de la circulation collatérale, qui correspond au débit sanguin existant dans le territoire myocardique ischémique après l'occlusion coronaire. Il est généralement admis que la taille de l'infarctus est maximale au-delà de 12 heures d'occlusion coronaire totale. Néanmoins, ce dogme se doit être nuancé en fonction de l'existence éventuelle d'une collatéralité et de son importance et certaines publications font état de bénéfices cliniques quand la reperfusion est obtenue même au-delà de 12 premières heures (Schaper et al., 1988; Schömig et al., 2005),
- 4) la température. Il a été montré expérimentalement que chaque diminution de la température de 1°C induit une diminution d'environ 10% de la taille de l'infarctus (Chien et al., 1994). (Benhabbouche et al., 2011).

A. Prise en charge

Pendant l'ischémie, des lésions cellulaires irréversibles appelés « lésions ischémiques » aboutissent à la mort des cardiomyocytes de la zone AAR du manière temps-dépendante selon une onde de progression, nommée « *wavefront phenomenon* » (WFP), allant de la région sous-endocardique vers l'épicarde (Reimer & Jennings, 1979) (Figure 2). La restauration du flux sanguin le plus précocement possible est donc nécessaire afin de sauver le myocarde. En 1972, Ginks et al. ont montré pour la première fois que la reperfusion limite l'extension de la taille d'infarctus après 3 heures d'occlusion coronaire chez le chien (Ginks et al., 1972).

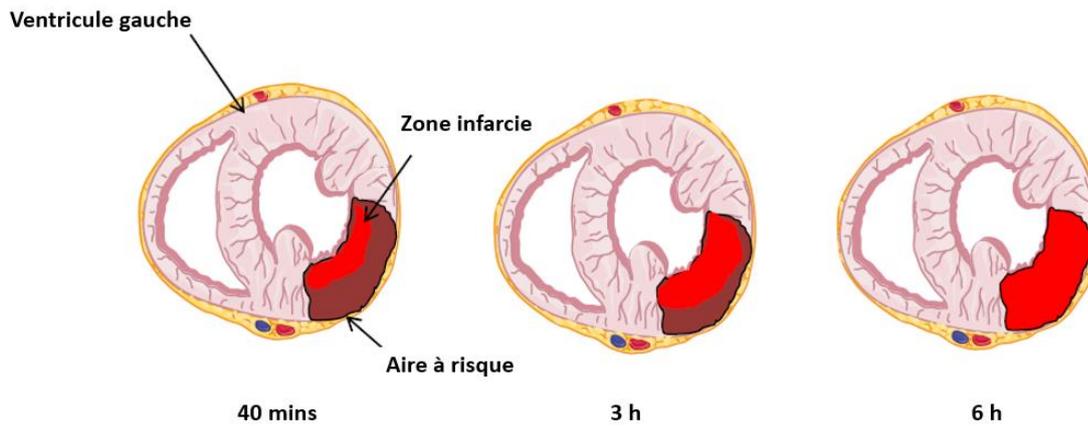


Figure 2: Progression de la nécrose myocardique « WFP ». La nécrose myocardique se prolonge et évolue progressivement du territoire sous endocardique vers l'épicarde proportionnellement à la durée de l'occlusion artérielle. Au bout de plusieurs heures, la nécrose occupe la totalité de la zone à risque. Modifié d'après (Frangogiannis, 2015).

Durant les dernières décennies, la prise en charge de l'IDM a évolué vers le développement de différentes techniques afin d'assurer la restauration du flux sanguin au sein du myocarde ischémique. La stratégie thérapeutique est de revasculariser le myocarde le plus précocement possible c'est-à-dire réduire le temps d'ischémie afin de préserver les fonctions cardiaques à la reperfusion et d'assurer la survie des patients. La restauration du flux artériel peut être réalisée soit par des moyens pharmacologiques avec la thrombolyse soit par des moyens mécaniques avec une coronographie suivie d'une angioplastie. Le choix de la stratégie de reperfusion est guidé par le délai avant la désobstruction de l'artère, d'une manière que lorsque le délai entre les premiers symptômes et la reperfusion est de moins de 120 minutes alors l'angioplastie est privilégiée. Dans le cas contraire (un délai > 120 minutes), la thrombolyse intraveineuse sera réalisée (Braik et al., 2018). Cependant, il est à noter que la thrombolyse présente une efficacité moindre par rapport à l'angioplastie coronaire (Medkour et al., s. d.2001).

B. Lésions d'ischémie-reperfusion au décours de l'IDM

Paradoxalement, la reperfusion, bien que salvatrice, entraîne elle-même la survenue d'autres lésions myocardiques que l'on appelle « lésions de reperfusion ». En effet, l'ensemble des lésions ischémiques et des lésions de reperfusion forment les lésions d'I/R et la taille d'infarctus finale sera définie par l'ensemble de ces lésions (Yellon & Hausenloy, 2007) (Figure 3).

Couramment, on considère les lésions dues à l'I/R comme une entité composite car la reperfusion ne peut jamais se produire indépendamment de l'ischémie.

Les lésions d'I/R vont se manifester dès les premières minutes de la reperfusion en entraînant plusieurs manifestations cardiaques défavorables et en influençant le pronostic du patient. Ces lésions se présentent sous quatre formes différentes :

- 1) les arythmies de reperfusion, qui apparaissent dès les premières minutes de la reperfusion et qui sont de gravité plus ou moins sévère, allant de simples extrasystoles au déclenchement de fibrillations ventriculaires irréversibles (Manning & Hearse, 1984),
- 2) la dysfonction contractile ventriculaire ou la sidération myocardique qui est un phénomène totalement réversible, a été décrite pour la première fois par Heyndrickx et al. (Heyndrickx et al., 1975) mais n'a été dénommée « sidération » qu'en 1982 (Braunwald & Kloner, 1982),
- 3) les dommages vasculaires de reperfusion ou phénomène de « *no-reflow* » qui se définissent par l'absence de reperfusion myocardique post-ischémique survenant malgré la désobstruction de l'artère coronaire responsable de l'ischémie. Cette obstruction peut s'expliquer en termes de dommages « anatomiques » ou « structuraux » par la présence d'un œdème cellulaire comprimant les micro-vaisseaux Ce phénomène a été décrit pour la première en 1966 par Krug et al. (Krug et al., 1966).
- 4) la mort cellulaire impliquée par ce phénomène qui est un déterminante directe de la zone infarctée (Yellon & Hausenloy, 2007).

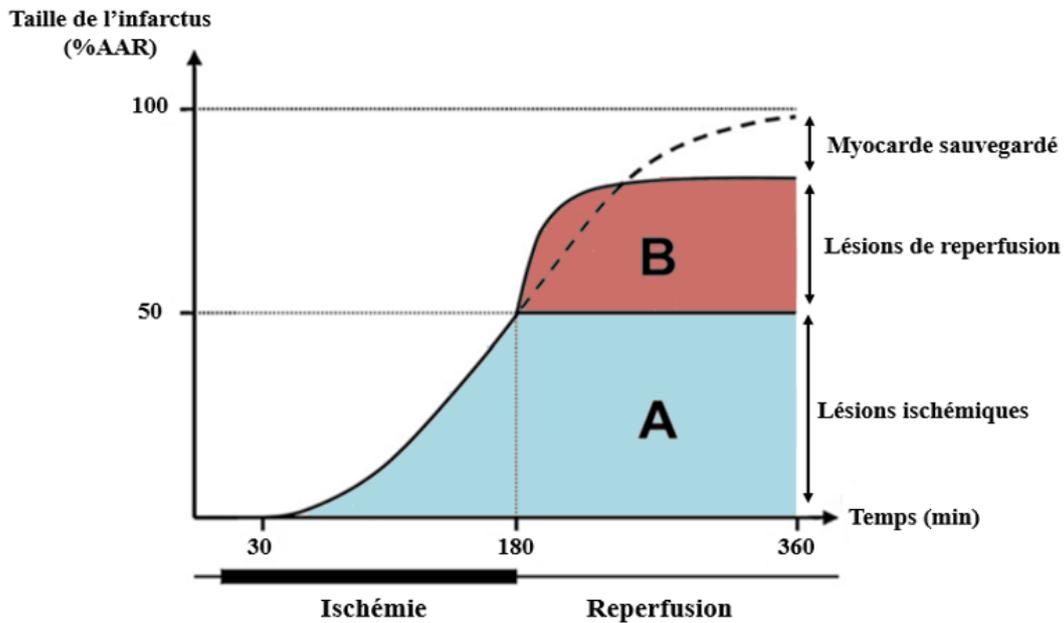


Figure 3: Cinétique d'extension de l'IDM. Pendant l'ischémie et après une certaine durée, une partie des cardiomyocytes vont subir des lésions cellulaires irréversibles (zone A). Si cette ischémie n'est pas stoppée, la taille de l'infarctus va atteindre jusqu'à 100% de l'AAR (courbe pointillée). La reperfusion permet de sauver le myocarde ischémique en limitant ces lésions et aussi l'extension de l'infarctus, mais elle peut paradoxalement engendrer elle-même des lésions myocardiques, les lésions de reperfusion (zone B) qui s'ajoutent à la taille d'infarctus finale. Modifié d'après (Cour & Argaud, 2010).

A l'échelle cellulaire, les mécanismes contribuant aux lésions d'I/R sont multifactoriels. La **surcharge calcique** et le **stress oxydant** jouent un rôle majeur, aboutissant à **l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP)**, un méga pore situé dans la membrane interne de la mitochondrie. L'ouverture de ce dernier permet de libérer plusieurs molécules dont le cytochrome c et la protéine AIF (*apoptosis-inducing factor*), des agents pro-apoptotiques qui activent les caspases, aboutissant finalement à la **mort cellulaire** (figure 4).

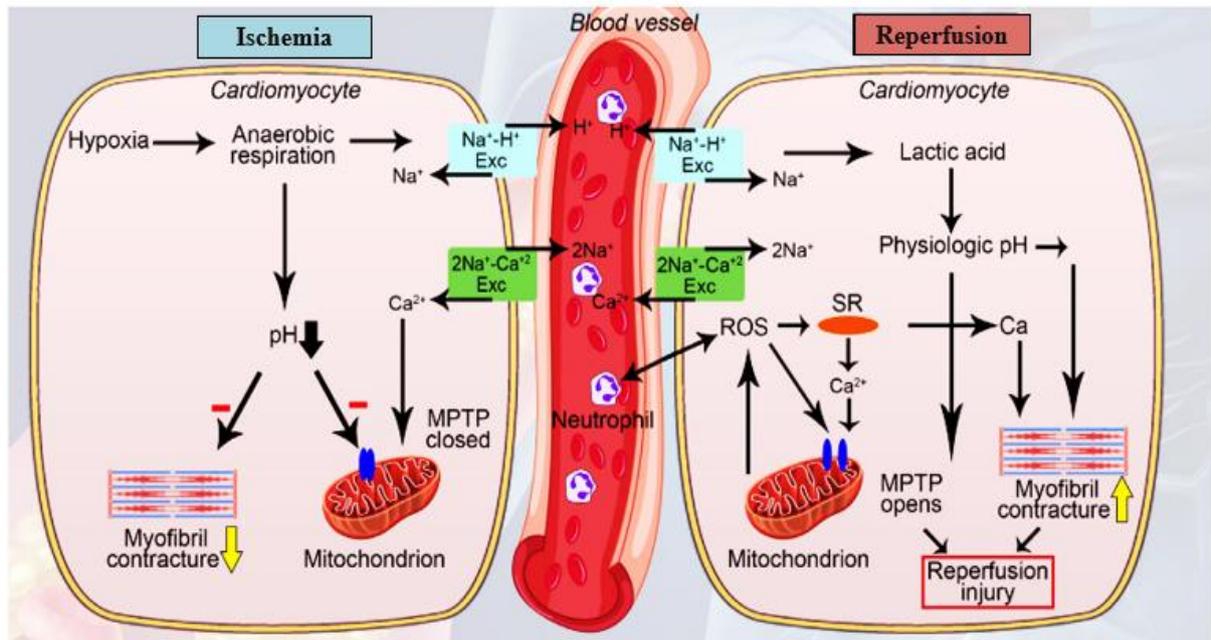


Figure 4 : Les différents médiateurs à l'origine des lésions d'I/R dans l'IDM aigu. Durant l'ischémie myocardique aiguë, l'absence d'O₂ et de nutriments fait passer le cardiomyocyte dans un état respiratoire anaérobie produisant ainsi du lactate ce qui induit la baisse du pH (qui elle-même inhibe l'ouverture du mPTP). Cette modification du métabolisme cellulaire entraîne à son tour une surcharge intracellulaire en sodium et en calcium. Durant la reperfusion myocardique aiguë, la réintroduction brutale de l'O₂ et de nutriments permet une ré-énergisation mitochondriale conduisant à une surcharge supplémentaire en calcium mitochondrial et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, reactive oxygen species) ce qui, avec la correction rapide du pH, aboutit à l'ouverture du mPTP, l'hypercontracture, un état inflammatoire aigu et la mort cellulaire. Modifié d'après (Gunata & Parlakpınar, 2021).

1. La surcharge calcique

Durant l'ischémie, la privation d'O₂ et de nutriments entraîne une modification du métabolisme énergétique des cardiomyocytes. La principale source de la production d'adénosine triphosphate (ATP) dans les cellules devient la glycolyse anaérobie au lieu de la phosphorylation oxydative, aboutissant à un rendement énergétique d'ATP plus faible [2 ATP par molécule de glucose pour la glycolyse anaérobie versus 36 ATP par molécule de glucose pour la glycolyse aérobie] et par conséquent une diminution de l'activité contractile du myocarde. La conversion du pyruvate en lactate par le lactate déshydrogénase, liée à la glycolyse anaérobie, entraîne une surcharge intracellulaire en ions H⁺ ce qui diminue le pH intracellulaire. L'acidose induite ou l'accumulation des protons H⁺ intracellulaires entraîne un dysfonctionnement des échangeurs Na⁺/H⁺, Na⁺/K⁺ ATPase et Na⁺/Ca²⁺ instaurant un état de

surcharge intracellulaire en sodium et en calcium. L'accumulation du calcium dans le cytosol entraîne des lésions au niveau de protéines contractiles ce qui a pour conséquence une contracture ischémique. De plus, l'acidose intracellulaire inactive la glycolyse anaérobie et ralentit l'élimination des déchets métaboliques. L'accumulation de ces produits terminaux de différentes voies métaboliques aboutit à la désorganisation du cytosquelette et à un gonflement cellulaire. Durant la reperfusion, la restauration rapide du pH grâce aux échangeurs Na^+/H^+ et $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ conduit à la surcharge en calcium cytosolique mais aussi intra mitochondrial entraînant des lésions membranaires et un dysfonctionnement contractile.

Les lésions d'I/R sont en partie secondaires à l'hypercalcémie intracytoplasmique. Tout d'abord, l'hypercalcémie induit l'ouverture du mPTP conduisant à la mort cellulaire majoritairement par apoptose. Une deuxième cible de l'excès de Ca^{2+} est l'activation des calpaines, enzymes provoquant une protéolyse intracellulaire ce qui conduit à la dégradation du cytosquelette, du réticulum endoplasmique (RE) et des protéines mitochondriales aboutissant enfin à la mort cellulaire. La troisième cible de l'hypercalcémie est l'activation des précurseurs de l'inflammation ce qui aggrave encore les lésions d'I/R.

2. Le stress oxydant

Le stress oxydant joue un rôle majeur dans les lésions d'I/R. Durant la reperfusion, l' O_2 est réintroduit brutalement et en grande quantité au niveau des cellules qui en étaient dépourvues durant l'ischémie. La chaîne respiratoire mitochondriale ne peut pas utiliser efficacement cette quantité brutale d' O_2 et de substrats. Elle synthétise des espèces réactives de l'oxygène (ROS, *reactive oxygen species*) au lieu de synthétiser de l'ATP. En effet, l'excès de calcium, due à une correction rapide du pH induisant une surcharge sodique via l'échangeur Na^+/H^+ qui secondairement provoque une surcharge calcique via l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, induit l'activation de nombreuses enzymes conduisant directement ou indirectement à la production de ROS. Cet excès de ROS va dépasser les capacités de défense antioxydante de la cellule entraînant des effets délétères pour le fonctionnement cellulaire et un état de stress oxydatif provoquant la peroxydation des lipides et des protéines membranaires à l'origine de dommages membranaires touchant le RE et les mitochondries.

3. L'inflammation

En plus des dérégulations ioniques et métaboliques survenues lors de la reperfusion, la libération de nombreuses molécules endogènes dans le microenvironnement tissulaire tels que les ROS et les signaux de danger endogènes induit une réponse inflammatoire stérile qui exacerbe les lésions de reperfusion. Elle se compose de deux phases : la phase inflammatoire en elle-même caractérisée par le recrutement leucocytaire au sein de la lésion suivie de la phase de résolution de cette réponse caractérisée par des mécanismes de réparation tissulaires. La densité des neutrophiles qui ont migré sur le site de la lésion détermine notamment l'intensité de la phase inflammatoire. Les neutrophiles migrent vers le myocarde infarci dès les 6 premières heures après la reperfusion. Par la suite, les monocytes et les macrophages dominent l'infiltration tissulaire et la libération des médiateurs inflammatoires, de ROS et d'enzymes protéolytiques. Cette partie sera détaillée dans le chapitre suivant « Réponse inflammatoire au cours de l'infarctus du myocarde ».

4. L'ouverture du mPTP

Le mPTP a été décrit pour la première fois par Hunter et Haworth en 1979 (Haworth & Hunter, 1979). Il s'agit d'un méga canal non sélectif situé au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Le mPTP est fermé en conditions normales, et s'ouvre lors d'une souffrance intense de la mitochondrie. L'ouverture de ce canal entraîne un gonflement de la mitochondrie, la dissipation du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\psi_m$) induisant l'inhibition de la production d'ATP et même l'hydrolyse de l'ATP [puisque l'ATP synthase mitochondriale se met à fonctionner en sens inverse et dégrade l'ATP de la cellule], et le relargage de produits matriciels et intermembranaires mitochondriaux pour finir par la mort cellulaire. Au cours de l'ischémie myocardique, le mPTP est fermé. Cependant il s'ouvre lors de la reperfusion en réponse à la surcharge calcique mitochondriale, la production excessive de ROS et la correction de l'acidose intracellulaire. Le gonflement de la matrice mitochondriale peut aller jusqu'à la rupture de la membrane mitochondriale externe, et non pas la membrane interne due à sa structure en crêtes, aboutissant à la libération du cytochrome c et donc la mort cellulaire par apoptose. D'autre part, la perturbation du métabolisme et de l'homéostasie ionique [si un nombre important de mitochondries ouvrent leurs mPTP] induit la mort par nécrose.

5. La mort cellulaire

L'IDM est traditionnellement considéré comme une manifestation de la mort cellulaire nécrotique, mais récemment différentes formes de mort des cardiomyocytes ont été identifiées pendant l'I/R et il est proposé qu'elles contribuent à la taille finale de l'infarctus (Del Re et al., 2019; Ibáñez et al., 2015).

La nécrose

La nécrose est considérée comme un processus passif, non régulé et incontrôlable. Elle se caractérise par des changements morphologiques distincts, y compris un gonflement cellulaire et des organites [dû à la perte précoce du métabolisme énergétique nécessaire au maintien de l'homéostasie ionique], un dysfonctionnement mitochondrial, l'absence de fragmentation du noyau et une rupture de la membrane plasmique induisant le relargage du contenu intracellulaire ce qui engendre une réponse inflammatoire (Gong et al., 2020) (Figure 5). En absence de reperfusion, la nécrose se développe rapidement en raison d'un manque d'énergie ; sans O₂ et sans glucose, la phosphorylation oxydative s'arrête et les cellules ne peuvent pas générer l'ATP nécessaire pour alimenter les pompes ioniques qui maintiennent les gradients ioniques à travers la membrane plasmique. Par conséquent, le sodium et le calcium s'accumulent dans le cytoplasme et ce qui provoque un gonflement, la dégénérescence des organites, la perte de l'intégrité membranaire et la dissolution de la cellule (Iadecola & Anrather, 2011; Nieminen, 2003).

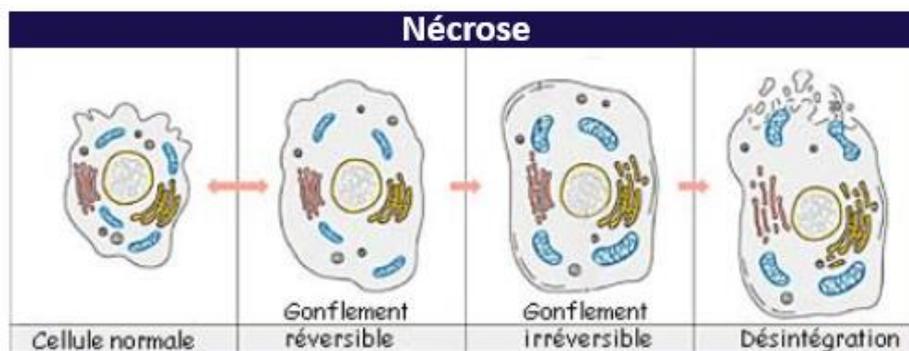


Figure 5 : Caractérisation morphologique de la nécrose. (Capsule outil: L'apoptose, ou la mort cellulaire programmée, s. d.; Kroemer et al., 2007).

Une des voies mise en jeu dans le phénomène de nécrose impliquerait l'ouverture du mPTP situé dans la membrane interne de la mitochondrie. Il a également été montré que la stimulation des récepteurs de mort en présence d'inhibiteurs de caspase pouvait provoquer une mort cellulaire par nécrose (Holler et al., 2000; Matsumura et al., 2000).

L'apoptose

L'apoptose est définie comme un processus de mort cellulaire physiologiquement « programmée » (Kerr et al., 1972), dans lequel l'activation finale des protéases à cystéine de la famille des caspases provoque la mort cellulaire. Ce sont les travaux de Gottlieb et al. en 1994 qui ont montré l'existence de l'apoptose dans les cardiomyocytes suite à une séquence d'I/R (Gottlieb et al., 1994) après avoir pensé depuis longtemps que la mort cellulaire était exclusivement nécrotique dans le cœur infarci. D'un point morphologique, les cellules apoptotiques se caractérisent par : un rétrécissement cellulaire sans relargage de matériel intracellulaire, un cytoplasme dense, des organelles plus denses et une condensation de la chromatine suivie de la fragmentation du noyau. Les cellules bourgeonnent sous forme de corps apoptotiques qui seront phagocytés ultérieurement (Figure 6).

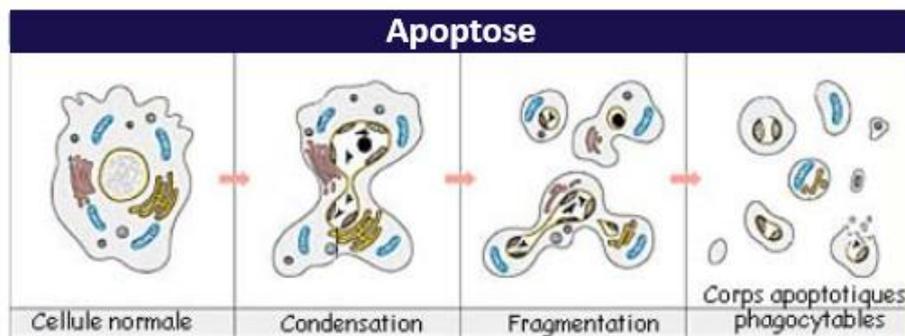


Figure 6 : Caractérisation morphologique de l'apoptose. (Capsule outil: L'apoptose, ou la mort cellulaire programmée, s. d.; Kerr et al., 1972)

On décrit généralement deux voies de mort par apoptose, la voie extrinsèque et la voie intrinsèque, aboutissant toutes les deux à l'activation des caspases dont l'activité protéolytique conduit à la digestion des protéines structurelles du cytoplasme et à la dégradation de l'ADN nucléaire.

La voie extrinsèque de l'apoptose, également connue sous le nom de « voie des récepteurs de mort cellulaire », est une voie médiée par la fixation des ligands tel que TNF- α (*tumor necrosis factor α*) et FasL (*fas ligand*) sur des récepteurs spécifiques exprimés à la surface des membranes. Ces récepteurs recrutent des protéines adaptatrices telles que FADD (*fas-associated death domain protein*) entraînant l'activation de la caspase 8, dite caspase initiateur, qui va cliver et activer les caspases effectrices 3 et 7 qui à leur tour activent d'autres caspases induisant la protéolyse intracellulaire.

La voie intrinsèque de l'apoptose, également connue sous le nom de « voie mitochondriale ». Elle se produit en réponse à une grande variété de stimuli extracellulaires tels que les altérations de l'ADN, le stress oxydant et une concentration élevée de calcium. L'activation de protéines pro-apoptotiques, telles que la protéine Bcl-2-associated X (BAX), neutralise les effets des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et conduit au relargage vers le cytosol des facteurs pro-apoptotiques, le cytochrome c et la protéine AIF, initialement présentes dans l'espace inter-membranaire mitochondrial. Ceci est dû à la perméabilisation mitochondriale en réponse au stress de la séquence d'I/R. Le relargage du cytochrome c cytosolique représente un point de non-retour pour la cellule. Dans le cytosol, le cytochrome c se lie à la protéine APAF-1 (*Apoptotic protease activation factor 1*) pour former un complexe appelé apoptosome. Ce complexe se lie à la procaspase 9 et l'active. A son tour, la caspase 9 entraîne l'activation des caspases effectrices déclenchant ainsi la mort cellulaire. D'autre part, la protéine AIF relarguée migre dans le noyau où elle exerce ses effets pro-apoptotiques indépendamment des caspases en induisant la condensation de la chromatine et le clivage de l'ADN.

Il existe des points de convergence entre ces deux voies, comme la protéine BID (*BH3 interacting domain death agonist*), membre de la famille Bcl-2. Lorsque BID est clivée par la caspase-8 activée, elle est transformée en sa forme tronquée t-BID qui se transloque à la membrane mitochondriale pour stimuler la voie mitochondriale en favorisant la libération du cytochrome c (Hengartner, 2000; Pistritto et al., 2016).

Le choix de la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose est en partie dépendante des réserves énergétiques intracellulaires. En effet, l'apoptose nécessite une quantité minimale d'ATP intracellulaire alors que dans la nécrose, les cellules meurent d'une manière indépendante de l'énergie cellulaire (Nicotera et al., 1998).

En plus de ces types bien connus de mort cellulaire, d'autres voies de mort cellulaire nouvellement identifiées ont été décrites dans l'IDM telles que : la nécroptose, la pyroptose, la ferroptose, la NETose et l'autophagie (Del Re et al., 2019).

La nécroptose

La nécroptose, mode de mort cellulaire régulé d'aspect nécrotique, a été identifiée dans diverses pathologies cardiaques dont l'I/R myocardique (Adameova et al., 2016, 2017). La nécroptose peut être induite par la fixation de ligands des récepteurs aux TNF- α ou Fas. L'événement critique dans l'induction de la nécroptose est l'activation des kinases RIPK1 (*receptor interacting protein kinase 1*) et RIPK3 (*receptor interacting protein kinase 3*). RIPK3 phosphoryle et active ensuite la pseudokinase effectrice de la nécroptose, MLKL (*mixed-lineage kinase domain-like 52 pseudokinase*), qui s'oligomérisent et perméabilisent la membrane plasmique (Linkermann & Green, 2014).

La pyroptose

La pyroptose est une voie de mort cellulaire régulée induite par l'activation d'un senseur intracellulaire, l'inflammasome, complexe multiprotéique responsable de l'activation de la caspase 1 qui est la protéase effectrice principale dans cette voie de mort cellulaire. Un certain nombre de substances générées au cours de l'I/R déclenchent l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*), entraînant l'activation de la caspase-1. L'activation simultanée des récepteurs Toll-like (TLRs) augmente l'expression des pro-interleukines (pro- IL-1 β et pro- IL-18) et du NLRP3 via le facteur de transcription NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*). La caspase-1 active les pro-interleukines et libère le domaine NH₂-terminal d'une protéine appelée gasdermine D (GSDMD), qui forme de larges pores au niveau de la membrane plasmique. Ces pores permettent aux interleukines pro-inflammatoires (IL-1 β et IL-18) d'être sécrétées, et la perte de l'intégrité de la membrane induit la mort cellulaire par pyroptose. La caspase 1 attaque également de nombreuses autres protéines dans la cellule, y compris des enzymes vitales comme la GAPDH, ce qui pourrait également contribuer à sa toxicité (Mishra et al., 2019; Q. Wang et al., 2020).

La ferroptose

La ferroptose est une nouvelle forme de mort cellulaire régulée qui a été décrite pour la première fois il y a moins d'une décennie (Dixon et al., 2012). Elle se caractérise morphologiquement par un rétrécissement des mitochondries avec une augmentation de la densité de la membrane mitochondriale ainsi que la dégénérescence et la rupture de crêtes mitochondriales, tandis que la morphologie du noyau reste inchangée. La ferroptose présente des caractéristiques qui sont distinctes des deux autres formes de mort cellulaire régulée (nécroptose et pyroptose) : sa dépendance au fer, les perturbations de l'équilibre redox médiées par le glutathion (GSH) et la glutathione peroxydase de type 4 (GPX4), et peroxydation lipidique (Cao & Dixon, 2016). Elle peut être induite de manière canonique par une inactivation directe ou indirecte de la GPX4, l'enzyme anti-oxydante clé protégeant les membranes biologiques contre les dommages liés au stress oxydatif et à la peroxydation des lipides en utilisant le GSH, ou de manière non canonique en augmentant le pool labile de fer dans laquelle le fer ferrique (Fe^{3+}), produit par la réaction de Fenton, active les lipoxigénases et endommagent par la suite les membranes cellulaires (Dixon et al., 2012). La GPX4 peut être inactivée d'une manière indirecte par des inducteurs de la ferroptose (glutamate, érastine, sulfasalazine ou sorafénib) qui inhibent le système x_c^- (le système d'échange cystine/glutamate). Le système x_c^- importe normalement de la cystine, qui est convertie en cystéine générant ensuite du GSH, un cofacteur de la GPX4. GPX4 peut également être inhibée par des composés chimiques tels que le RSL3 (*RAS-selective lethal 3*). L'inhibition de GPX4 augmente l'accumulation d'hydropéroxydes lipidiques. Des études expérimentales ont montré que le traitement des souris soit par des chélateurs de fer (déféroxamine, dexrazoxan) soit par des inhibiteurs de la peroxydation des lipides (ferrostatin-1) permettent de réduire la taille de l'infarctus (Fang et al., 2019; M. Gao et al., 2015).

La NETose

La NETose est la mort des neutrophiles, les leucocytes les plus abondants dans le myocarde pendant la reperfusion, par nécrose régulée conduisant à la libération contrôlée de « pièges » extracellulaires (NETs, *neutrophil extracellular traps*) en réponse à un processus dépendant des toll-like receptors (Silk et al., 2017). Cette forme unique de mort cellulaire immunitaire est médiée par la protéine peptidyl arginine déiminase 4 (PAD4), une enzyme qui facilite la citrullination (conversion de l'arginine en citrulline) des histones H3 et la décondensation de la chromatine (Y. Wang et al., 2009). Les contenus nucléaire (ADN et histones) et granulaire

(myéloperoxydase) des polynucléaires impliqués se liquéfient, se mélangent et sont libérés en extracellulaire formant un réseau fibrillaire. Les contenus nucléaires dérivés des NETs sont également impliqués dans la réponse inflammatoire après une ischémie cardiaque (Savchenko et al., 2014). De plus, les souris dépourvues de l'enzyme PAD4 fonctionnelle produisent des concentrations circulantes de nucléosomes (ADN et histones) plus faibles après un infarctus et ont une taille d'infarctus réduite par rapport au souris *wild type* (Savchenko et al., 2014). Une étude clinique récente à grande échelle a révélé une corrélation entre le niveau de NETose et la sévérité de l'accident vasculaire cérébral (AVC) et de l'IDM (Novotny et al., 2020).

La mort de différents constituants du myocarde (cardiomyocytes, cellules endothéliales, fibroblastes, interstitium et cellules immunitaires) par différentes voies (nécrose, apoptose, nécroptose, pyroptose, ferroptose et NETose) jouent un rôle très important dans l'initiation de la réponse inflammatoire au cours de l'IDM (qui sera détaillé dans le chapitre suivant) suite à la libération de leurs contenus intracellulaires, les signaux de dangers endogènes (DAMPs, *damage associated molecular pattern*) (Figure 7).

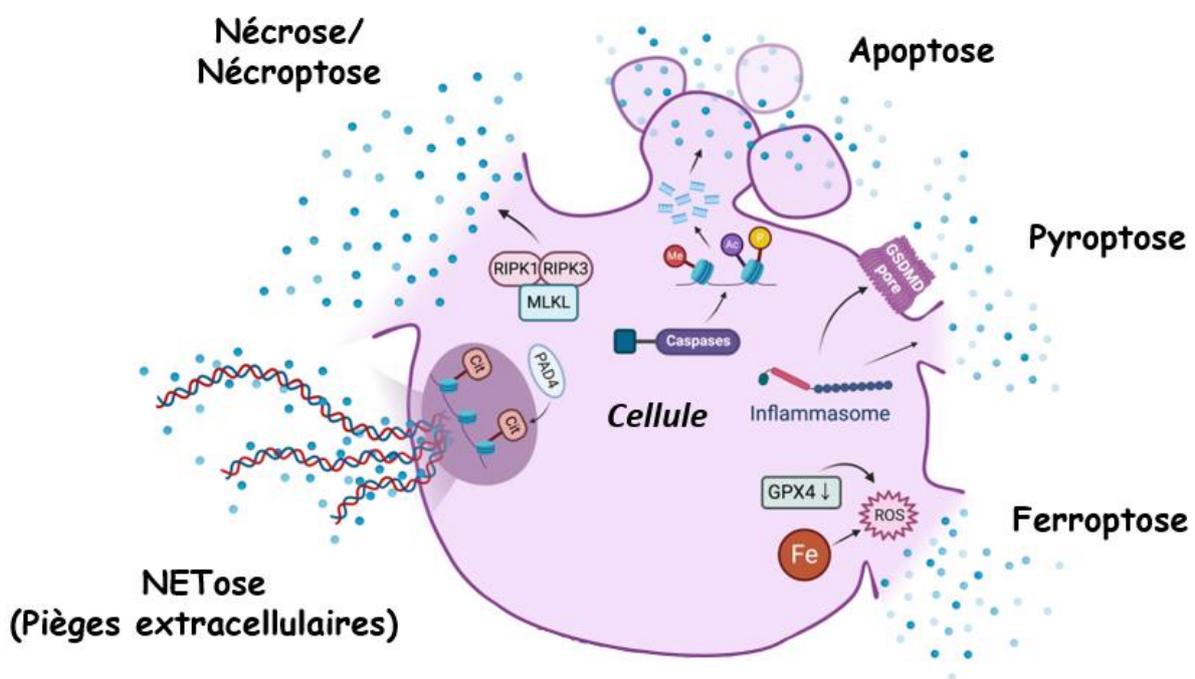


Figure 7: Mécanismes universels de la libération de DAMPs. Les différentes voies de mort cellulaire Nécrose/Nécroptose, Apoptose, Pyroptose, Ferroptose et NETose sont responsables à la libération de DAMPs. Modifié d'après (Murao et al., 2021).

L'autophagie

L'autophagie d'autre part, est considérée comme un mécanisme de survie cellulaire, permettant le recyclage d'éléments cellulaires en conditions délétères par un processus de dégradation lysosomale intracellulaire (Levine & Kroemer, 2008). Mais elle peut devenir délétère et être à l'origine de la mort cellulaire en cas de stimulation excessive induite par une ischémie prolongée et une surproduction de ROS au cours de la reperfusion (Gustafsson & Gottlieb, 2009; Takagi et al., 2007). Elle permet, outre la dégradation et l'élimination des molécules endommagées, l'élimination des organites défectueux tels que les mitochondries : on parle alors de l'autophagie mitochondriale ou mitophagie (Gustafsson & Gottlieb, 2009) entraînant la mort cellulaire.

II. Les stratégies de cardioprotection

L'objectif de la cardioprotection en phase aiguë d'IDM est de limiter les lésions engendrées par la reperfusion, vu le caractère imprévisible de l'IDM qui ne permet d'agir qu'après le déclenchement de la phase ischémique, dans le but de préserver la fonction cardiaque et réduire la taille finale de l'infarctus. Nombre de stratégies de cardioprotection développées dans ce contexte induisent l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires dont la voie RISK (*reperfusion injury salvage kinase*), la voie SAFE (*survivor activating factor enhancement*) et la voie du monoxyde d'azote (NO). La voie RISK résulte de l'activation des protéines G inhibitrices ($G_{i/q}$) et implique 2 voies de phosphorylation PI3K/Akt (*phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate 3-kinase*/protéine kinase B) et ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) ayant pour effecteur final une protéine kinase : la GSK-3 β (*glycogene synthase kinase 3 β*). Alors que la voie SAFE résulte de l'activation des récepteurs de cytokines et est composée d'une voie de signalisation impliquant le TNF- α et JAK/STAT (*janus kinase/transducteur de signal et activateur de transcription*) visant à la phosphorylation du facteur de transcription STAT3, qui outre son rôle au niveau mitochondrial, se transloque dans le noyau et active l'expression des gènes anti-apoptotiques ou des facteurs anti-oxydants. Tandis que la voie du NO résulte de l'activation des protéines G stimulatrices (G_s) et impliquant la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase G (PKG) et la protéine kinase C (PKC) ainsi que le monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS). Ces voies semblent converger vers la

mitochondrie, vers l'inhibition de l'ouverture du mPTP qui est, comme on vient de le voir, l'acteur central des lésions d'I/R ainsi que vers l'ouverture des canaux potassiques ATP dépendants (mK_{ATP}) (Heusch Gerd, 2015; Ovize et al., 2010) (Figure 8).

La connaissance des voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection a fait l'objet de recherches ces dernières décennies, en utilisant des agents pharmacologiques, que ce soit des déclencheurs de ces voies (comme l'adénosine, l'érythropoïétine) ou des molécules agissant directement au niveau de la mitochondrie en bloquant l'ouverture du mPTP (la cyclosporine A). Bien que ces molécules aient été très prometteuses dans de nombreux travaux expérimentaux, la translation clinique ne semble cependant pas efficace (Hausenloy & Yellon, 2013; Heusch, 2020; Heusch & Gersh, 2017).

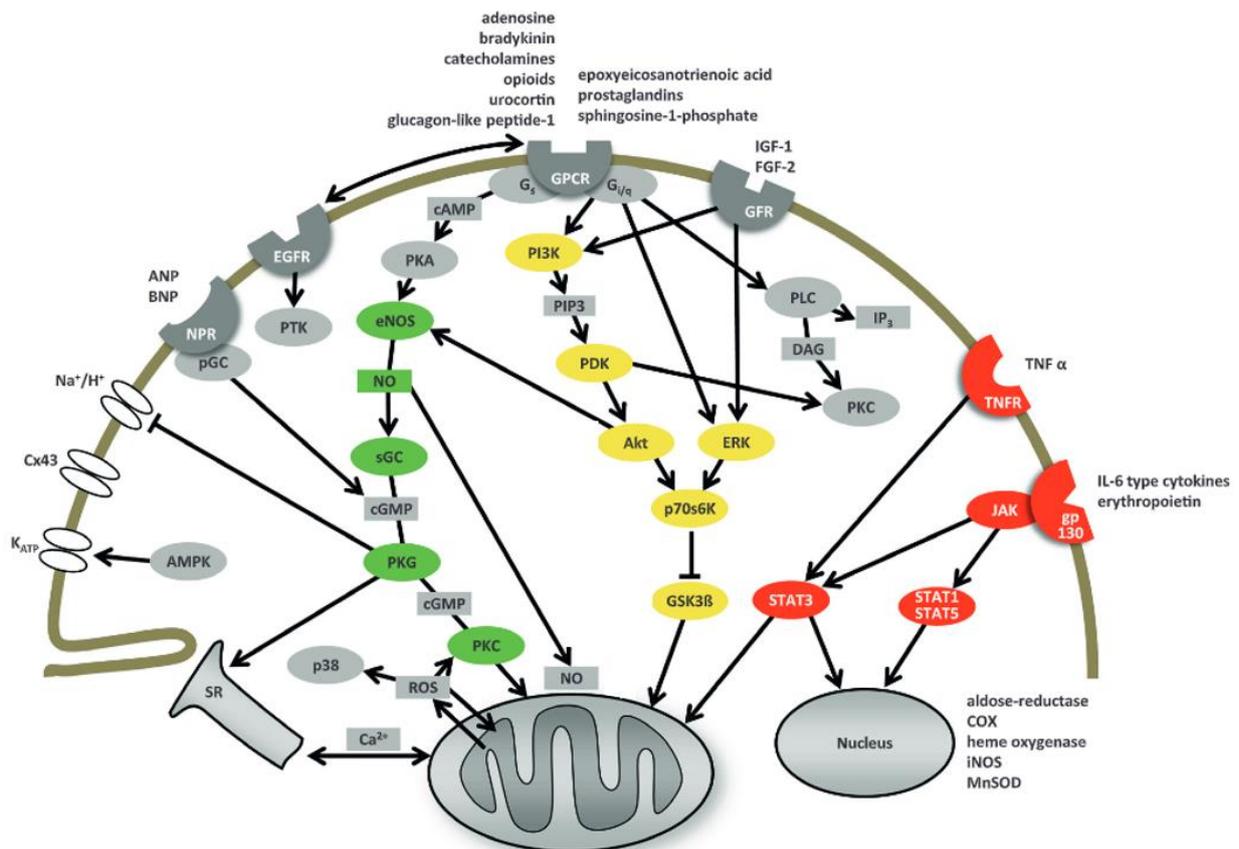


Figure 8 : Représentation des différentes voies de signalisation impliquées dans la cardioprotection. La voie du NO affichée en vert, la voie RISK affichée en jaune et la voie SAFE affichée en rouge, Modifié d'après (Heusch Gerd, 2015).

Les stratégies de cardioprotection peuvent être divisées en plusieurs catégories en se basant sur : la modalité de protection, le temps d'application et les cibles cellulaires et/ou moléculaires. Les modalités cardioprotectrices les plus étudiées sont basées soit sur l'application mécanique de courtes périodes répétitives d'I/R (conditionnement ischemique), soit sur l'administration de substances pharmacologiques (conditionnement pharmacologique). Elles peuvent être aussi classées en fonction du moment où elles sont appliquées (pendant l'ischémie, au moment de la reperfusion et durant la phase de reperfusion) (Figure 9). Enfin, les stratégies peuvent être classées selon les cibles cellulaires (cardiomyocytes ou non cardiomyocytes) et les cibles moléculaires (voie RISK, voie SAFE ou les composants induisant la mort cellulaire tels que le mPTP, les ROS, les pompes de Ca^{2+}) (Davidson et al., 2019).

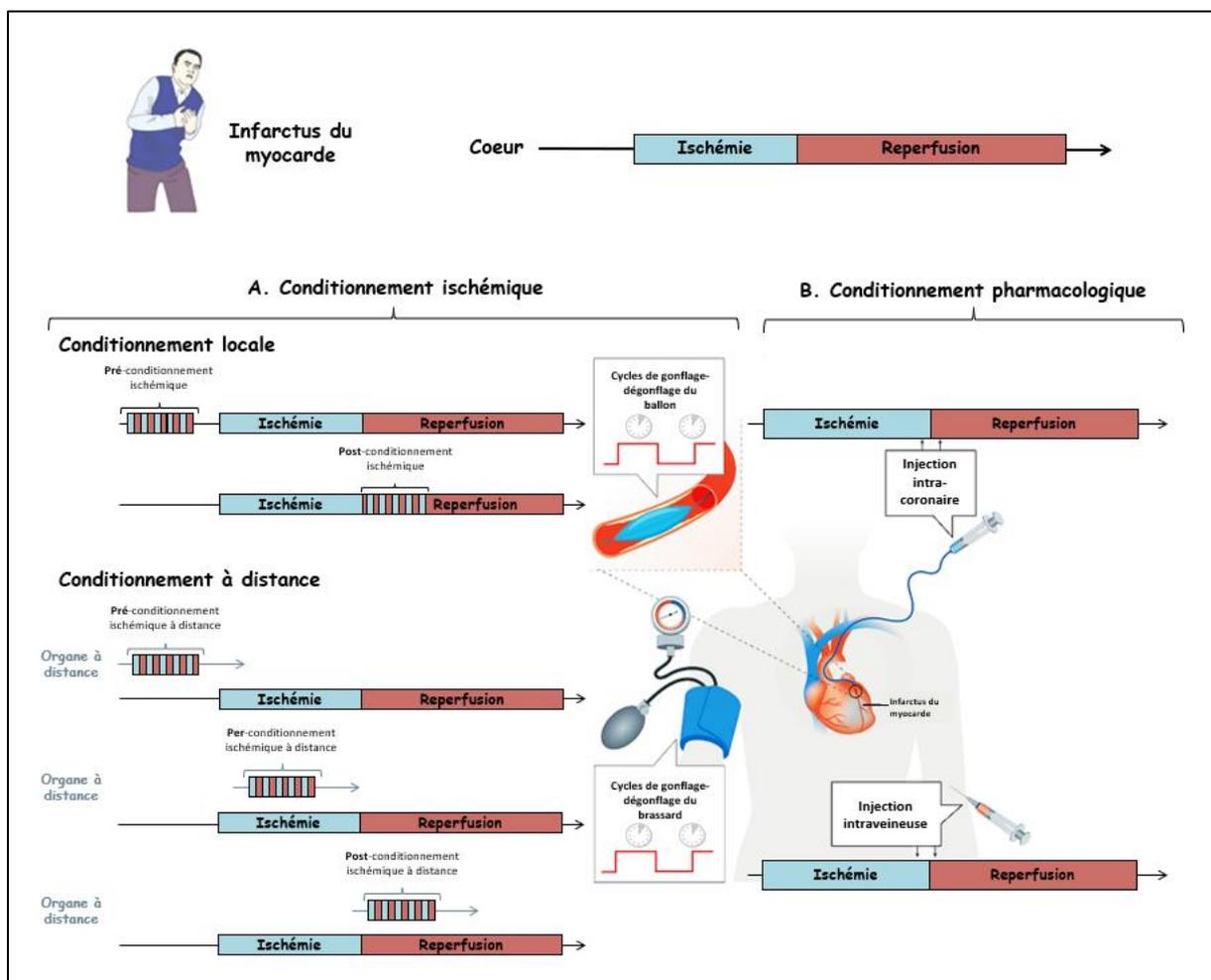


Figure 9 : Différentes stratégies de cardioprotection. Représentation schématique des conditionnements ischemique, local et à distance, (A) et du conditionnement pharmacologique (B) réalisés à différents temps lors d'un IDM. Pré : avant l'ischémie. Per : Pendant l'ischémie. Post : Après l'ischémie. Modifié d'après (Heusch, 2020).

A. Cardioprotection mécanique par le conditionnement ischémique local

En 1986, Murry et al. ont introduit pour la première fois le concept du conditionnement mécanique dans lequel de brèves périodes répétées d'I/R (4 cycles de 5 minutes d'occlusion coronaire séparées par 5 minutes de reperfusion) en amont d'une ischémie prolongée permettait de réduire la taille finale de l'infarctus chez le chien (Murry et al., 1986). Il s'agit de « préconditionnement ischémique » (PréC). Cependant, l'application clinique du PréC est limitée dû au caractère imprévisible de l'IDM (Hausenloy & Yellon, 2009). Le concept du « postconditionnement ischémique » (PostC) a été décrit pour la première fois en 2003 par Zhao et al. (Z.-Q. Zhao et al., 2003). Ils ont démontré chez le chien que l'application de brèves séquences d'I/R après une longue période d'ischémie, au moment de la reperfusion, permettait d'obtenir une protection similaire au PréC par rapport à la taille de l'infarctus. Ensuite, ce phénomène a pu être reproduit chez de nombreuses espèces telles que : la souris (Gomez et al., 2008), les lapins (X.-M. Yang et al., 2004), les cochons (Schwartz & Lagranha, 2006) et enfin chez l'homme (Sivaraman et al., 2007). En effet, le moment de l'application du PostC est critique dans l'obtention de l'effet cardioprotecteur mais aussi variable selon l'espèce étudiée. Un retard d'une minute dans l'application de la première réocclusion coronaire (chez le rat et le lapin) et de 180 secondes (chez la souris, le chien et l'homme) peut entraîner la perte de cet effet cardioprotecteur (Skyschally et al., 2009). Cependant, la translation clinique sur un grand nombre de patients a donné des résultats contradictoires sur la taille d'infarctus, parfois négatifs (Engstrøm et al., 2017; Hahn et al., 2013; E. K. Kim et al., 2015; Limalanathan et al., 2014), parfois positifs (Araszkiewicz et al., 2019; Mukherjee & Jain, 2019). Aucune large étude clinique n'a cependant pu mettre en évidence d'effet bénéfique sur la mortalité post-infarctus.

B. Cardioprotection mécanique par conditionnement ischémique à distance

Un autre concept de « conditionnement ischémique à distance » (RIC) a été mis en évidence (Przyklenk et al., 1993). Le principe de ce concept consiste à réaliser des séquences d'I/R au niveau d'un organe ou d'un tissu afin d'augmenter la résistance à l'ischémie d'un autre l'organe en ischémie. De la même façon que pour le conditionnement local, selon l'ordre chronologique où sont appliquées ces brèves séquences d'I/R par rapport à l'ischémie prolongée on peut

distinguer 3 types de RIC : préconditionnement à distance lorsque les séquences d'I/R sont réalisées avant l'ischémie prolongée, perconditionnement à distance lorsque les séquences sont réalisées durant l'ischémie prolongée et postconditionnement à distance lorsqu'elles sont appliquées après l'ischémie, c'est-à-dire au moment de la reperfusion myocardique (Figure 9). Les 3 types de RIC semblent être cardioprotecteurs dans des modèles expérimentaux d'infarctus et permettent de réduire la taille de l'infarctus (F et al., 2005; Gho et al., 1996; Przyklenk et al., 1993; M. R. Schmidt et al., 2007). L'avantage de cette technique est que les brèves séquences d'I/R ne sont pas réalisées sur la même artère occluse ce qui facilite sa translation clinique. Elle se fait par gonflage/dégonflage à l'aide d'un brassard à tension au niveau d'un membre.

Le conditionnement ischémique à distance implique le transfert de signaux du tissu exposé aux brèves séquences d'I/R vers le cœur (et d'autres organes cibles). Les mécanismes impliqués restent encore peu clairs, mais semblent mettre en jeu des facteurs nerveux et humoraux. Ici encore, les résultats très prometteurs du postconditionnement ischémique à distance observés dans les modèles expérimentaux et dans des études cliniques avec de faibles effectifs n'ont pas été confirmés par des études cliniques de large envergure dessinées pour démontrer un impact sur la mortalité post-infarctus (Hausenloy et al., 2019).

C. Cardioprotection pharmacologique

Une autre façon de protéger le cœur contre les lésions d'I/R est « le conditionnement pharmacologique », un concept basé sur l'administration d'agents pharmacologiques imitant l'effet du conditionnement ischémique. Les médicaments qui sont évalués pour induire une cardioprotection sont en grande partie dérivés des voies de transduction des signaux cardioprotecteurs identifiés (Kleinbongard & Heusch, 2015). On peut distinguer 2 types de conditionnement pharmacologique : « Le PréC pharmacologique » et « le PostC pharmacologique ». Le premier consiste à l'administration d'une molécule avant la réalisation d'une ischémie prolongée suivie d'une reperfusion alors que le deuxième consiste à l'administration d'une molécule juste avant ou au début de la reperfusion. Dans notre équipe, l'érythropoïétine, déjà connue pour son effet cardioprotecteur dans l'IDM (Hanlon et al., 2005), a montré de meilleurs effets cardioprotecteurs que le postC contre les lésions de reperfusion lorsqu'elle est administrée au début de la reperfusion chez les rats dans un modèle d'IDM. Ces effets sont représentés par une diminution de la taille d'infarctus et ceux-ci passent par une

augmentation de la phosphorylation de GSK-3 β (Tamareille et al., 2009). Pourtant, l'érythropoïétine ainsi que les agents anti-inflammatoires, les anti-oxydants et les bloqueurs de canaux calciques n'ont pas eu d'effet désirable sur la taille d'infarctus chez l'homme (Gunata & Parlakpınar, 2021; Hausenloy & Yellon, 2013; Heusch, 2020). Les agents ciblant la mitochondrie comme la ciclosporine A et le TRO40303 ont également été étudiés sans montrer un effet efficace chez l'homme, malgré les résultats prometteurs observés dans les modèles pré-cliniques (Schaller et al., 2010; Skyschally et al., 2010), soulignant le défi de transférer les techniques de conditionnement pharmacologique en clinique humaine (Atar et al., 2015; Cung et al., 2015; Heusch, 2020). Une synthèse de principaux molécules testées dans le cadre du conditionnement pharmacologique est présentée dans le tableau 1.

Malheureusement, il n'existe aucun traitement de conditionnement pharmacologique validé à ce jour pour utilisation en routine.

D. A la recherche de nouvelles cibles pour la cardioprotection

Le contraste entre les résultats précliniques et les résultats cliniques est vraisemblablement lié à de nombreux biais dans la démarche translationnelle, l'un des principaux étant que les travaux expérimentaux sont classiquement menés sur des modèles animaux jeunes et sans comorbidités, ce qui n'est pas le cas des patients pris en charge pour une maladie cardiaque aiguë (Heusch, 2017). Les recherches se poursuivent alors dans le but de découvrir de nouveaux agents thérapeutiques appliqués lors de la reperfusion pour protéger le cœur contre les lésions d'I/R, préserver la fonction cardiaque et améliorer le pronostic des patients.

Puisque la réponse inflammatoire suite à l'IDM est un déterminant clé de la taille finale de l'infarctus et d'un remodelage ventriculaire gauche défavorable ultérieurement, les mécanismes liés aux réponses immuno-inflammatoires ont servi d'hypothèses à de nouvelles interventions thérapeutiques proposées à la phase aiguë d'un infarctus (Ruparelia et al., 2017).

Nom de l'essai	Design de l'étude	Conditions	Nombre de participants	Interventions	Résultats	Référence
ASSAIL-MI	Phase II, randomisé, en double aveugle, contrôlé vs. placebo	Patients présentant un STEMI aigu	200 participants	Dose unique de tocilizumab (anti-récepteur de l'IL-6) vs. placebo	Amélioration de l'indice de sauvetage myocardique avec le tocilizumab	NCT03004703
CLEAR-SYNERGY	Phase III, multicentrique, randomisé, en double aveugle, factoriel 2x2	Patients présentant un STEMI traité par ICP primaire	7000 participants	Le stent SYNERGY plus colchicine (anti-inflammatoire par l'inhibition de la polymérisation de la tubuline et la formation des microtubules) et spironolactone (antagoniste de l'aldostérone) ou placebo	En cours	NCT03048825
COVERT-MI	Phase II, multicentrique, randomisé, en double aveugle, contrôlé vs. placebo	Patients présentant un STEMI traité par ICP primaire	194 participants	Administration de colchicine pendant 5 jours vs. placebo	La colchicine n'a pas réduit la taille de l'infarctus	NCT03156816
RITA-MI	Phase I/II, ouvert	Patients présentant un STEMI antérieur aigu traité avec ICP primaire	24 participants	Une seule injection intraveineuse de rituximab (anticorps monoclonal ciblant le CD20)	Cet essai a montré l'innocuité et la tolérance du rituximab	NCT03072199
RITA-MI2	Phase II, multicentrique, randomisé, en double aveugle, contrôlé vs. placebo	Patients présentant un STEMI antérieur aigu	558 participants	Une seule injection de deux doses de rituximab vs. placebo	En cours	NCT05211401
LILACS	Phase I/II, randomisé, en double aveugle, contrôlé vs. placebo	Patients présentant un syndrome coronarien aigu et une cardiopathie ischémique stable	41 participants	Aldesleukine (IL-2 recombinante) à faible dose	Cet essai a montré l'innocuité et la tolérance de l'aldesleukine	NCT03113773
VCU-ART3	Phase II/III, randomisé, multicentrique, en double aveugle, contrôlé vs. placebo	Patients présentant un STEMI aigu	99 participants	Anakinra (antagoniste du récepteur de l'IL-1) vs. placebo	L'anakinra a significativement réduit la réponse inflammatoire systémique	NCT01950299
Virginia-ART4	Phase II, randomisé, en double aveugle	Patients présentant un STEMI aigu	84 participants	Anakinra vs. placebo	En cours	NCT05177822
CHAMPION PHOENIX	Phase III, randomisé, en double aveugle	Patients subissant ICP	11145 participants	Cangrelor (antagoniste injectable des récepteurs P2Y ₁₂ d'action direct) vs. clopidogrel (antagoniste oral des récepteurs P2Y ₁₂ d'action retardée)	Cangrelor réduit le risque de décès, l'IDM, la revascularisation entraînée par l'ischémie, la thrombose de stent	NCT01156571

Tableau 1 : Agents pharmacologiques inflammatoires évalués chez l'homme dans le contexte de l'IDM. ICP : intervention coronarienne percutanée, IL : interleukine, STEMI : ST elevation myocardial infarction.

Chapitre 2 : Réponse inflammatoire au cours de l'infarctus du myocarde

L'apparition d'une ischémie myocardique aiguë dans le cadre d'un IDM, induit une réponse pro-inflammatoire initiale, dont le but est d'éliminer les débris cellulaires nécrotiques de la zone infarctée. Le début de la reperfusion myocardique exacerbe cette réponse pro-inflammatoire et contribue aux lésions de reperfusion myocardiques et à la mort des cardiomyocytes qui se manifestent entre 6 et 24 heures après la reperfusion (Z. Zhao, 2000; Z. Q. Zhao et al., 2001). La réponse pro-inflammatoire aiguë est initiée par l'action concertée de plusieurs processus, notamment l'activation de la cascade du complément, la production de ROS et la libération des DAMPs qui servent de ligands aux récepteurs PRRs (*pattern recognition receptors*), entraînant la libération de divers médiateurs pro-inflammatoires, tels que les cytokines et les chimiokines. Ces médiateurs pro-inflammatoires induisent le recrutement de cellules inflammatoires dans la zone infarctée et augmentent la réponse pro-inflammatoire post-IDM. Cette réponse inflammatoire, bien que nécessaire à la déterction complète du tissu infarcté, peut paradoxalement aggraver les lésions myocardiques et donc peut être un déterminant clé de la taille finale de l'infarctus. Elle est ensuite suivie d'une phase de résolution, anti-inflammatoire, mettant en jeu des mécanismes de réparation tissulaire et qui est orchestrée par la suppression et la résolution de la réponse pro-inflammatoire. Ceci est dû à l'activation de voies inhibitrices endogènes spécifiques qui suppriment l'inflammation, et à des changements dynamiques dans les rôles des leucocytes infiltrés dans la zone de l'infarctus. La transition entre ces deux phases est orchestrée par une interaction finement régulée mais aussi complexe entre de multiples acteurs au sein du cœur lui-même (notamment les cardiomyocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes et l'interstitium) et les composants de la réponse immunitaire (notamment les neutrophiles, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes). Les perturbations de l'équilibre et de la transition entre les phases pro-inflammatoire et anti-inflammatoire (phase de résolution) post-IDM peuvent exacerber les lésions I/R myocardiques aiguës et contribuer au remodelage ventriculaire défavorable et à une insuffisance cardiaque ultérieure (Figure 10) (Halade, 2013; Ong et al., 2018).

Dans ce chapitre, nous allons décrire la réponse pro-inflammatoire post-IDM, ses effecteurs cellulaires ainsi que ses déterminants moléculaires.

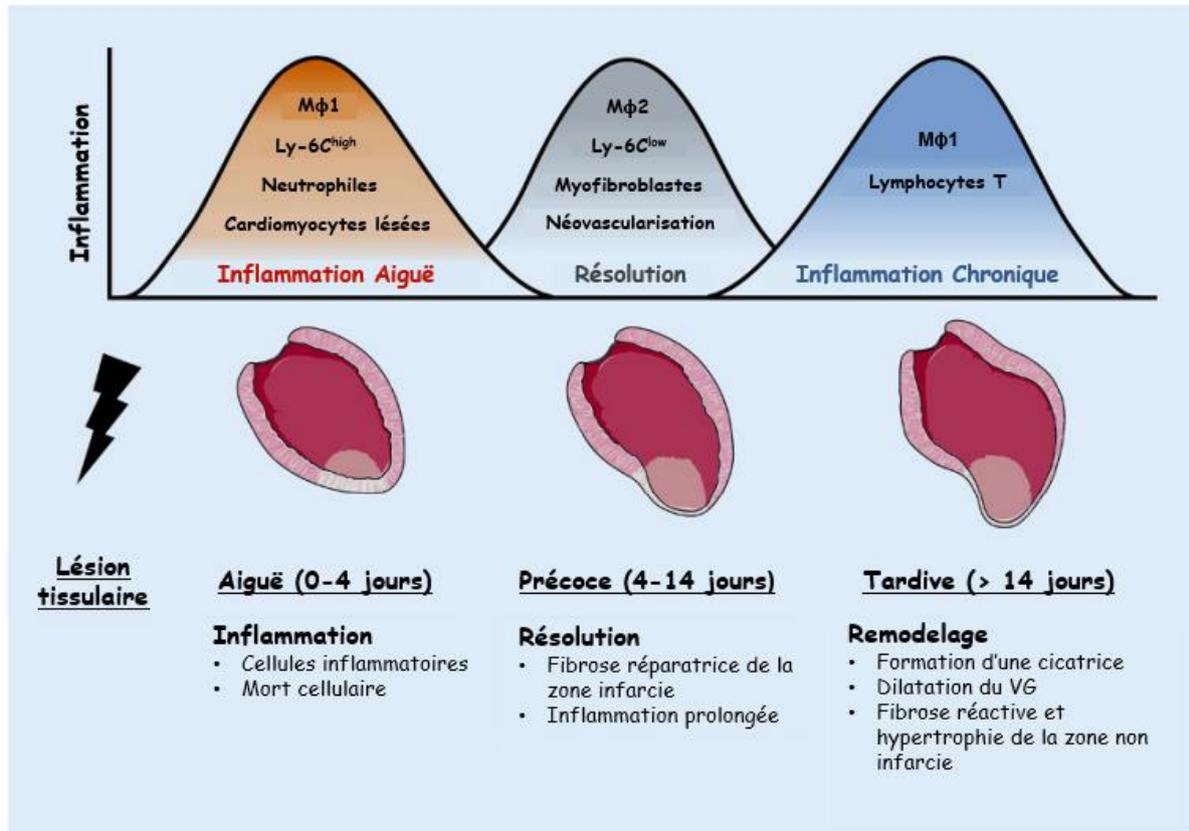


Figure 10 : Les phases de la réponse inflammatoire en réponse à l'I/R myocardique. La première phase correspond à une phase pro-inflammatoire aiguë (~4 jours chez la souris) et est caractérisée par une infiltration robuste de cellules immunitaires : de macrophages M1 (Mφ1), de monocytes Ly-6C^{high} et de neutrophiles. La seconde phase correspond à une phase de résolution, de prolifération de myofibroblastes et de réparation de la lésion (qui dure de 10 à 14 jours chez la souris) au cours de laquelle les cellules immunitaires sont polarisées vers un état immunomodulateur. L'inflammation chronique peut résulter d'une inflammation persistante après la phase de résolution (une résolution incomplète de l'inflammation pendant la phase de réparation et une amplification ultérieure avec le temps) ou d'une seconde vague d'activation immunitaire en réponse à des facteurs mal connus. VG : Ventricule gauche. Modifié d'après (Riehle & Bauersachs, 2019).

I. Initiation de la réponse inflammatoire par les DAMPs

Dans le cœur infarcté, la nécrose massive de cardiomyocytes entraîne la libération de signaux de danger endogènes, les DAMPs, qui initient une intense réponse inflammatoire. Ils sont reconnus par des senseurs des signaux de danger, les PRRs. La liaison des DAMPs à leur récepteur induit l'activation de l'inflammasome et des voies de signalisation du facteur nucléaire NF- κ B pour aboutir à la synthèse et à la sécrétion de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires (Figure 11).

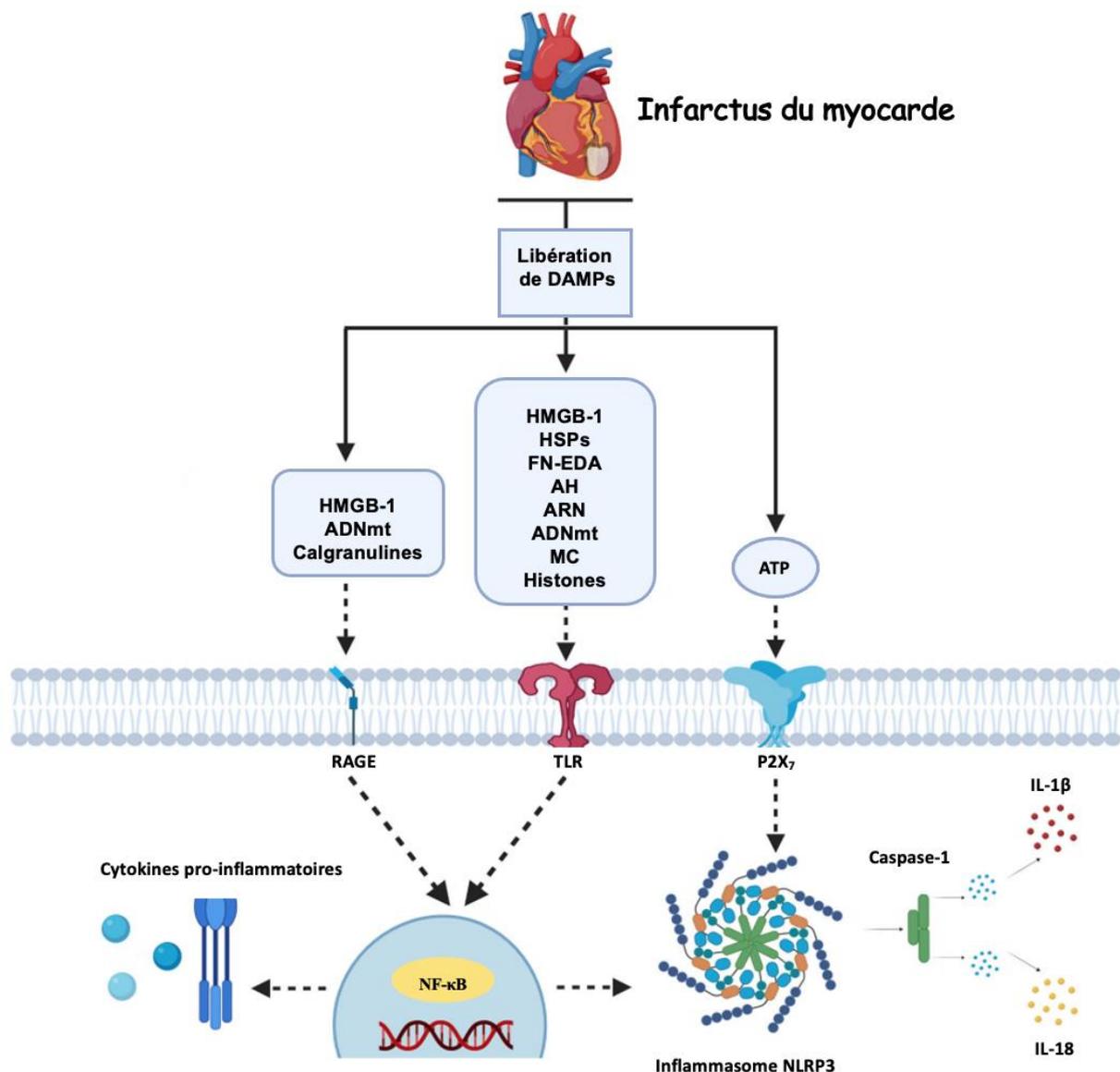


Figure 11 : Schéma résumant l'inflammation médiée par DAMP/PRR après un IDM. L'IDM conduit à la libération de DAMPs (comme HMGB-1, HSPs, FN-EDA, AH, ARN, ATP, calgranulines, ADNmt, MC, histones, etc.) qui agissent sur les PRRs (comme TLRs, RAGE et P2X7). La stimulation de ces récepteurs conduit à la

translocation dans le noyau du facteur de transcription NF- κ B. Il en résulte la production de cytokines pro-inflammatoires et l'activation de l'inflammasome NLRP3. MC : Myosine cardiaque, FN-EDA : Fibronectine extra domain A, HA : Acide hyaluronique, HMGB-1 : High mobility group box-1, HSPs : Heat shock proteins, ADNmt : ADN mitochondrial, P2X₇ : Récepteur purinergique, RAGE : Receptor for advanced glycation end-products. Modifié d'après (Silvis et al., 2020).

A. Les signaux de dangers endogènes ou DAMPs

Les DAMPs, nommés aussi « alarmines » (Pisetsky, 2013), sont des inducteurs de l'inflammation, responsables d'une inflammation dite « stérile », du fait de l'absence de stimulus d'agent infectieux, mettant en jeu au premier plan le système immunitaire inné mais aussi les cellules du système immunitaire adaptatif (G. Y. Chen & Nuñez, 2010). Ils initient et amplifient la réponse inflammatoire post-IDM (Zheng et al., 2011). Parmi les DAMPs, on retrouve principalement les protéines nucléaires et cytosoliques, comprenant les histones, la protéine HMGB1 (Scaffidi et al., 2002), les protéines de choc thermique et les protéines S100 (Schiopu & Cotoi, 2013), ainsi que les ADN nucléaires et mitochondriaux, les ARN (Kaczorowski et al., 2012; Preissner & Herwald, 2017), les métabolites de la purine tels que l'ATP (Kurashima et al., 2012), les composants de la matrice extracellulaire tels que l'acide hyaluronique et la fibronectine. Ils peuvent être divisés en 2 groupes : les DAMPs constitutifs (cDAMPs, *constitutive DAMPs*,) et les DAMPs inductibles (iDAMPs, *inducible DAMPs*) (G. P. van Hout et al., 2016; Zindel & Kubes, 2020). Les cDAMPs sont des molécules normalement séquestrées au niveau intracellulaire, nucléaire ou cytoplasmique, et absents ou présents en très faible quantité dans le milieu extracellulaire et ils ne sont pas libérés d'une manière active par les cellules mais à la suite de la nécrose tels que l'ADNmt, l'ARN et la myosine cardiaque. Les iDAMPs quant à eux sont activement sécrétés par le tissu endommagé à la suite de la mort cellulaire programmée non apoptotique, tels que la nécroptose, la pyroptose et la NETose. Les iDAMPs les plus étudiés dans le contexte de l'IDM sont : les protéines de choc thermique HSPs, la protéine HMGB1 et la fibronectine. Nous allons discuter par la suite les différentes DAMPs qui ont été montrés être susceptibles de jouer un rôle dans la réponse inflammatoire post-IDM (Tableau 2).

1. HMGB1

Les protéines HMG (*high mobility group*) constituent le principal groupe de protéines non-histones associées à la chromatine, de faible poids moléculaire (10-30 kDa), découvertes dans les années 1970. Elles présentent une forte mobilité électrophorétique du fait qu'elles possèdent 50 % d'acides aminés chargés (Goodwin et al., 1973). Les protéines HMG comprennent trois superfamilles : HMGA, HMGB et HMGN. La protéine HMGB1 appartient, avec HMGB2, HMGB3 et HMGB4, à la superfamille HMGB (*high mobility group box*) présentant au moins 2 motifs « HMG box » de liaison à l'ADN ; elle est ubiquitaire et exprimée à des niveaux particulièrement élevés (10^6 molécules/cellule). La fonction de la protéine HMGB1 dépend de sa localisation nucléaire, cellulaire ou subcellulaire (Andersson et al., 2014). Dans le noyau, HMGB1 est la protéine de liaison à l'ADN non-histone la plus abondante. Elle permet la transcription, la réparation et la réplication de l'ADN (Bustin et al., 1990; Bustin & Reeves, 1996). Dans le cytoplasme, HMGB1 régule de nombreux processus différents, tel que l'autophagie et l'apoptose. Elle est également un régulateur important de la fonction mitochondriale (Tsong et al., 2014). Dans la cellule, HMGB1 détecte les acides nucléiques et contribue à l'activation immunitaire innée. La reconnaissance cytoplasmique des acides nucléiques se produit par liaison aux TLRs dont TLR3, TLR7 et TLR9 (Krieg, 2002). HMGB1 peut se retrouver aussi dans le milieu extracellulaire, soit lors d'une sécrétion active par les cellules de l'inflammation soit lors d'une libération passive et rapide lorsque les cellules meurent par nécrose, c'est ce qui fait de la protéine HMGB1 une protéine classée en tant que DAMPs. Après l'IDM, HMGB1 est libérée des cellules cardiaques nécrotiques où il a été démontré qu'elle agit sur plusieurs PRRs dont les TLRs (TLR2, TLR4 et TLR9) et les récepteurs aux produits terminaux de glycation avancée (RAGE) ce qui conduit à l'activation de NF- κ B, qui non seulement déclenche la transcription des gènes codant pour des multiples cytokines pro-inflammatoires, mais régule également l'expression des TLRs et des RAGEs, assurant ainsi une réponse inflammatoire durable (Ding et al., 2013; Park et al., 2004). Son inhibition à la suite d'un IDM a été rapportée comme étant cardioprotectrice (Andrassy et al., 2008; Hu et al., 2013). D'autre part, dans la phase de convalescence post-AMI, l'HMGB1, à de faibles concentrations, peut être bénéfique et contribuer à la récupération de la fonction ventriculaire gauche, à la réparation tissulaire, à l'angiogenèse et à la régénération (Kitahara et al., 2008; Takahashi et al., 2008) impliquant l'inhibition d'HMGB1 au moment de l'IDM et l'activation d'HMGB1 dans la phase de remodelage post-IDM comme stratégies thérapeutiques pour réduire la taille de l'infarctus et prévenir le remodelage défavorable du ventricule gauche.

HMGB-1 a été également étudié chez l'homme et s'est révélée être significativement élevée dans le sérum après un infarctus aigu, dans les 24 heures suivant l'apparition des symptômes, par rapport aux sujets sains (Goldstein et al., 2006).

2. ATP extracellulaire

L'ATP est généré de manière intracellulaire par la phosphorylation oxydative mitochondriale et est stocké dans le cytoplasme. Dans les tissus sains, l'ATP peut être libéré à travers des canaux transmembranaires vers l'espace extracellulaire, de manière étroitement régulée pour favoriser la communication intercellulaire. Cet équilibre est perdu dans les cellules stressées car l'ATP est massivement transloqué vers l'espace péricellulaire. Des niveaux élevés d'ATP extracellulaire activent le récepteur purinergique membranaire P2X7 et induisent un efflux de potassium intracellulaire (Mariathasan et al., 2006). Cela entraîne la libération de la cardiolipine mitochondriale, phospholipide de la paroi interne des mitochondries, et à l'activation ultérieure de l'inflammasome NLRP3, permettant la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-18 (Iyer et al., 2013). L'inhibition du récepteur P2X7 a empêché la formation de l'inflammasome et a limité la taille de l'infarctus dans les modèles de souris ayant subi un IDM (Mezzaroma et al., 2011). Ainsi, Lorsque les cœurs ont été isolés de souris déficientes en NLRP3, perfusés *ex vivo* et soumis à une ischémie globale suivie d'une reperfusion, une amélioration marquée de la fonction cardiaque et une réduction des dommages hypoxiques ont été constatés par rapport aux cœurs de type sauvages (Sandanger et al., 2013).

3. ADN mitochondrial

Les mitochondries ont été identifiées pour la première fois au 19^{ème} siècle et d'après la théorie endosymbiotique largement acceptée, la mitochondrie serait le descendant d'une alpha-protéobactérie ayant comme hôte une autre cellule. En raison de son origine bactérienne, la mitochondrie possède son propre génome, l'ADN mitochondrial (ADNmt), et sa propre capacité d'autoréplication. Par conséquent, une fois libéré des cardiomyocytes lésés, l'ADNmt est reconnu par les TLRs en tant que signal de danger exogène (PAMPs, *pathogen associated molecular patterns*) et induit l'inflammation (Bliksøen et al., 2012; L. Xie et al., 2017; Q. Zhang et al., 2010). L'administration d'ADNmt provenant de patients présentant un infarctus dans des modèles *in vivo* et *in vitro* a entraîné l'internalisation de l'ADNmt extracellulaire par les

cardiomyocytes et l'activation de la voie TLR9/NF- κ B, ce qui a entraîné une inflammation accrue par la transcription de cytokines pro-inflammatoires. De même, l'ADNmt a également induit la mort cellulaire d'une manière dose-réponse et un dysfonctionnement mitochondrial par des mécanismes qui ne sont pas encore clairs (Bliksøen et al., 2016). L'inhibition pharmacologique de l'ADNmt a été étudiée avec le gallate épigallocatechine (EGCG), une catéchine aux propriétés anti-inflammatoires bien connues, dans un modèle d'I/R chez des rats. Des corrélations positives significatives ont été observées entre les niveaux d'ADNmt et les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IL-6) dans le tissu myocardique de rats non traités. L'administration d'EGCG, avant la reperfusion, a significativement réduit les niveaux d'ADNmt, de TNF- α et d'IL-6 et a limité la taille de l'infarctus. Ceci suggère que les effets cardioprotecteurs ont été obtenus en inhibant la libération d'ADNmt, mais le mode d'action n'est pas encore complètement élucidé (C.-Y. Qin et al., 2017). Les données ci-dessus ont encouragé les chercheurs à examiner si le taux sérique d'ADNmt est un biomarqueur plausible de la sévérité des événements cardiovasculaires. Cette hypothèse a été soutenue par de petites études, mais la question de savoir si l'ADNmt est un biomarqueur plausible du pronostic reste insaisissable (Kuznetsova & Knez, 2017; C. Qin et al., 2017; Sudakov et al., 2017; L. Wang et al., 2015).

4. Protéines de choc thermique

Les protéines de choc thermique (HSPs, *heat shock proteins*) font partie d'une famille de protéines synthétisées en réponse au choc thermique et ont été découvertes pour la première fois au niveau des glandes salivaires chez la drosophile en 1962 (Ritossa, 1962; Tissières et al., 1974). Depuis lors, plusieurs HSPs ont été découvertes et sont divisées en familles en fonction de leur poids moléculaire (Binder, 2014). Dans des conditions physiologiques normales, les HSPs sont abondamment présentes dans le cytosol et fonctionnent comme des « chaperones moléculaires » dans le repliement et la translocation des protéines (de Haan et al., 2013). Lors d'une lésion tissulaire, les HSPs sont libérées dans le milieu extracellulaire où ils se lient aux récepteurs TLR4 des cellules adjacentes et au CD14 des lymphocytes circulants. Ces interactions aboutissent à l'activation de NF- κ B et des MAP kinases (MKKs) ce qui augmente l'expression des cytokines pro-inflammatoires et rend la récupération cardiaque inefficace (Y. Li et al., 2011; J. Tian et al., 2013, p. 60; Zou et al., 2008). La question de savoir si les HSPs sont de véritables DAMPs est discutable, car des niveaux détectables de certaines HSPs existent

dans des environnements extracellulaires normaux, tandis que les DAMPs sont des molécules intracellulaires, exprimées en cas de stress ou de dommage et qui ne sont normalement pas exposées à l'environnement extracellulaire (Broere et al., 2011).

Les HSPs ont montré à la fois des effets bénéfiques et néfastes après une ischémie myocardique. Par exemple, les HSP20 et HSP70 protègent les cardiomyocytes contre les lésions dues à l'ischémie myocardique chez les rongeurs, avec une amélioration de la récupération de la performance contractile cardiaque et une diminution de la taille de l'infarctus (Fan et al., 2005). Cependant, la HSP60 a été fortement associée au développement de l'insuffisance cardiaque ischémique (Tanonaka et al., 2001) et l'activation de TLR4 médiée par HSP60 a induit l'apoptose myocardique et l'expression de cytokines pro-inflammatoires à la suite des lésions I/R myocardiques (S.-C. Kim et al., 2009).

Le rôle de la HSP70 dans l'IDM s'est révélé complexe puisque des résultats opposés ont été publiés. HSP70 peut induire la libération de cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes humains (Asea et al., 2000). Cependant, le traitement pharmacologique avec le co-inducteur HSP (bimoclomol) a augmenté les niveaux de HSP70, mais a diminué la taille de l'infarctus dans un modèle d'IDM chez le rat (Lubbers et al., 2002). De plus, l'induction de l'expression de HSP70 après prétraitement avec l'agent pharmacologique géranylgéranylacétone (GGA), a également révélé des effets cardioprotecteurs dans des modèles d'IDM chez le rat (Ooie et al., 2001; C. Zhou et al., 2017). En outre, une cohorte de 26 patients subissant un pontage coronarien a reçu un prétraitement de 3 jours avec le GGA (400 mg/jour) ou un placebo. Le traitement avec GGA a entraîné des niveaux plus élevés de HSP70 et d'autres petites HSPs dans les fractions de myofilaments de tissu des appendices auriculaires droit et gauche. Cela pourrait indiquer que le traitement par le GGA entraîne une régulation à la hausse des HSPs bénéfiques qui pourraient potentiellement atténuer les lésions d'I/R après un IDM (van Marion et al., 2020). A noter que le bimoclomol et le GGA sont toutes les deux des régulateurs indirects de la HSP70 et ces études ne parviennent pas à établir un rôle causal clair entre la régulation positive de HSP70 et les effets observés du traitement. Une étude récente menée chez des patients STEMI a observé que les niveaux sériques de HSP70 étaient significativement augmentés à la suite d'un IDM et qu'ils étaient associés à une augmentation de la taille d'infarctus, un remodelage défavorable et un pronostic clinique plus mauvais. Cette étude indique que HSP70 peut servir de biomarqueur prédictif, bien que cela ne prouve pas un rôle causal de la HSP70 en tant qu'acteur clé de la réponse inflammatoire post-IDM (Bochaton et al., 2020).

De plus, aucune interaction moléculaire directe claire des HSPs avec des PRRs spécifiques autres que TLR2 et TLR4 a été rapportée jusqu'à présent et l'interaction avec des PRRs non identifiés pourrait expliquer le rôle ambigu de ces HSPs. Ce n'est pas encore complètement compris si ces HSPs sont des spectateurs innocents qui augmentent lors d'une lésion myocardique ou si elles sont impliquées dans la réponse inflammatoire après un infarctus. Pris dans leur ensemble, ces résultats discordants révèlent une lacune dans les connaissances sur le rôle des HSPs dans l'IDM. Par conséquent, cibler directement les HSPs à ce stade ne sera possible que lorsque des études mécanistiques découvriront le rôle complexe des différentes HSPs dans les lésions I/R.

5. Fibronectine

La fibronectine (FN) est une glycoprotéine dimérique essentielle de la matrice extracellulaire. De nombreuses isoformes de FN existent en raison de l'épissage alternatif. Le variant d'épissage, fibronectine extra domaine A (FN-EDA), est fortement exprimé pendant l'embryogenèse et est régulé à la hausse en cas de lésion. La FN-EDA peut se lier aux intégrines $\alpha 9\beta 1$ et $\alpha 4\beta 1$, médiant ainsi l'adhésion cellulaire (Liao et al., 2002). En outre, la FN-EDA peut activer les leucocytes par le biais de TLR2 et TLR4 *in vitro* (Okamura et al., 2001; Schoneveld et al., 2008). La FN-EDA est régulée à la hausse après l'IDM chez la souris (Arslan, Smeets, et al., 2011). De plus, les souris déficientes en FN-EDA présentent une diminution de l'inflammation, une réduction du recrutement des monocytes et une amélioration de la fonction cardiaque après un IDM (Arslan, Smeets, et al., 2011). Il a également été démontré que la FN-EDA pouvait contribuer aux lésions d'I/R myocardique *via* la signalisation médiée par TLR4 chez des souris hyperlipidémiques (Chorawala et al., 2018) et que l'administration d'un anticorps anti-fibronectine, 15 min après la reperfusion, a réduit la taille de l'infarctus après I/R dans le même modèle de souris (Chorawala et al., 2018). En outre, dans le cas d'un AVC ischémique, l'expression constitutive de la protéine FN-EDA a augmenté de manière significative l'infiltration des neutrophiles et des macrophages, ainsi que les cytokines inflammatoires et les lésions cérébrales. Il est intéressant de noter que le traitement par un inhibiteur spécifique de TLR4 abolit ces effets ce qui suggère que la protéine FN-EDA, en activant la voie de signalisation liée par TLR4, favorise l'inflammation et les lésions ultérieures (Khan et al., 2012). Bien qu'il n'y ait pas encore de preuves, on peut supposer que la protéine

FN-EDA fonctionne comme un signal de danger inductible après un IDM en attirant et en activant les leucocytes par l'intermédiaire du TLR et/ou la signalisation des intégrines.

6. ARN extracellulaire

Les molécules d'ARN peuvent être sécrétées activement ou passivement dans le milieu extracellulaire après les lésions d'I/R et il a été démontré qu'elles agissent comme des DAMPs en induisant des réponses pro-coagulatoires et pro-inflammatoires (Noll et al., 2017). Ces molécules d'ARN extracellulaires circulantes (ARNex) déclenchent une forte réponse immunitaire en stimulant la signalisation TRIF, l'induction de la sécrétion d'interféron (indépendamment de la signalisation TLR2/4-MyD88) et par interaction avec des différents TLRs, tels que TLR3, TLR7 et TLR8, à la fois *in vitro* et *in vivo* dans les lésions d'I/R myocardiques (Cavassani et al., 2008; C. Chen et al., 2014; Feng et al., 2015; Tatematsu et al., 2018). Il a également été démontré que le traitement par la RNase atténue la production de cytokines induite par la nécrose dans les cardiomyocytes et protège les souris contre les lésions I/R, marquée par une taille d'infarctus plus petite (C. Chen et al., 2014). Cet effet protecteur de l'inhibition de l'ARNex a été confirmé par l'administration de RNase1 non toxique, qui a entraîné une réduction de la taille d'infarctus et une préservation de la fonction cardiaque dans des modèles expérimentaux d'I/R myocardique chez des souris *in vivo* ainsi que dans le cœur de rat isolé et perfusé selon la technique de Langendorff (Cabrera-Fuentes et al., 2014). La même équipe a testé ce concept dans une étude clinique sur des patients subissant un pontage coronarien et a démontré qu'après un préconditionnement ischémique à distance, par quatre cycles de 5 minutes de gonflage et dégonflage d'un brassard de tensiomètre au niveau du bras gauche, avant l'intervention chirurgicale, les niveaux de RNase1 cardioprotecteurs ont augmenté, tandis que les concentrations d'ARNex et de TNF- α ont diminué. Cette étude ne rapporte pas les effets directs sur la fonction cardiaque ni ne prouve une causalité entre l'augmentation de RNase1 et la réduction de l'ARNex et du TNF- α . Le mécanisme exact de la cardioprotection induite par la RNase1 reste à clarifier (Cabrera-Fuentes et al., 2015). D'autres études ont mis au point une nanosonde multivalente de piégeage des acides nucléiques, le fluorochrome thiazole orange conjugué à un support de dextran (Dex-TO), pour piéger les acides nucléiques. Dex-TO a été administré par voie intraveineuse à des souris soumises à un IDM, initialement au début de l'I/R et à nouveau 4 heures plus tard, ce qui a entraîné une réduction de l'inflammation et une diminution de la taille d'infarctus chez les souris traitées au

Dex-TO (H. H. Chen et al., 2017). Ces données indiquent que les lésions tissulaires induites par l'ARN peuvent potentiellement être réduites par RNase, des inhibiteurs de TLR et d'autres composés chimiques piégeant l'ARN. Cependant, d'autres études expérimentales *in vivo* sur des modèles animaux et des données cliniques sont nécessaires pour soutenir ces effets bénéfiques observés dans les études expérimentales précliniques.

7. Histones extracellulaires

Il existe cinq types d'histones, classés en deux groupes : les histones centrales (H2A, H2B, H3 et H4) et les histones de liaison (H1 et sa variante H5). Les quatre histones centrales partagent des structures similaires avec un motif commun structurellement conservé appelé "pliage des histones " et une région de queue étendue mobile. La fonction la plus importante des histones dans le noyau est de construire les nucléosomes, qui sont les sous-unités de base de la chromatine. Le nucléosome est constitué de 147 paires de bases d'ADN enroulé sur environ un tour et demi autour d'un noyau protéique octamérique contenant deux dimères H2A-H2B et un tétramère (H3-H4) (Figure 1) (Andrews & Luger, 2011). L'histone de liaison H1 s'associe avec le nucléosome et facilite la construction de nombreux nucléosomes en structures chromatiniennes d'ordre supérieur. De plus, H5, une variante de H1, est l'histone lieur prédominante chez les érythrocytes aviaires. Les histones et leurs modifications post-traductionnelles ont des rôles clés dans le remodelage de la chromatine et la transcription des gènes.

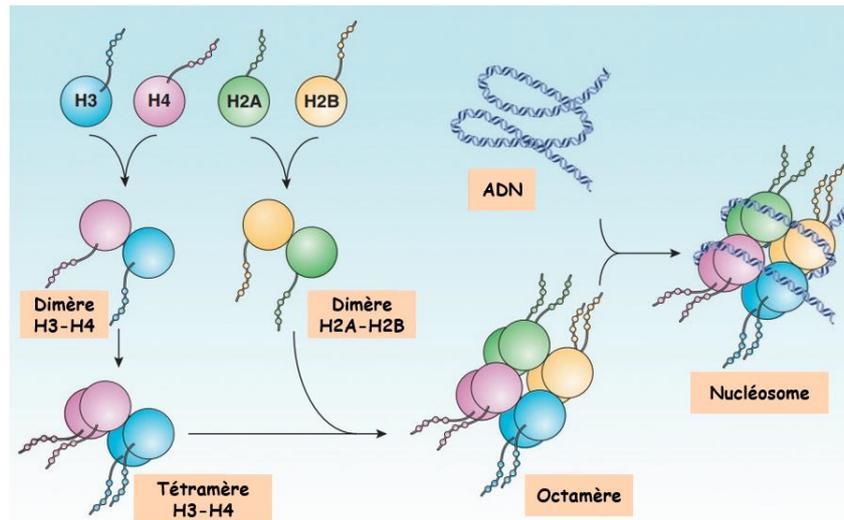


Figure 12 : Structure des histones et assemblage des nucléosomes. Un nucléosome contient un octamère de molécules d'histones. Un octamère contient un tétramère de H3-H4 et deux dimères H2A-H2B. Modifié d'après (R. Chen et al., 2014).

Leur libération dans le milieu extracellulaire est consécutive à des situations pathologiques comme le sepsis, les maladies auto-immunes, les cancers ou les coronaropathies (Borissoff et al., 2013; Holdenrieder et al., 2001; Zeerleder et al., 2003, 2012). Outre leur fonction nucléaire, les histones sont également connues pour être des DAMPs, ce qui a été d'abord démontré par l'observation que les souris meurent rapidement lorsque des histones libres sont administrées par voie intraveineuse (Xu et al., 2009). Dans un modèle d'AVC ischémique, la perfusion d'histones augmente la taille de l'infarctus cérébral et inversement, la neutralisation des histones par perfusion d'anticorps (anti-histone H2A/H4) réduit la taille de l'infarctus (De Meyer et al., 2012). Des effets cytotoxiques similaires des histones ont été démontrés dans des lésions rénales (Allam et al., 2012), dans le choc septique (Xu et al., 2009) et même dans le follicule pileux (Shin et al., 2012). Dans un modèle murin, il a été démontré que les histones provoquaient une toxicité des cardiomyocytes et dans un modèle d'I/R cardiaque *in vivo*, le traitement par la DNase 1 a perturbé la chromatine cytotoxique extracellulaire, entraînant une réduction de la concentration d'histones dans le myocarde (Vogel et al., 2015). Ce phénomène est corrélé à une amélioration significative du remodelage du ventricule gauche et de la survie des cardiomyocytes. En particulier, l'histone H4 a été récemment identifié comme le médiateur toxique de la mort des cellules musculaires lisses dans un modèle murin d'athérosclérose (Silvestre-Roig et al., 2019). L'effet cytotoxique des histones extracellulaires suggère qu'elles pourraient représenter une cible potentielle pour limiter les lésions I/R myocardiques (Shah et al., 2020).

DAMPs	PRR(s)	Référence(s)
HMGB1	RAGE, TLR2, TLR4, TLR9	(Andrassy et al., 2008; Egaña-Gorroño et al., 2020; F.-Y. Liu et al., 2019; Park et al., 2004; Y. Tian et al., 2019; Timmers et al., 2012)
ATP extracellulaire	P2X ₇ / NLRP3	(de Haan et al., 2013; Guerra Martinez, 2019; Mann, 2015; Newton & Dixit, 2012; Swanson et al., 2019)
ADN mitochondrial	TLR9, NLRP3, RAGE	(Arslan, de Kleijn, et al., 2011; de Haan et al., 2013; Newton & Dixit, 2012; Riley & Tait, 2020; Y. Tian et al., 2019; Timmers et al., 2012)
HSP70	TLR2, TLR4	(Arslan, de Kleijn, et al., 2011; de Haan et al., 2013; Mann, 2015; Satoh et al., 2006; Timmers et al., 2012)
HSP60	TLR2, TLR4	(Arslan, de Kleijn, et al., 2011; de Graaf et al., 2006; de Haan et al., 2013; S.-C. Kim et al., 2009, p. 60; Mann, 2015; Timmers et al., 2012)
FN-EDA	TLR2, TLR4	(Arslan, de Kleijn, et al., 2011; Arslan, Smeets, et al., 2011; Chorawala et al., 2018; de Haan et al., 2013; Okamura et al., 2001; Timmers et al., 2012)
ARN extracellulaire	TLR3, TLR7	(de Haan et al., 2013; Feng et al., 2015; Tatematsu et al., 2018; Timmers et al., 2012)
Histones extracellulaires	TLR2, TLR4, TLR9, NLRP3	(Allam et al., 2012, 2013; Ekane et al., 2014; H. Huang et al., 2011; X. Yang et al., 2016; Zindel & Kubes, 2020)

Tableau 2 : Principaux DAMPs et les récepteurs impliqués dans leur reconnaissance.

B. Les récepteurs de signaux de dangers endogènes ou PRRs

Les DAMPs sont reconnus par les PRRs, un ensemble hétérogène de récepteurs de l'immunité innée présents à la surface des cellules ou à l'intérieur des cellules ou sous forme solubles, induisant généralement la production de cytokines pro-inflammatoires. Les DAMPs peuvent agir sur plusieurs PRRs et plusieurs PRRs peuvent partager le même ligand. De même, l'activation de différents PRRs peut conduire à la même voie commune finale et à une réponse inflammatoire similaire (Feng & Chao, 2011; Lamkanfi & Dixit, 2012; Timmers et al., 2012).

1. Les TLRs

Les TLRs ont été identifiés en 1997 par Medzhitov et al. comme une partie importante du système immunitaire inné (Medzhitov et al., 1997). Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires hautement conservés avec un motif extracellulaire répété riche en leucine, qui sont exprimés par les cellules phagocytaires (cellules dendritiques, monocytes/macrophages, neutrophiles), également par les cellules de l'immunité adaptative (lymphocyte T et B) et par les cellules non immunitaires y compris les cardiomyocytes (Iwasaki & Medzhitov, 2004). À ce jour, 10 TLRs fonctionnels ont été identifiés chez l'homme dont six sont exprimés à la membrane cytoplasmique et sont activés par une variété de ligands exogènes/endogènes (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10) et quatre sont intracytoplasmiques et sont exprimés à la surface des endosomes (TRL3, TLR7, TLR8 et TLR9) qui sont surtout activés par des acides nucléiques (Mann, 2011; Y. Wang et al., 2010). L'expression de l'ARNm de tous les 10 TLR a été identifiée dans le tissu cardiaque humain avec une plus haute expression de TLR4, tandis que TLR8, TLR9 et TLR10 sont les moins exprimés (Nishimura & Naito, 2005).

Après interaction ligand-récepteur, un élément clé de l'activation du TLR est le recrutement des protéines adaptatrices au domaines cytoplasmiques du récepteur telles que : MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptator inducing interferon beta*), TIRAP (*TIR domain containing adaptator protein*) et TRAM (*TRIF-related adaptator molecule*). On peut distinguer deux voies de signalisation selon la molécule adaptatrice qui est utilisée par le TLR : une voie dépendante de MyD88 et une voie indépendante de MyD88. Certains TLRs, dont TLR4, utilisent des voies mixtes dépendantes et indépendantes de MyD88. Ces protéines adaptatrices sont recrutées suite au changement de conformation du TLR par formation d'homo ou hétéro dimères après interaction ligand-récepteur. Ceci va induire une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à la translocation de facteurs de transcription comme NF- κ B, AP-1 (*activator protein 1*) et IRF (*interferon regulatory factor*), conduisant à la transcription de multiples gènes impliqués dans la réponse inflammatoire dont les cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α , IL-1), des chimiokines et les interférons de type 1. Leur sécrétion dans le milieu extracellulaire va induire le recrutement des cellules immunocompétentes supplémentaires ainsi que l'infiltration du myocarde infarci par les leucocytes (Figure 13) (de Haan et al., 2013).

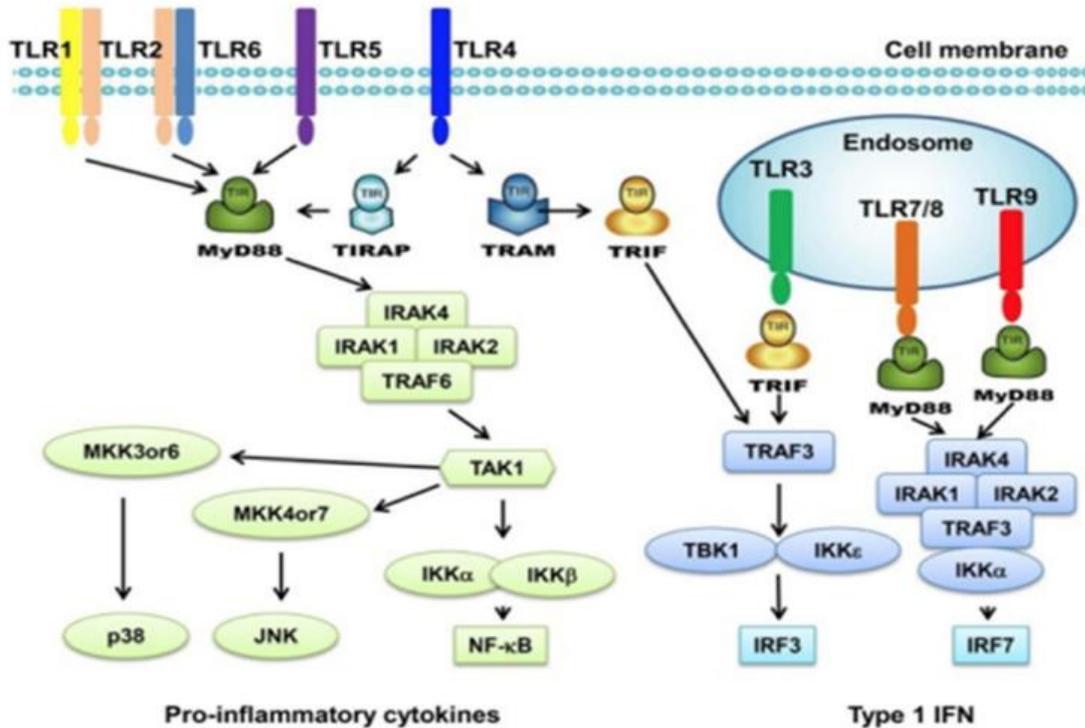


Figure 13 : Voies de signalisation simplifiées des TLRs. D'après (El-Zayat et al., 2019).

Les récepteurs TLR et leurs ligands endogènes peuvent être une potentielle cible pour le traitement contre les lésions d'I/R. Les récepteurs les plus étudiés dans l'I/R myocardique sont les TLR2 et TLR4 (Feng & Chao, 2011). Des manipulations soit génétiques soit pharmacologiques de ces deux récepteurs montrent des effets cardioprotecteurs dans un modèle d'infarctus myocardique en diminuant la taille d'infarctus (Feng & Chao, 2011; Zuurbier et al., 2019).

TLR2

Plusieurs études ont indiqué que le TLR2 est impliquée dans les lésions I/R du myocarde. Dans un modèle *ex vivo* d'I/R, des souris KO pour TLR2 ont présenté une meilleure récupération de la fonction cardiaque par rapport aux souris *wild type* (Sakata et al., 2007). TLR2 est également impliqué dans le dysfonctionnement endothélial après I/R (Favre Julie et al., 2007). De plus, Arslan et ses collègues ont démontré que les leucocytes exprimant TLR2 jouent un rôle important dans les lésions myocardiques d'I/R. Ils ont montré que les souris *wild type* avec des cellules circulatoires dérivées d'une moelle osseuse de souris KO TLR2^{-/-} ont été protégées

contre les lésions d'I/R (Arslan Fatih et al., 2010). Ces résultats prometteurs ont conduit au développement et à l'étude d'un anticorps monoclonal anti-TLR2, OPN-305 (OPN-301 chez la souris). L'administration d'OPN-301 chez des souris subissant un IDM induit une réduction de la taille d'infarctus, une diminution de l'inflammation et une meilleure récupération de la fonction cardiaque par rapport aux souris témoins (Arslan Fatih et al., 2010; Mersmann et al., 2011). Cet effet a été attribué à la réduction de l'afflux de leucocytes, à la diminution de la production de cytokine pro-inflammatoires et à une meilleure survie des cardiomyocytes ((Arslan Fatih et al., 2010). Dans un modèle d'I/R myocardique chez le porc, l'administration intraveineuse d'OPN-305 15 minutes avant la reperfusion a entraîné une réduction dose-dépendante de la taille d'infarctus (45% de réduction avec la dose la plus élevée d'OPN-305 (12.5 mg/kg)) et a préservé la fonction systolique. Cependant, les auteurs n'ont pas observé des signes de réduction d'inflammation myocardique (Arslan et al., 2012).

TLR4

Oyama et ses collègues ont démontré qu'après une ischémie d'une heure par occlusion de l'artère coronaire suivie de 24 h de reperfusion, les souris déficientes en TLR4 présentent une réduction de plus de 50 % de la taille d'infarctus par rapport aux souris témoins ainsi qu'une diminution de l'inflammation (Oyama Jun-ichi et al., 2004). Dans un modèle similaire d'occlusion coronaire d'une heure suivie d'une reperfusion, Chong et al. ont montré une protection cardiaque avec une réduction de 40% de la taille d'infarctus chez des souris C3H/HeJ, exprimant un TLR4 non fonctionnel, par rapport aux souris *wild type* (Chong et al., 2004). L'I/R chez les souris C3H/HeJ induit aussi une réduction significative de l'activité de protéine JNK ainsi que la translocation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et les niveaux d'ARNm de cytokines pro-inflammatoires par rapport aux souris WT (Chong et al., 2004). De plus, le traitement par un antagoniste spécifique de TLR4, l'eritoran, induit une cardioprotection objectivée par une diminution de la taille de l'infarctus et une diminution de la réponse inflammatoire par une phosphorylation réduite de JNK, une translocation nucléaire de NF- κ B atténuée et une diminution des niveaux d'ARNm de cytokines pro-inflammatoires (Shimamoto Akira et al., 2006). TLR4 est impliqué aussi dans la production systémique de cytokines pro-inflammatoires après une I/R myocardique. Kim et al. ont mesuré le taux de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL6) dans le myocarde et dans le sérum chez des souris C3H/HeJ et leurs congénères *wild type* après une I/R myocardique (S.-C. Kim et al., 2007). Une augmentation de taux sérique et myocardique de cytokines pro-inflammatoires en

réponse à 1 h d'ischémie et 2 h de reperfusion *in vivo* alors que l'absence du TLR4 fonctionnel induit une réduction sérique significative de cytokines pro-inflammatoires, et une réduction myocardique significative seulement de l'IL-6 avec diminution de la taille d'infarctus (S.-C. Kim et al., 2007).

Autres TLRs

Bien que les autres TLRs fassent l'objet d'une étude moins approfondie, certains de ces récepteurs se sont révélés être impliqués dans l'inflammation post-IDM. Les souris déficientes pour TLR3 et TLR7 ont développé des IDM plus petits, avaient moins d'afflux de cellules inflammatoires et une meilleure fonction cardiaque par rapport aux souris sauvages (de Kleijn et al., 2019; Lu et al., 2014). Récemment, il a également été démontré que TLR9 contribue à la réponse inflammatoire post-IDM dans un modèle de souris par une stimulation par HMGB-1 et l'ADNmt (Y. Tian et al., 2019). Cependant, une autre étude a observé que TLR9-HMGB-1 était essentiel à la survie des cellules myocardiques, à la cicatrisation et à l'angiogenèse dans un modèle d'IDM chez la souris (F.-Y. Liu et al., 2019). Des études expérimentales sur le rôle de TLR5 ont également été réalisées et il est bien exprimé dans le cœur des souris, des rats et des humains (Rolli et al., 2010). La déficience en TLR5 dans les modèles *knock out* a augmenté la taille de l'infarctus et le stress oxydatif myocardique, ce qui suggère que TLR5 est impliqué dans la signalisation cardioprotectrice (Parapanov et al., 2015). Le rôle de TLR8 n'est pas complètement clair, mais la myosine cardiaque humaine, une fois libérée après une lésion des cardiomyocytes, peut agir comme un ligand pour TLR8 (P. Zhang et al., 2009). Les voies qui sont induites par d'autres TLRs, contribuant aux lésions I/R myocardiques ou les entravant, n'étant pas entièrement étayées, des recherches plus approfondies seront nécessaires avant que ces PRRs puissent être évalués en tant que cibles thérapeutiques.

2. Le récepteur RAGE

En 1992, le récepteur RAGE a été mentionné pour la première fois comme un récepteur impliqué dans la liaison des produits de glycation non enzymatiques et d'oxydation des protéines et des lipides (Egaña-Gorroño et al., 2020; A. M. Schmidt et al., 1992). D'autres recherches ont révélé que RAGE est exprimé par de multiples types de cellules, notamment les cardiomyocytes, les cellules vasculaires, les fibroblastes et les cellules inflammatoires infiltrées

et peut agir comme un PRR pour une variété de DAMPs, tels que le HMGB-1 et les protéines S100 (Egaña-Gorroño et al., 2020). Une fois activé, le RAGE facilite la translocation du NF- κ B vers le noyau entraînant la transcription de cytokines pro-inflammatoires (J. Xie et al., 2013). Les preuves du lien entre RAGE et l'IDM et les lésions I/R remontent à 2006. Des souris *knock-out* pour RAGE ont montré des caractéristiques cardioprotectrices dans le cadre des lésions I/R et une augmentation de l'expression de RAGE a été montrée dans les cœurs de rats ischémiques. En outre, le prétraitement par blocage pharmacologique de RAGE a réduit les lésions d'I/R (Bucciarelli et al., 2006). Il a été démontré que l'administration d'HMGB1 recombinant aggrave les lésions myocardiques induites par une I/R suggérant l'implication de RAGE dans la réponse inflammatoire post-IDM (Andrassy et al., 2008). En outre, les souris déficientes pour RAGE sont protégées contre l'IDM, protection associée à une moindre accumulation de cellules inflammatoires dans la zone infarctée (Volz et al., 2012). Par conséquent, le blocage combiné de la signalisation de RAGE par siRNA (*small interfering RNA*) et le RAGE soluble a protégé de manière synergique contre les lésions myocardiques après l'IDM (Ku et al., 2015).

3. Les récepteurs de type NOD

Les récepteurs de type NOD (NLR, *nucleotide oligomerization domain receptors*) sont des récepteurs intracellulaires qui peuvent reconnaître une grande variété de DAMPs. Certains sont connus pour former des complexes multiprotéiques appelés « inflammasomes » (Platnich & Muruve, 2019). L'activation de l'inflammasome est un processus qui nécessite deux étapes : amorçage (*priming*) et activation. Le signal d'amorçage est fourni par l'interaction des DAMPs avec les PRRs, tels que les TLRs, ce qui conduit à la régulation positive des différents composants de l'inflammasome *via* l'activation du NF- κ B (Swanson et al., 2019). Le signal d'activation est à nouveau fourni par des multiples DAMPs, y compris l'ATP extracellulaire et les DAMPs intracellulaires comme les ROS (Swanson et al., 2019). Cela conduit à l'assemblage des multiples composants de l'inflammasome, ce qui entraîne un changement de conformation de la caspase-1. A son tour, cela permet la maturation et la libération de cytokines, les interleukines IL-1 β et IL-18, induisant ainsi une puissante réponse inflammatoire (Swanson et al., 2019). De plus, la caspase-1 va induire la pyroptose, qui est une forme pro-inflammatoire de la mort cellulaire régulée (décrite ci-dessus).

L'inflammasome le plus étudié est l'inflammasome NLRP3 et il a été associé à de nombreuses maladies cardiovasculaires (Mauro et al., 2019; Toldo & Abbate, 2018; Weigt et al., 2017). Il

est constitué de trois composants : (1) NLRP3, (2) la protéine adaptatrice ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain*) et (3) la caspase-1 (Figure 14). Les modèles de *knock-out* et l'administration d'ARNs interférents pour des composants de l'inflammasome NLRP3 ont révélé un rôle possible de l'inflammasome NLRP3 dans les lésions I/R myocardiques (Kawaguchi et al., 2011; Mezzaroma et al., 2011). En outre, il a été démontré que les lésions I/R induisent une forte expression de NLRP3 et de la caspase-1 dans le cœur de la souris (Mastrocola, Collino, et al., 2016). Ces résultats expérimentaux ont conduit au développement d'inhibiteurs sélectifs de NLRP3 qui ont été testés sur des modèles animaux de lésions I/R. Plusieurs composés ont montré qu'ils préservaient la fonction cardiaque et réduisaient la taille de l'infarctus.

Le prétraitement avec INF4E, un composé qui inhibe l'activité ATPase de NLRP3, réduit la taille de l'infarctus et améliore la pression ventriculaire gauche post-ischémique chez des rats (Mastrocola, Penna, et al., 2016). 16673-34-0, un inhibiteur de l'inflammasome NLRP3 dérivé du glyburide, a réduit l'activité de la caspase-1 dans les cardiomyocytes après stimulation par le LPS (amorçage) et l'ATP (activation) *in vitro*. Dans un modèle murin d'IDM, le traitement avec le 16673-34-0 induit une réduction de 40 % de la taille de l'infarctus (Marchetti et al., 2015). Plus récemment, l'OLT1177 (le dapansutrine), un inhibiteur de l'inflammasome NLRP3, a montré qu'il réduisait la taille de l'infarctus jusqu'à 70 % dans plusieurs scénarios expérimentaux d'I/R chez les souris (temps d'ischémie plus ou moins long, administration pendant la reperfusion et après 1 h de reperfusion) (Toldo et al., 2019). De plus, la fonction cardiaque 24 heures et 7 jours après la reperfusion était significativement améliorée par rapport au placebo et l'activité de la caspase-1 dans le cœur réduite de 50 %. Une étude a testé l'effet de l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 chez le porc (G. P. J. van Hout et al., 2017). L'administration quotidienne pendant 7 jours de MCC950, inhibiteur de l'inflammasome NLRP3, a permis de réduire la taille de l'infarctus jusqu'à 16 % et préserver la fonction cardiaque de manière dose-dépendante dans un modèle porcin d'occlusion de l'artère descendante antérieure gauche pendant 75 minutes (G. P. J. van Hout et al., 2017).

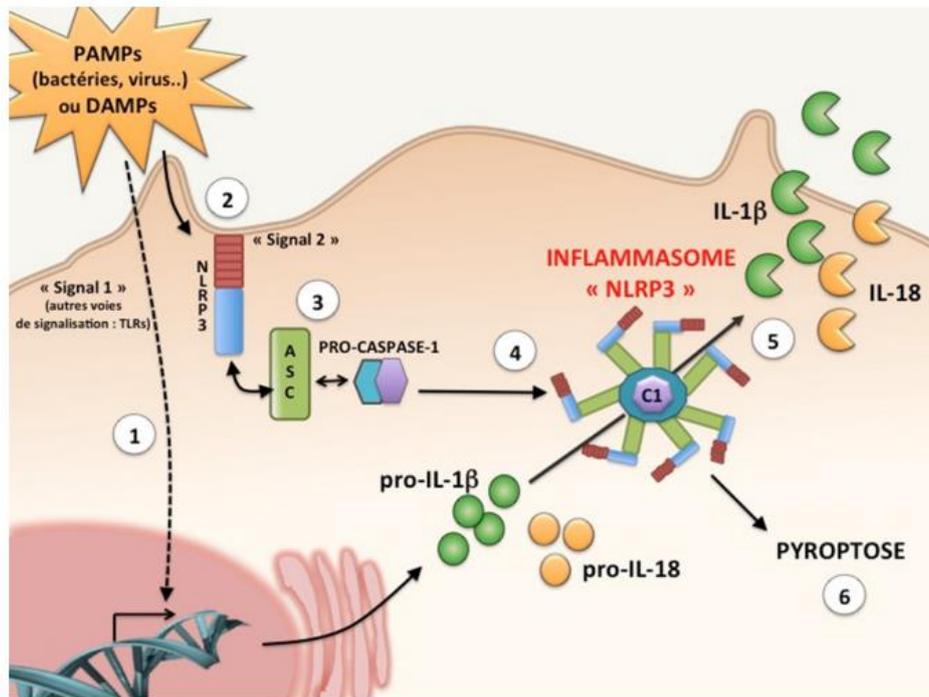


Figure 14 : Structure et fonctionnement de l'inflammasome NLRP3. 1 : La présence de PAMPs ou de DAMPs entraîne la synthèse de pro-IL-1 (signal 1); 2 : Les PAMPs/DAMPs activent aussi NLRP3 (signal 2) et entraînent un changement conformationnel de ce récepteur intra-cytoplasmique; 3 : Ce changement conformationnel permet son interaction avec la protéine adaptatrice ASC et de ASC avec la procaspase-1; 4 : Ces trois partenaires s'oligomérisent pour former un hétéro-heptamère qui constitue la plateforme de « l'inflammasome NLRP3 » dans laquelle est activée la caspase-1; 5 : Caspase-1 active (C1) clive le pro-domaine des pro-cytokines IL-1 et IL-18 inactives. Ce clivage entraîne leur activation et leur sécrétion ; 6 : Dans le même temps, la caspase-1 déclenche la mort inflammatoire de la cellule par pyroptose. D'après (Jamilloux et al., 2014).

4. Les récepteurs purinergiques P2X₇

Dans une cellule saine, l'ATP est généré au niveau intracellulaire et est libéré à travers des canaux transmembranaires vers l'espace extracellulaire de manière régulée. Cependant, en cas de danger, de dommages et/ou de stress, des niveaux très élevés d'ATP sont transloqués vers l'espace extracellulaire, agissant comme des DAMPs en activant le récepteur purinergique P2X₇ (P2X₇ R) (Mariathasan et al., 2006). L'activation de P2X₇ entraîne un efflux de potassium qui conduit à l'activation de voies de signalisation intracellulaires provoquant la libération de cytokines pro-inflammatoires (Guerra Martinez, 2019). La fonction la plus étudiée de P2X₇ dans les lésions I/R est probablement son rôle dans l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et sa maturation ultérieure (Guerra Martinez, 2019).

Dans un modèle d'IDM chez le rat, il a été démontré que l'injection intramyocardique d'un petit ARN en épingle à cheveux (shARN) spécifique de P2X₇ directement après la ligature coronaire et l'induction ultérieure de l'IDM entraîne le blocage de la signalisation P2X₇, ce qui se traduit par les résultats suivants : une réduction de l'infiltration des cellules circulantes, une réduction de la taille de l'infarctus et une amélioration de la fonction cardiaque. Il a été démontré que cet effet était associé à l'inhibition des voies Akt et ERK1/2 et à l'activation du NF-κB (H. Gao et al., 2017). Une autre étude réalisée sur des cœurs de rats a montré qu'un siARN long non codant (NONRATT021972) a diminué l'expression de P2X₇ dans le ganglion cervical supérieur et améliorait la fonction cardiaque chez le rat après un infarctus dans un modèle de ligature coronaire permanente (Tu et al., 2016). Ces résultats ont été étayés par une étude portant sur le PPADS (pyridoxalphosphate-6'-azophényl-2',4'-disulfonate), un inhibiteur pharmacologique de P2X₇. *In vitro*, le PPADS a significativement réduit la mort cellulaire des cellules exposées à l'ischémie. *In vivo*, le PPADS a réduit la taille de l'infarctus et amélioré la fonction cardiaque chez les souris dans un modèle de ligature permanente (Mezzaroma et al., 2011).

5. Les pentraxines

Les pentraxines font partie des PRRs solubles. Cette famille de PRRs est composée des molécules solubles de reconnaissance fonctionnant comme des récepteurs sériques dont le rôle est d'opsoniser les microbes ou des éléments du soi modifié (cellules apoptotiques ou nécrotiques) afin de faciliter leur élimination par les phagocytes permettant ainsi d'activer et/ou d'amplifier le système du complément. Les pentraxines appartiennent à une famille de protéines phylogénétiquement conservées et sont divisées en deux groupes selon la longueur de leur structure primaire : les pentraxines courtes et les pentraxines longues (Garlanda et al., 2005). La famille des pentraxines courtes, représentées par la protéine C-réactive (CRP, *C-reactive protein*) et le composant sérique amyloïde P (SAP, *Serum amyloid P-component*), sont produites dans le foie sous l'effet de stimuli pro-inflammatoires, principalement l'IL-6. La CRP et le SAP se lient toutes les deux à différents ligands des microbes et des composants de l'hôte de manière dépendante du calcium, un mécanisme associé à l'immunité innée contre les pathogènes et également à l'élimination des débris cellulaires (Pepys & Hirschfield, 2003). Les pentraxines longues dont le prototype est la molécule pentraxine-3 (PTX3), est fortement sécrétée à la phase aiguë de l'inflammation en réponse à de nombreux stimuli y compris les cytokines pro-inflammatoires, IL-1, TNF-α et IL-6 (Latini et al., 2004; Muller et al., 2001).

PTX3

Le PTX3 peut être libéré par les neutrophiles en phase précoce et par les macrophages et les cellules endothéliales en phase tardive de l'IDM (Nebuloni et al., 2011, p. 3) et des preuves suggèrent que le cœur est un site majeur d'expression de PTX3 (Introna et al., 1996) ce qui pourrait contribuer à son implication dans de multiples maladies cardiovasculaires. Une analyse transcriptomique du sang complet obtenue après une chirurgie cardiaque a permis d'identifier PTX3 comme un marqueur potentiel d'infarctus et de lésions irréversibles du myocyte dans la cardiopathie ischémique (Liangos et al., 2010). En utilisant un modèle expérimental d'IDM et des échantillons de sang de patients IDM, Maugeri et ses collaborateurs ont démontré que les neutrophiles étaient la principale source d'augmentation du PTX3 pendant la phase précoce de l'infarctus (dans les 6 heures post-IDM) dans le sang des patients ayant subi un IDM. De plus, les plaquettes activées étaient responsables du déclenchement de la libération de PTX3 par les neutrophiles. En effet, une fraction substantielle de PTX3 a été observée sur les membranes cellulaires des plaquettes circulantes chez les patients atteints d'IDM. En présence de PTX3, la formation d'une agrégation plaquettes-neutrophiles a été inhibée, ce qui a été associé à une moindre efficacité des plaquettes à réguler l'expression des intégrines CD11b/CD18, une étape critique pour que les leucocytes adhèrent et transmigrent dans les tissus endommagés (Maugeri et al., 2011). Ces résultats suggèrent que le PTX3 diminue la réponse inflammatoire déclenchée par les plaquettes activées, limitant ainsi les effets délétères des neutrophiles dans le cœur.

D'autres études ont également suggéré que PTX3 a des fonctions protectrices importantes dans le cadre de l'IDM. Par exemple, la protéine exogène PTX3 joue un rôle protecteur dans les lésions d'I/R myocardiques en prévenant l'apoptose des cardiomyocytes et en réduisant la production de troponine chez les souris, ce qui a été associé à une amélioration de la performance hémodynamique (Zhu et al., 2014). Cette étude a également démontré un important effet de PTX3 sur la fonction cellulaire en limitant l'expansion et l'activation des cellules $T\gamma\delta$ et en diminuant l'expression locale des cytokines pro-inflammatoires IL-23 et IL-17A et l'infiltration des neutrophiles dans le tissu. En outre, en utilisant un modèle expérimental d'IDM chez les souris, les chercheurs ont identifié une cinétique de l'ARNm de PTX3 dans la circulation qui atteint un pic après 24 heures et revient à son niveau basal après 3 jours (Salio et al., 2008). Dans la même étude, des souris déficientes pour PTX3 ont présenté des lésions myocardiques accrues après un IDM, avec extension de la zone *no-reflow*, une accumulation intense de leucocytes dans la zone lésée, et un nombre élevé de cardiomyocytes apoptotiques. Il est intéressant de noter que la perfusion de PTX3 exogène chez ces souris a inversé ce

phénotype (Salio et al., 2008). Ainsi, PTX3 semble jouer un rôle protecteur pour réduire les dommages du myocarde en réduisant l'inflammation. En plus de son rôle potentiel thérapeutique, il est suggéré que le PTX3 pourrait être utilisé comme une composante inflammatoire importante de la cardiopathie ischémique chez l'homme. Peri et ses collègues ont démontré que les taux plasmatiques de PTX3 s'élevaient après un IDM plus rapidement que la CRP, ce qui suggère que le PTX3 pourrait être utilisé comme un indicateur précoce des lésions d'I/R cardiaques (Peri et al., 2000). Le PTX3 est présent dans les cardiomyocytes normaux (Peri et al., 2000). L'augmentation du PTX3 dans le sang pourrait être une conséquence de sa libération à partir de cardiomyocytes nécrotiques en raison d'une perméabilité membranaire accrue (Lagrand et al., 1997).

CRP

La CRP est un marqueur de la phase aiguë de l'inflammation. Son taux plasmatique augmente dans les heures qui suivent le début de l'inflammation. Elle a une demi-vie de 24-48 heures au cours de laquelle l'inflammation prend fin. Son taux de production est directement corrélé à la sévérité de l'inflammation. Les valeurs de la CRP peuvent être utiles pour déterminer l'évolution de la maladie ou l'efficacité des traitements (Di Napoli et al., 2011). Sa concentration sérique augmente en réponse à une inflammation. Il se lie à la phosphocholine avec une haute affinité en présence de calcium et active le système du complément via C1q (Gershov et al., 2000; Yadav et al., 2014). Cela favorise ensuite la phagocytose par les macrophages afin de cibler une série d'agents pathogènes ainsi que les membranes des cellules hôtes endommagées et nécrosées. La CRP, ainsi que d'autres protéines de la phase aiguë, est une composante importante de la première ligne de défense innée de l'hôte.

Ces dernières années, le point de vue sur le rôle de la CRP est passé d'une innocente protéine de la phase aiguë à un médiateur des dommages tissulaires (Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2012). Il a été observé que des niveaux élevés de CRP circulants après un infarctus étaient corrélés au pronostic des événements cardiovasculaires (Ridker, Hennekens, et al., 2000). La CRP peut directement interagir avec les vaisseaux athérosclérotiques ou le myocarde ischémique par l'activation du système du complément, favorisant ainsi l'inflammation et la thrombose (Dutta et al., 2012; Riedemann & Ward, 2003). Paraskevas et Mikhailidis (Paraskevas & Mikhailidis, 2008) ont fait remarquer que la CRP n'est pas seulement un spectateur innocent mais qu'elle participe activement au processus pathogène de l'IDM et

des lésions de reperfusion et que la CRP est également localisée dans le myocarde infarci des lapins. Des travaux ont permis de découvrir que la CRP et les fragments de complément activés sont co-localisés dans le myocarde infarci mais pas dans le myocarde normal des patients atteints d'IDM (Nijmeijer et al., 2004). Des études ont également montré que des taux élevés de CRP correspondaient à une augmentation de la taille de l'infarctus (Mihlan et al., 2011; Pearson et al., 2003). L'injection de CRP humaine à des rats après la ligature de l'artère coronaire a augmenté la taille de l'infarctus d'environ 40 % (Kluft, 2004). La CRP, entre autres facteurs, sert également de médiateur à l'activation du complément dans le myocarde infarci (Krijnen et al., 2006; Mihlan et al., 2011). Il a été constaté que les complexes CRP-C3d et CRP-C4d sont plus élevés chez les patients atteints d'IDM que chez les contrôles (groupe sujets sains) ou chez les patients présentant une angine de poitrine instable (Nijmeijer et al., 2002).

C. Le facteur de transcription nucléaire κ B (NF- κ B)

Bien que NF- κ B ne soit ni un DAMP ni un PRR, il est considéré comme un facteur crucial dans la cascade de signalisation, en aval, après l'activation des PRRs, en particulier les TLRs et les RAGEs. Les dimères NF- κ B sont généralement situés dans le cytoplasme sous forme d'un complexe inactif avec son inhibiteur naturel, I κ B- α (*nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor alpha*) (Akira & Takeda, 2004). L'activation du NF- κ B nécessite la libération d'I κ B- α , suivie d'une translocation vers le noyau. La libération d'I κ B- α est médiée par IKK (I κ B kinase). IKK se compose de deux parties catalytiques, IKK- α et IKK- β , et d'une partie régulatrice IKK-g. Après l'activation par la liaison DAMP-PRR en amont, IKK phosphoryle rapidement I κ B, ce qui permet au complexe d'entrer dans le noyau (Akira & Takeda, 2004). Après translocation, la liaison du NF- κ B à l'ADN se produit et la transcription des cytokines inflammatoires est initiée (Akira & Takeda, 2004; G. P. van Hout et al., 2016).

Des études utilisant des modèles de rongeurs déficients en NF- κ B ou en ses sous-unités ou des modèles de souris surexprimant I κ B- α ont montré une réduction de la libération de cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF- α) et des tailles d'infarctus plus petits après une I/R myocardique (Maimaitiaili et al., 2018; Squadrito et al., 2003; X. Q. Zhang et al., 2013). En outre, divers inhibiteurs (directs et indirects) du NF- κ B ont été développés et testés dans des modèles précliniques d'I/R myocardique (Y. S. Kim et al., 2010; Pye et al., 2003; Stansfield et al., 2007; Zingarelli et al., 2002). Une étude a montré que le BAY 11-7082, un composé qui est connu pour réguler négativement l'activation du NF- κ B, administré dans un modèle d'I/R chez le rat

réduit l'inflammation cardiaque et la taille de l'infarctus (Y. S. Kim et al., 2010). Des effets similaires ont été observés chez la souris avec le BAY 65-1942, un inhibiteur qui cible sélectivement l'activité de kinase de IKK- β (Moss et al., 2007).

En outre, l'inhibition pharmacologique du protéasome qui est nécessaire à la libération d' I κ B- α , a également préservé de façon significative la fonction cardiaque, a réduit la taille de l'infarctus et a atténué l'expression des gènes inflammatoires dans un modèle murin d'I/R (Stansfield et al., 2007). De même, l'administration du tacrolimus, un inhibiteur de la calcineurine, après une reperfusion bloque l'activation précoce du NF- κ B dans un modèle d'I/R chez le rat, avec une réduction ultérieure de la nécrose myocardique, de l'activité de la myéloperoxydase, de l'activation du gène ICAM-1 et de l'accumulation de leucocytes (Squadrito et al., 2000).

Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de l'inhibition du NF- κ B dans l'IDM. En accord avec de nombreuses cibles thérapeutiques précédemment discutées, la traduction en clinique n'a pas été couronnée de succès jusqu'à présent. Une raison potentielle de l'entrave à la traduction clinique pourrait être l'activation d'autres facteurs de transcription, parallèlement au NF- κ B après l'interaction DAMP-PRR. Un exemple est la translocation du facteur IRF3 après l'activation du TLR. Cette voie entraîne une augmentation de l'apoptose cardiaque et la libération de cytokines inflammatoires, telles que les interférons de type 1, qui pourraient également jouer un rôle dans l'I/R myocardique lorsque NF- κ B est inhibé (C. Chen et al., 2014; King et al., 2017; ter Horst et al., 2019).

II. Effecteurs cellulaires de la réponse inflammatoire

Le recrutement des cellules inflammatoires est un processus dynamique et orchestré comprenant une infiltration séquentielle du myocarde lésé par des neutrophiles, des phagocytes mononucléés, des cellules dendritiques et des lymphocytes (Figure 15). Cependant, il existe déjà un nombre important de cellules immunitaires résidentes même dans le cœur sain (Bajpai et al., 2018; Pinto et al., 2012) dont certaines sont connues pour initier la réponse du cœur à l'I/R. Dans les cœurs de souris, il y a environ 2300 leucocytes résidents/mg de tissu (Bönner et al., 2012). Ceux-ci sont constitués d'environ 25% de cellules lymphoïdes [principalement des cellules B et T mais aussi de certaines cellules tueuses naturelles (NK pour *natural killer*)] et d'environ 75% de cellules myéloïdes (principalement des macrophages, certains neutrophiles et

un faible nombre de monocytes, de cellules dendritiques, d'éosinophiles et de mastocytes) (Yu et al., 2016). Les macrophages résidents semblent avoir un rôle dans l'activité contractile du cœur (Hulsmans et al., 2017).

A. Les neutrophiles

Les neutrophiles constituent normalement la première ligne de défense contre les envahisseurs, les microorganismes et les lésions tissulaires (Prabhu & Frangogiannis, 2016). Après l'IDM, les leucocytes polymorphonucléaires (PMNs) de la moelle osseuse se mobilisent dans le sang et sont la première sous-population leucocytaire à arriver au niveau du myocarde lésé. Ils sont présents dans les heures qui suivent l'IDM atteignant un pic d'accumulation entre le 1^{er} et le 3^{ème} jour post-IDM et commençant à diminuer au 5^{ème} jour. Les neutrophiles ont tendance à cibler la zone bordant le territoire ischémique et leur accumulation est accentuée lors de la reperfusion. Les PMNs sont recrutés dans le myocarde lésé en réponse à une forte concentration de facteurs chimiotactiques ainsi qu'aux DAMPs générés par le myocarde lésé, entraînant l'activation des cellules endothéliales locales favorisant leur adhésion et leur recrutement. Ici, ils quittent la circulation et s'infiltrent dans le myocarde lésé à travers l'endothélium des veinules post-capillaires en 3 étapes séquentielles, un processus appelé extravasation :

- (1) Les PMNs adhèrent d'abord aux cellules endothéliales et roulent dessus en se liant à la sélectine P, à la sélectine E, aux molécules d'adhésion intercellulaire (ICAMs, *intracellular adhesion molecules*) et aux molécules d'adhésion cellulaire vasculaire exprimées sur les cellules endothéliales activées.
- (2) Une adhésion ferme se produit ensuite par l'interaction des intégrines, $\alpha_1\beta_2$ et $\alpha_M\beta$, présentes sur les PMNs avec leurs ligands, ICAM-1 et ICAM-2, présents sur les cellules endothéliales.
- (3) Enfin, la migration transendothéliale ou diapédèse des PMNs à travers les cellules endothéliales est également médiée par les intégrines $\alpha_1\beta_2$ et $\alpha_M\beta$, ICAM-1 et ICAM-2.

Une fois dans le myocarde lésé, les PMNs jouent de multiples rôles notamment la phagocytose des débris cellulaires, la dégradation de la matrice extracellulaire par la libération de granules contenant des métalloprotéinases matricielles (MMPs, *matrix metalloproteinases*), la production de ROS et la sécrétion de facteurs chimiotactiques permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires. Une infiltration excessive de PMNs et/ou leur élimination tardive peut exacerber les lésions myocardiques en prolongeant la réponse pro-inflammatoire.

Ma et al. en 2016 ont récemment suggéré que les neutrophiles infiltrants peuvent être polarisés après l'IDM, ce qui ouvre des possibilités de modulation thérapeutique de la polarisation des neutrophiles en tant que stratégie pour prévenir l'inflammation et donc de cardioprotection. Ils ont constaté que les neutrophiles prélevés dans le myocarde au jour 1 après l'IDM avaient une expression élevée de marqueurs pro-inflammatoires et étaient polarisés par l'activation de TLR4 (appelés neutrophiles N1 et induits par le lipopolysaccharide et l'interféron- γ), tandis que ceux prélevés dans le cœur aux jours 5-7 post-IAM, étaient anti-inflammatoires (appelés neutrophiles N2 et induits par l'interleukine-4) (Y. Ma et al., 2016). Il a été démontré que la perte de l'intégrine CD11/CD18 (qui permet aux neutrophiles de se lier à l'endothélium et de le traverser) a permis de réduire la taille de l'infarctus dans des modèles d'IDM chez le petit et le gros animal ((Arai et al., 1996; Aversano et al., 1995; Lefer et al., 1993; Tanaka et al., 1993).

La durée de vie des neutrophiles est courte. Les neutrophiles apoptotiques sécrètent des signaux « trouvez-moi », les médiateurs lipidiques tels que les lipoxines et les résolvines, les nucléotides, et des signaux « mangez-moi », le lysophosphatidylcholine, (Bratton & Henson, 2011; Frangogiannis, 2012) induisant la migration des phagocytes. La clairance de ces cellules mortes par les phagocytes, mécanisme appelé efferocytose, reprogramme les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire qui mène à la résolution de la cascade pro-inflammatoire (Soehnlein & Lindbom, 2010). Cependant, les médiateurs lipidiques tels que la lactoferrine et l'annexine A1, libérés par les neutrophiles apoptotiques, inhibent l'afflux des neutrophiles tout en favorisant la migration des monocytes (Maddox et al., 1997) dans le tissu infarci. D'autre part, certaines molécules relarguées depuis les granules des neutrophiles infiltrants (*cathepsin G*, *azurocidin* et *peptide antimicrobien cathelicidine*) favorisent le recrutement de la deuxième vague de la population leucocytaire : les monocytes et les macrophages (Soehnlein & Lindbom, 2010).

B. Les monocytes et les macrophages

Les monocytes produits dans la moelle osseuse et la rate pénètrent dans le sang après l'IDM et sont recrutés dans le myocarde lésé en deux phases :

- La première phase est dominée par la sous-population monocyttaire à phénotype pro-inflammatoire, les monocytes Ly-6C^{high} chez la souris, avec un pic d'accumulation entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour post- IDM. Les monocytes Ly-6C^{high} correspondent aux

monocytes CD14⁺ CD16⁻ humains. Ils sont recrutés *via* l'interaction entre leur récepteur membranaire CCR et la chimiokine MCP-1 exprimé par le myocarde (Dewald et al., 2005; Nahrendorf et al., 2007), suivie d'une augmentation de l'expression endothéliale de molécules d'adhésion telles que la sélectine et la VCAM1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) (W. W. Lee et al., 2012). Ils expriment des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , MMPs et les myéloperoxydases) et des médiateurs protéolytiques, participant à la digestion du tissu infarci et l'élimination des débris nécrotiques (Swirski & Nahrendorf, 2013).

- La deuxième phase est dominée par la sous-population monocyttaire anti-inflammatoire, les monocytes Ly-6C^{low} chez la souris, qui atteint son maximum environ le 7^{ème} jour post-IDM. Les monocytes Ly-6C^{low} murins correspondent aux monocytes CD14⁺ CD16⁺ humains. Elles expriment des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- β (*transforming growth factor β*)) et des facteurs de croissance comme le VEGF (*vascular endothelial growth factor*), et participent à l'accumulation de myofibroblastes, au développement d'un environnement pro-angiogénique et au dépôt de collagène, nécessaires à la phase de résolution de l'inflammation (Nahrendorf et al., 2007).

Les monocytes infiltrés se différencient ensuite en macrophages de phénotype M1, également appelés macrophages inflammatoires, qui sont responsables de l'élimination des débris cellulaires de la zone d'infarctus. Par la suite, des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance sécrétés par les macrophages M1 influencent la phase de réparation ou de résolution coordonnée par les macrophages de phénotype M2, également appelés macrophages réparateurs. Cependant, la présence prolongée de macrophages M1 pourrait prolonger la phase pro-inflammatoire et provoquer une expansion de la zone infarctée retardant ainsi la phase de résolution et la formation de tissu cicatriciel médiée par les macrophages M2 et exacerbant le remodelage défavorable du ventricule gauche. Par conséquent, la modulation thérapeutique de la polarisation des macrophages peut constituer une nouvelle stratégie thérapeutique pour réduire la taille de l'infarctus et prévenir le remodelage défavorable du ventricule gauche (ter Horst et al., 2015). Des études expérimentales ont montré que le fait de cibler les monocytes pro-inflammatoires ou les macrophages M1 pour supprimer la phase pro-inflammatoire post-IDM, est cardioprotecteur (Courties et al., 2014; Harel-Adar et al., 2011; Leuschner et al., 2011). Inversement, il a été démontré que favoriser la polarisation des macrophages M2 facilite la résolution de l'inflammation et prévient le remodelage défavorable du ventricule gauche après l'IDM (Weirather et al., 2014; L.-S. Zhou et al., 2015).

Bien que les neutrophiles soient la première population leucocytaire à infiltrer le myocarde, le recrutement des monocytes/macrophages débute plus précocement, dès les premières minutes de l'ischémie. Une étude récente a permis de montrer que les monocytes Ly-6c^{low} également appelés « monocytes patrouilleurs » infiltraient la zone bordant le territoire ischémique et le myocarde infarci dès la première demi-heure, en nombre plus important que les neutrophiles (Jung et al., 2013). Ces monocytes et les macrophages résidents détectent les DAMPs et produisent des cytokines et des chimiokines attirant les neutrophiles (Soehnlein & Lindbom, 2010).

C. Les fibroblastes cardiaques

Les fibroblastes cardiaques sont des cellules mésenchymateuses, abondamment distribuées dans le cœur et protectrices de l'intégrité de la matrice extracellulaire (Prabhu & Frangogiannis, 2016). Outre leur contribution à la formation d'une cicatrice et au remodelage de la matrice, les fibroblastes cardiaques jouent un rôle important dans la réponse inflammatoire post-IDM et dans le remodelage ultérieur du ventricule gauche (Shinde & Frangogiannis, 2014). Ils sont activés par les DAMPs libérés par les cardiomyocytes endommagés. Dans les 24 à 72 heures suivant l'IDM, les fibroblastes cardiaques agissent comme des médiateurs pro-inflammatoires, en activant l'inflammasome et en produisant des cytokines et des chimiokines et présentent des propriétés de dégradation de la matrice, contribuant ainsi à débarrasser la plaie des cellules mortes et à éliminer les débris la matrice. Ce processus est facilité par des cytokines pro-inflammatoires spécifiques (comme l'interleukine-1 qui inhibe l'expression d' α -SMA par les fibroblastes), qui retardent la transformation des fibroblastes en myofibroblastes.

D. Les lymphocytes

Des modèles expérimentaux sur des petits et grands animaux ont démontré l'infiltration des lymphocytes T et B dans la zone infarctée après l'IDM (Frangogiannis et al., 2000; Yan et al., 2013; Zouggari et al., 2013). Il a été démontré que les lymphocytes T cytotoxiques (CD8) circulants augmentent une semaine après l'IDM, et lorsqu'ils ont été prélevés à des rats soumis à un IDM ils exercent un effet cytotoxique sur les cardiomyocytes néonataux sains (Varda-Bloom et al., 2000). Il a été démontré qu'à la suite d'un IDM, des lymphocytes B matures s'infiltrèrent dans la zone infarctée (avec un pic au 5^{ème} jour post-IDM), et augmentent la réponse

pro-inflammatoire en sécrétant la chimiokine CCL7 (*C-C motif chemokine ligand 7*), qui induit à son tour la mobilisation à partir de la moelle osseuse des monocytes Ly-6C^{high} pro-inflammatoires (Zouggari et al., 2013). La déplétion génétique des lymphocytes B à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre CD20 (marqueur spécifique des lymphocytes B) ou contre le facteur de survie des lymphocytes B (BAFF, *a-proliferation-inducing ligand*) atténue l'inflammation systémique (mesurée par les taux systémiques d'IL-1 β , TNF et IL-18), réduit la taille de l'infarctus et améliore la fonction du ventricule gauche au 14^{ème} jour post-IDM (Zouggari et al., 2013), ce qui fait des lymphocytes B une nouvelle cible thérapeutique pour prévenir l'inflammation post-IDM.

A côté des lymphocytes conventionnels effecteurs, il existe une sous-population des lymphocytes T aux propriétés anti-inflammatoires puissantes exprimant notamment le CD25 et FOXP3 (*forkhead box P3*), les lymphocytes T régulateurs (Treg), qui ont été récemment reconnus comme étant impliqués dans le changement de phénotype monocyte/macrophage après un infarctus. La déplétion génétique ou à l'aide d'anticorps (anti-CD25) des cellules Treg a entraîné une polarisation des macrophages M1 ainsi qu'une inflammation prolongée et un remodelage cardiaque défavorable après un infarctus. L'activation thérapeutique des cellules Treg a induit une différenciation des macrophages M2 associée à des effets bénéfiques, en termes de résolution de l'inflammation et de réparation myocardique (Weirather et al., 2014).

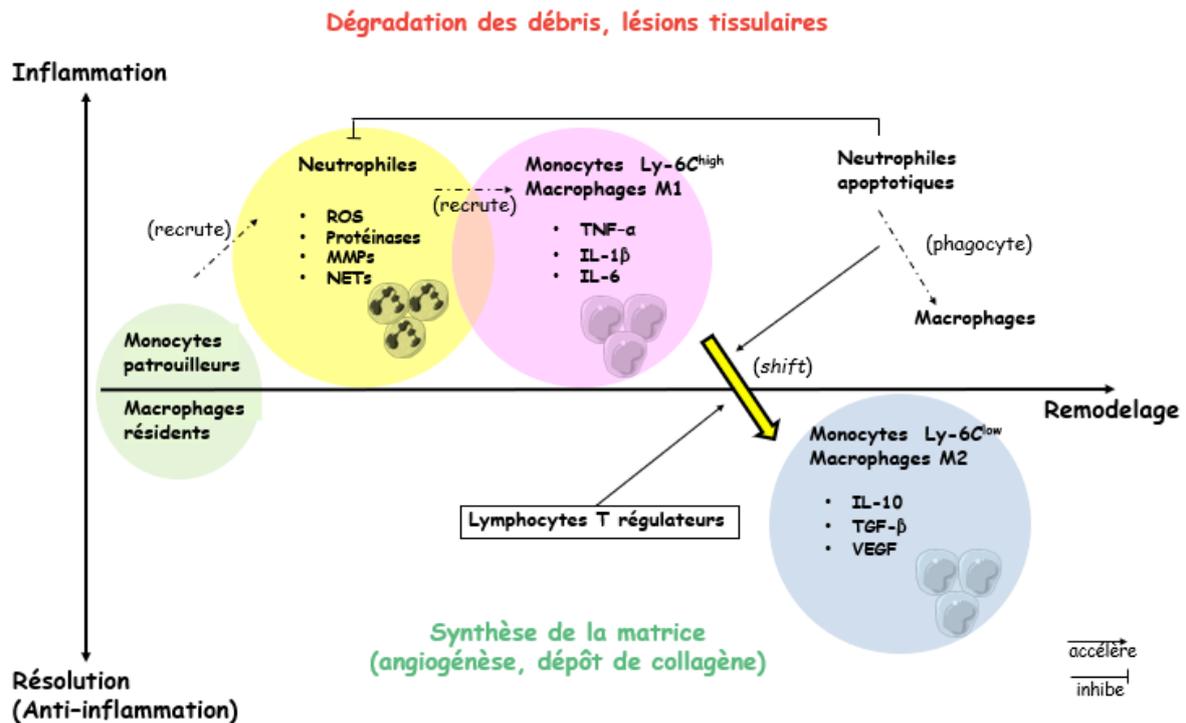


Figure 15 : Évolution temporelle de l'infiltration inflammatoire au sein du myocarde après l'IDM. Modifié d'après (Shinagawa & Frantz, 2015).

III. Cytokines pro-inflammatoires

Après l'IDM, des cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées par les cellules résidentes cardiaques et par les cellules inflammatoires circulantes suite à l'activation des PRRs par leurs ligands endogènes. Les cytokines jouent un rôle essentiel dans l'amplification de la réponse pro-inflammatoire en réponse aux lésions d'I/R myocardiques par le recrutement des cellules inflammatoires dans la zone infarctée (Frangogiannis, 2014). De plus, les cytokines stimulent l'apoptose des cardiomyocytes (Abbate et al., 2008). D'autre part, les médiateurs pro-inflammatoires peuvent également induire des signaux réparateurs clés. En plus de leur rôle dans la clairance des tissus nécrotiques, les cytokines stimulent l'expression de facteurs de croissance fibrogéniques et angiogéniques ce qui initie la formation de cicatrice (Kurrelmeyer et al., 2000).

A. TNF- α

Le TNF- α est libéré au cours de l'IDM (Frangogiannis et al., 1998) induisant la synthèse de molécules d'adhésion et le recrutement des cellules inflammatoires dans la zone infarctée du cœur (Maekawa et al., 2002). Les effets en aval du TNF- α dépendent fortement du fait que cette cytokine se lie au récepteur TNFR1 (*tumor necrosis receptor 1*) ou au récepteur TNFR2 (*tumor necrosis receptor 2*). En se liant au TNFR1, il active la voie SAFE aboutissant à l'inhibition de l'ouverture du mPTP (Lecour et al., 2005). La stimulation passant par le récepteur TNFR1 induit également l'apoptose (Moe et al., 2004). Cependant la stimulation du récepteur TNFR2 a elle un effet protecteur contre les lésions d'I/R, illustré par la diminution de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et de l'apoptose (Kishore et al., 2011; Monden et al., 2007).

B. IL-1

La famille interleukine-1 (IL-1) se compose de 11 membres parmi lesquels IL-1 α , IL-1 β , IL-18 et IL-33. Ces cytokines possèdent une similarité dans leurs structures géniques et dans la transduction du signal à travers un groupe de récepteurs d'IL (Sims & Smith, 2010). Les membres de la famille IL-1 jouent un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire post-IDM (Bujak & Frangogiannis, 2009). Récemment, il a été découvert que l'IL-1 α est un médiateur puissant de la réponse inflammatoire post-infarctus (Lugrin et al., 2015). L'IL-1 β est également un acteur essentiel, puisqu'il est augmenté dans le myocarde infarcté, associé à l'activation de l'inflammasome (Bujak et al., 2008). A la fois l'inhibition génétique et pharmacologique de l'IL-1 réduit la taille de l'infarctus et prévient le remodelage indésirable du ventricule gauche (Abbate et al., 2008; Bujak et al., 2008). Cependant, le blocage du récepteur d'IL-1 par l'anakinra, une protéine recombinante analogue de l'antagoniste endogène du récepteur de l'IL-1, réduit l'apoptose des cardiomyocytes et atténue le remodelage cardiaque après un IDM aigu dans des modèles expérimentaux chez les rongeurs (Abbate et al., 2008; Salloum et al., 2009). Des essais cliniques ont examiné l'efficacité de l'anakinra chez des patients atteints d'IDM mais les données n'ont pas montré des résultats concluants. Dans une étude clinique portant sur 182 patients, ils ont montré que le traitement quotidien des patients pendant 14 jours avec l'anakinra entraînait une réduction de l'inflammation objectivée par la mesure de la CRP. En revanche, le groupe traité a eu plus d'évènements cardiovasculaires à un an (Morton et al., 2015). Une étude

récente offre un certain espoir pour ce traitement puisque l'administration d'anakinra chez des patients STEMI, bien que non associée à une réduction de la mortalité, a entraîné une diminution de la CRP et une diminution du nombre d'hospitalisations pour insuffisance cardiaque (Abbate et al., 2020).

Récemment, l'étude CANTOS fut la première immunothérapie à montrer des résultats positifs dans les maladies cardiovasculaires. Dans cette étude, un traitement anti-inflammatoire ciblant la voie de l'immunité innée de l'IL-1 β avec le canakinumab, administré à la dose de 150 mg tous les 3 mois, entraîne une diminution de la concentration plasmatique de la protéine CRP et un taux significativement plus faible d'événements cardiovasculaires, indépendamment d'une réduction de bilan lipidique, chez des patients traités pour athérosclérose ayant déjà subi un IDM (Ridker et al., 2017).

C. IL-6

Il a été rapporté que l'interleukine-6 (IL-6) joue à la fois un rôle pro- et anti-inflammatoire et est libéré après l'IDM aiguë (Gwechenberger et al., 1999). Des taux circulants élevés d'IL-6 sont associés au syndrome coronarien aigu (Empana et al., 2010). Cependant, la modulation génétique ou pharmacologique de l'IL-6 dans le cadre expérimental de l'infarctus myocardique montre des résultats contradictoires. Les souris déficientes pour le gène IL-6 présentent une taille d'infarctus similaire (M. Fuchs et al., 2003; Kamiński et al., 2009) ou une taille d'infarctus plus petite (Jong et al., 2016) par rapport aux souris *wild type*. A l'inverse, il a été démontré que le blocage du récepteur de l'IL-6 par l'administration d'un anticorps monoclonal, MR16-1, avant la reperfusion et chaque semaine pendant 1 mois, a aggravé le remodelage indésirable du ventricule gauche dans un modèle murin d'IDM (Hartman et al., 2016), suggérant un rôle bénéfique pour IL-6. Malgré des données expérimentales contradictoires, des essais cliniques ciblant l'IL-6 ont été réalisés. L'administration du tocilizumab, anticorps monoclonal humanisé qui bloque l'action des récepteurs d'IL-6, en une simple dose avant l'angiographie coronaire a atténué la réponse inflammatoire et principalement la libération de la troponine chez les patients hospitalisés pour IDM sans sus-décalage du segment ST ayant reçu une intervention coronaire percutanée primaire (ICP) (Kleveland et al., 2016).

Chapitre 3 : La clusterine

La clusterine (CLU) a été isolée pour la première fois en 1983 par Fritz *et al.* à partir du fluide testiculaire de bélier. C'est une glycoprotéine hétérodimérique de poids moléculaire 80 kDa, capable de se dissocier en 2 sous-unités de 40 kDa dans des conditions réductrices, et de point isoélectrique 3.6 (Blaschuk *et al.*, 1983; Fritz *et al.*, 1983). Ses noms ont été multiples (Tableau 3), selon le tissu où elle était découverte ainsi que sa fonction (Rosenberg and Silkensen, 1995). Il a finalement été déterminé que toutes ces protéines étaient produites à partir du même gène (Wong *et al.*, 1993) et il a été convenu d'adopter le nom « CLU » universellement à Cambridge en 1992 (Fritz & Murphy, 1993) bien que certains des noms alternatifs apparaissent encore dans la littérature.

Nom	Source	Espèce	Fonction	Références
Clusterine	Fluide testiculaire	Bélier	Reproduction	(Blaschuk <i>et al.</i> , 1983)
TRPM-2	Prostate	Rat	Apoptose	(Léger <i>et al.</i> , 1987)
Gp80	Rein	Chien	Sécrétion	(Hartmann <i>et al.</i> , 1991)
SGP2	Testicules	Rat	Reproduction	(Bettuzzi <i>et al.</i> , 1989)
CLI	Sérum	Homme	Régulation du complément	(Jenne & Tschopp, 1989)
APOJ	Sang	Homme	Transport de lipides	(de Silva <i>et al.</i> , 1990)
pADHC-9	Cerveau	Homme	Maladie d'Alzheimer	(May <i>et al.</i> , 1989)

Tableau 3 : Liste des principales protéines homologues à la CLU. TRPM-2: Testosterone-repressed prostatic messenger-2, SGP-2: Sulphated glycoprotein 2, CLI: Cytolysis inhibitory protein, APOJ: Apolipoprotein J, pADHC-9: Alzheimer disease hippocampus clone 9. (E. Rosenberg & Silkensen, 1995).

I. Synthèse et structure de la clusterine

Le gène codant pour la CLU est hautement conservé entre les différentes espèces avec un degré d'homologie élevé de l'ordre 70 à 80% chez les mammifères (Jones & Jomary, 2002). Chez l'homme, il est situé sur le chromosome 8p21-12 s'étendant sur une région de 16580 pb (Wong et al., 1994). Il est organisé en 9 exons, dont la taille varie de 47 pb (exon I) à 412 pb (exon V), séparés par huit introns de 207 bp (intron VIII) à 4377 bp (intron VI) (Wong et al., 1994). Cette organisation génétique est bien conservée chez la souris et le rat dont le gène de CLU se localise respectivement sur le chromosome 14 s'étalant sur une région de 12923 pb et sur le chromosome 15p12 s'étalant sur une région de 13750 bp (Birkenmeier et al., 1993; Wong et al., 1993).

Jusqu'en 2006, un seul transcrite de taille 1,9 kb, contenant deux ATGs dont le premier est situé sur l'exon 2 et le deuxième sur l'exon 3, était décrit pour la CLU (de Silva et al., 1990). Actuellement, au moins deux transcrits distincts d'ARNm de la CLU existent suite à une initiation alternative de la transcription qui pourrait être contrôlée par deux promoteurs distincts. Ces 2 isoformes, diffèrent par leur exon 1, sont nommées Isoforme 1 et Isoforme 2 dont les numéros d'accès dans la banque de données sont respectivement NM_001831.2 et NM_203339.1. Ces 2 transcrits sont produits uniquement chez l'homme et le chimpanzé (Cochrane et al., 2007). Un troisième transcrite appelé Isoforme 11036 (Andersen et al., 2007) a été mis en évidence par ASAP (*Alternative Splicing Annotation Project*) database (C. Lee et al., 2003).

Il est bien connu que de nombreux gènes codent pour plusieurs variantes de protéines en raison d'un promoteur alternatif aussi d'un épissage alternatif. Ce qui produit différentes isoformes d'ARNm codants pour la même protéine mais avec une région 5' UTR (*untranslated transcribed region*) différente. Dans certains cas, lorsque le site d'initiation de la traduction existe dans le premier exon, ils codent pour une protéine distincte avec des activités biologiques différentes, alternatives ou opposées. Le gène de CLU semble être un exemple paradigmatique pour un telle régulation complexe. Les trois transcrits primaires (pré-ARNm) de la CLU produits par l'ARN polymérase possèdent tous 9 exons, 8 introns et une région 3'UTR terminale dont l'exon 1 est unique pour chaque isoforme alors que les exons 2 à 9 sont similaires pour tous les types. L'Isoforme 1 contient son premier codon d'initiation ATG au niveau de l'exon 1 alors que l'Isoforme 2 possède un exon 1 non traduit et son premier codon d'initiation ATG se situe au niveau de l'exon 2 (le deuxième pour l'Isoforme 1), localisé juste en amont de

la séquence de localisation dans le RE. L'exon 1 de l'Isoforme 11036 est localisé entre l'exon 1 de l'Isoforme 1 et l'isoforme 2 résultant d'un épissage alternatif. Son premier codon ATG se trouve au niveau de l'exon 1. Les 3 Isoformes contiennent un dernier ATG situé au niveau de l'exon 3 (Figure 16). En conclusion, l'Isoforme 1 et l'isoforme 11036 codent pour des protéines intracellulaires de 501 acides aminés (a.a.) et 460 a.a. respectivement alors que l'Isoforme 2 code pour une protéine secrétée de 449 a.a. (Rizzi, Coletta, et al., 2009).

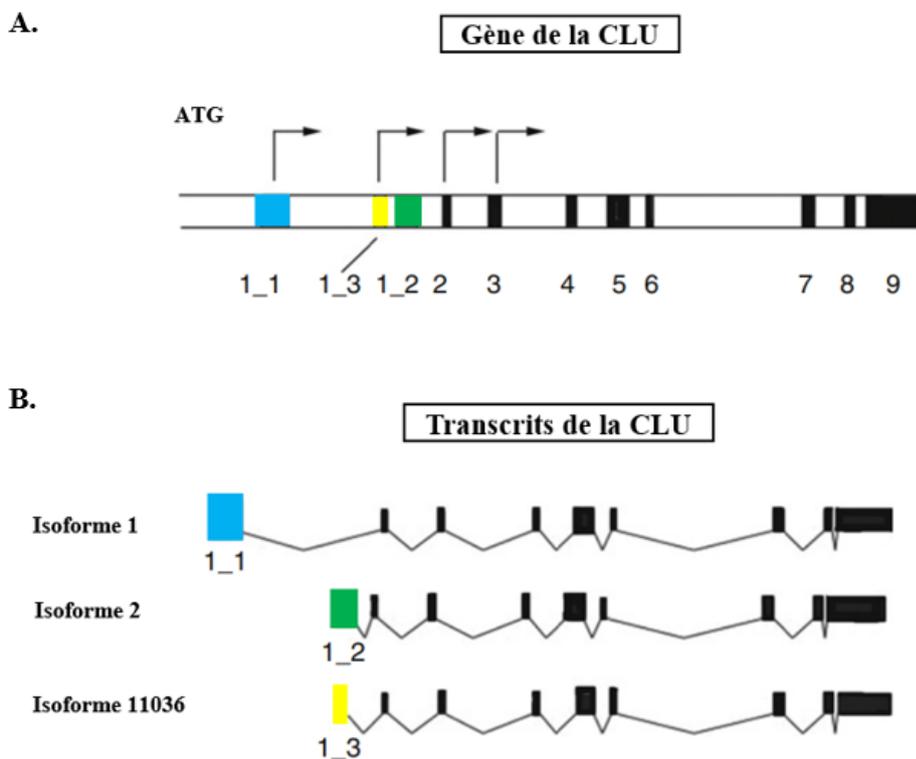


Figure 16 : CLU : gène et transcrits. A. Représentation schématique de l'organisation du gène CLU sur le chromosome humain 8. Les blocs noirs représentent les exons de 2 à 9, communs à tous transcrits, tandis que les blocs (bleu, jaune et vert) représentent l'exon 1 unique de différentes variantes transcriptionnelles de la CLU. L'exon 1 de l'Isoforme 1 (1_1) est indiqué en bleu, l'exon 1 de l'Isoforme 2 (1_2) est indiqué en vert et l'exon 1 de l'Isoforme 11036 (1_3) est indiqué en jaune. Les sites d'initiation de la transcription sont représentés par des flèches noires. B. Représentation schématique des variantes connues de l'ARNm de CLU. Modifié d'après (Rizzi, Coletta, et al., 2009).

Plusieurs travaux ont montré alors l'existence de différentes formes protéiques de la CLU dérivant toutes du même gène. Ces formes se distinguent par leur localisation cellulaire, une forme extracellulaire (la forme sécrétée) et des formes intracellulaires (la forme nucléaire et la forme cytoplasmique), mais aussi par leurs fonctions (Bettuzzi & Rizzi, 2009; Trougakos et al., 2009).

La forme sécrétée de la CLU

Depuis sa découverte au début des années 1980 jusqu'au milieu des années 1990, CLU était considérée uniquement comme une protéine sécrétée. La transcription du gène CLU produit un ARNm d'environ 2 Kb dont la traduction, initiée à partir du codon initiateur (AUG) situé au niveau de l'exon 2, donne un pré-protéine composée de 449 acides aminés. Les 22 premiers acides aminés représentent une séquence-signal assurant la translocation co-translationnelle vers le RE où se fait le clivage du peptide signal, la N-glycosylation de la pré-protéine au niveau de six résidus d'asparagine (Asn) (Asn86, 103, 145, 291, 354, 374) et la formation de 5 ponts disulfure (Choi-Miura et al., 1992). Ces modifications transforment la pré-protéine en CLU pré-sécrétoire (psCLU) de poids moléculaire 60 kDa qui se transloque vers l'appareil de Golgi où il va subir une glycosylation et un clivage par une proprotéine convertase, la furine, entre les résidus d'arginine et serine (Arg227 et Ser228) produisant la forme sécrétée (sCLU) mature, complexe hétérodimérique de 80 kDa composé d'une chaîne alpha (résidus de 228 à 449) et d'une chaîne beta (résidus 23 à 227). Elle possède 3 hélices α amphiphiles (une au niveau de la chaîne alpha et 2 au niveau de la chaîne beta) et deux hélices α de type « coiled-coil », c'est-à-dire torsadées et enroulées sur elles-mêmes (Jones & Jomary, 2002). Cette structure de CLU est responsable de son affinité relative à une grande variété de ligands ainsi que de son activité chaperonne (Bailey et al., 2001; D. T. Humphreys et al., 1999). La représentation schématique de la structure de la CLU est montrée dans la Figure 16. Enfin, la sCLU mature est sécrétée sous la forme d'un complexe hétérodimérique de deux sous-unités de 40 à 45 kDa (Kapron et al., 1997; Urban et al., 1987) (Figure 17).

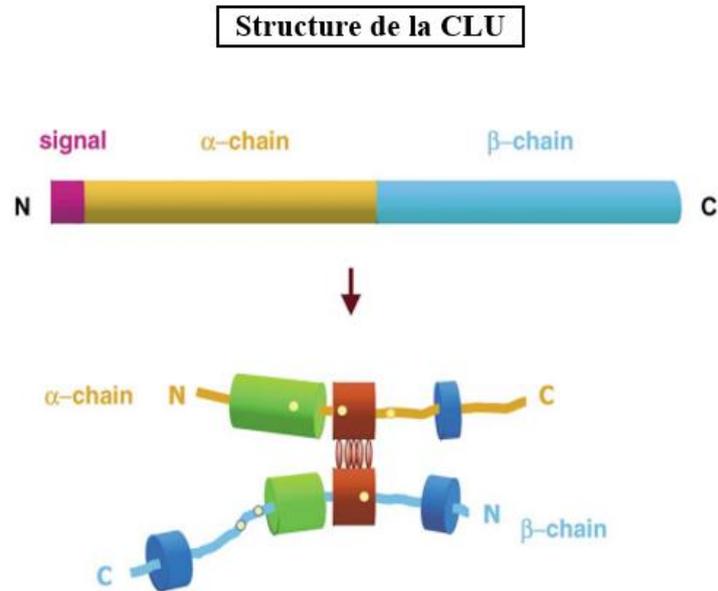


Figure 17 : : Représentation schématique de la structure de la CLU humaine. La chaîne polypeptidique précurseur (en haut) est clivée pour éliminer la séquence-signal de 22 acides aminés (en rose) et ensuite entre les résidus 227-228 pour générer la chaîne alpha (en orange) et la chaîne beta (en bleu clair). Ceux-ci sont assemblés de façon antiparallèle et reliés par cinq ponts disulfure (ellipses rouges) pour générer une molécule hétérodimérique (en bas). Les zones en bleu foncé et en vert représentent respectivement les 3 hélices α amphiphiliques et les 2 hélices α de type « coiled-coil ». Modifié d'après (Jones & Jomary, 2002).

Les formes intracellulaires de CLU : nucléaire et cytoplasmique

Ce n'est qu'en 1996 que les chercheurs ont observé une accumulation d'une forme nucléaire de CLU (nCLU) dans le noyau de cellules de lignées épithéliales de poumon (HepG2 et CCL64) après l'induction de la mort cellulaire avec du TGF- β (Reddy et al., 1996). Quelques années plus tard, Yang et al. ont identifié une forme nucléaire de CLU de 55 kDa induite par des rayonnements ionisants dans la lignée de cellules de cancer du sein (MCF-7:WS8) (C.-R. Yang et al., 2000). Autre que la sCLU non sécrétée, des formes intracellulaires de CLU (iCLU) ont été trouvées dans les cellules stressées. Les fonctions, les propriétés, la localisation subcellulaire et la biogenèse de ces protéines ne sont pas encore claires. Plusieurs mécanismes quant à leur biogenèse sont en cours de discussion : 1) la rétrotranslocation de la forme psCLU du RE au cytosol après induction de stress par la voie de dégradation des protéines associées au RE (voie ERAD : Endoplasmic-Reticulum-Associated protein Degradation) (N. Li et al., 2013; Nizard et al., 2007) 2) l'initiation de la traduction au niveau du codon AUG situé dans l'exon 3 en aval de la région codant pour la séquence-signal générerait des isoformes CLU non sécrétées

(Moretti et al., 2007; Reddy et al., 1996) 3) l'initiation de la traduction au niveau du codon AUG situé dans l'exon 1, en amont de la séquence-signal, ce qui pourrait entraîner la synthèse de protéines CLU allongées à l'extrémité N terminale avec la séquence-signal non fonctionnelle (Rizzi, Coletta, et al., 2009) et 4) l'épissage alternatif de l'ARNm de CLU pourrait générer un ARNm dépourvu d'exon 2 qui comprend la séquence-signal. La traduction de cet ARNm à partir du codon AUG situé au niveau de l'exon 3 conduit à la synthèse d'une isoforme CLU non sécrétée. Un tel événement d'épissage a été observé dans la lignée de cellules tumorales mammaires MCF-7 exposés aux radiations ionisantes. Cette isoforme CLU est appelée nCLU, de poids moléculaire de 55 kDa, possédant une séquence de localisation nucléaire fonctionnelle qui lui permette l'adressage au noyau des cellules où elle pourrait agir comme un facteur pro-apoptotique (Bettuzzi & Rizzi, 2009; Leskov et al., 2003, 2011; Prochnow et al., 2013). Toutes les formes intracellulaires sont à chaîne unique (Figure 18).

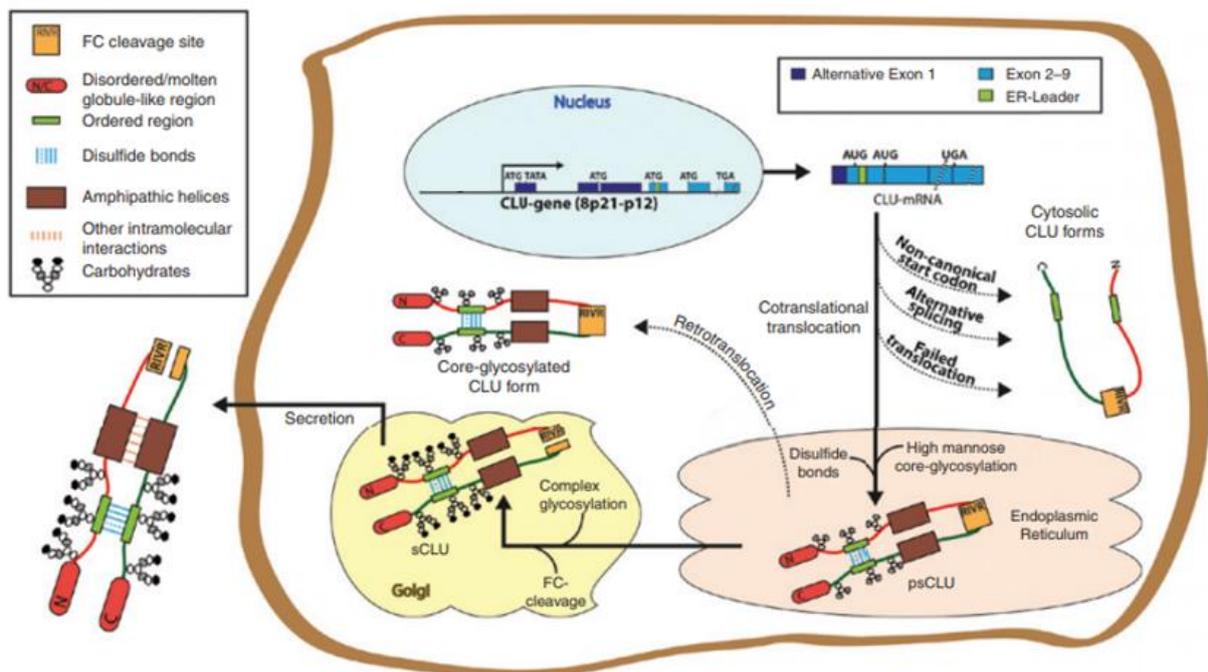


Figure 18 : Biogenèse de la CLU. La forme sécrétée de CLU (sCLU) subit certaines modifications post-traductionnelles (flèches noires) telles que la formation de liaisons disulfures, le clivage protéolytique et une glycosylation au niveau du RE et de l'appareil de Golgi pour être sécrétée dans le milieu extracellulaire. Lors d'un stress cellulaire, des formes de CLU non sécrétées (intracellulaires) émergent (flèches pointillées), principalement dérivées de la translocation échouée, de l'épissage alternatif ou de l'initiation de la traduction à partir de l'exon 3 ainsi que de la rétrotranslocation du RE vers le cytoplasme. Modifié d'après (Rohne et al., 2016).

II. Expression, demi-vie et régulation de la clusterine

Bien qu'exprimée de façon ubiquitaire dans presque tous les tissus de mammifères, CLU est principalement fabriquée par les tissus épithéliaux pendant le développement embryonnaire et dans les testicules, les ovaires, la glande surrénale, le foie, le cœur et le cerveau chez les adultes (Wong et al., 1993, 1994). Cependant, CLU n'est pas exprimée par toutes les cellules d'un organe donné. sCLU est également abondante dans les fluides biologiques tel que le plasma, le liquide séminal, le lait et le liquide céphalo-rachidien (E. Rosenberg & Silksen, 1995; Jones & Jomary, 2002). La concentration moyenne de la CLU dans le plasma humain est de 100 ± 50 $\mu\text{g/ml}$ alors qu'elle est environ 10 fois plus élevée dans le liquide séminal humain (Jenne et al., 1991; Murphy et al., 1988). CLU est une protéine à demi-vie très courte, inférieure à 2h (115 minutes) (Rizzi, Caccamo, et al., 2009).

Les récepteurs identifiés de CLU sont variés et souvent spécifiques aux tissus et comprennent le récepteur des lipoprotéines de haute densité (HDL, high density lipoprotein), la protéine 2 liée au récepteur des lipoprotéines de basse densité (lipoprotein receptor-related protein 2, LRP2) également connue sous le nom de mégaline (Bradley et al., 2019), le récepteur 2 de l'apolipoprotéine E (ApoER2, *apolipoprotein E receptor 2*) (Leeb et al., 2014) et le récepteur de la lipoprotéine de très basse densité (VLDLR, *very low density lipoprotein receptor*), dont beaucoup sont essentiels à la santé cardiovasculaire.

La variation du niveau d'expression des différentes isoformes de CLU dans les différents tissus suggère que l'expression de CLU doit être spécifique du tissu et finement régulée (N. Kim & Choi, 2011; Wong et al., 1994) au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (N. Kim & Choi, 2011) par divers mécanismes moléculaires, voies de signalisation ou modifications épigénétiques (Deb et al., 2015). Un certain nombre d'éléments régulateurs peuvent contribuer au contrôle de l'expression de la CLU. Ces éléments comprennent la protéine activatrice-1 (AP-1, *activator protein-1*), la protéine activatrice-2 (AP-2, *activator protein-2*), des motifs de la protéine SP-1 (*specificity protein-1*) (Wong et al., 1993), des éléments de réponse aux androgènes (AREs, *androgen response elements*) (Cochrane et al., 2007) et les éléments de réponse à l'AMP cyclique (CREs, *cyclic-AMP response elements*) (Roseblit & Chen, 1994). Les signaux de mort cellulaire et d'apoptose régulent également la protéine CLU. On a observé que l'expression de l'ARNm de CLU était augmentée dans l'hippocampe de rat après une lésion néocorticale et hippocampique (May et al., 1990) et après une ischémie (May et al., 1992).

La CLU peut être régulée aussi de manière différentielle par différentes molécules telles que les cytokines (Trougakos & Gonos, 2002). Les hormones et les facteurs de croissance sont aussi les régulateurs les plus importants de l'expression de CLU (Rizzi, Coletta, et al., 2009). De même, la régulation transcriptionnelle de la CLU est très complexe et controversée selon les tissus impliqués. IL-1 β et IL-2 induisent une augmentation de la transcription de l'ARNm-CLU dans les astrocytes (Zwain et al., 1994). Dans les différents stades des carcinomes colorectaux humains, la production accrue d'IL-6 est trouvée en même temps que la surexpression de Bax et de l'isoforme pro-survie sCLU, ainsi que la perte de Ku86 et de nCLU (Pucci et al., 2009). La CLU est surexprimée par le TNF- α alors que le TGF- β diminue son expression dans les cellules musculaires lisses porcines (D. Humphreys et al., 1997; Thomas-Salgar & Millis, 1994). A l'inverse, le TGF- β induit l'expression de CLU dans les astrocytes de rat (Laping et al., 1994).

III. Fonctions physiologiques de la clusterine

Les fonctions physiologiques exactes de CLU restent énigmatiques bien que la CLU ait été clonée depuis des décennies, ceci pour 2 raisons : sa capacité à interagir avec une variété de molécules (protéines amyloïdes, lipides, immunoglobulines, composants de complexe d'attaque membranaire) (Trougakos & Gonos, 2002) et sa sécrétion au cours de nombreux états biologiques et pathologiques. CLU est impliquée dans de nombreux processus physiologiques mais aussi physiopathologiques. A noter que les souris invalidés pour la CLU (CLU KO) se développent et vivent normalement (McLaughlin et al., 2000).

A. La reproduction

La protéine CLU a été initialement isolée à partir du fluide testiculaire comme une protéine induisant une agrégation des cellules de Sertoli (Blaschuk et al., 1983; Fritz et al., 1983). La synthèse de la sCLU séminale se fait au niveau des testicules, l'épididyme et les vésicules séminales (O'Bryan et al., 1990). La fonction exacte de la sCLU séminale n'est pas encore bien connue. Fukuda et al. ont prouvé que la concentration de sCLU dans le liquide séminal chez les patients infertiles est significativement diminué par rapport aux hommes sains. De plus, le niveau de sCLU chez les hommes présentant une azoospermie non obstructive était plus faible

que chez les patients oligozoospermiques (Fukuda et al., 2016). Ce qui est conforme aux résultats menés par Salehi et al. qui ont démontré une corrélation négative entre la concentration de sCLU séminale (dans le groupe des hommes infertiles : $15,5 \pm 9,7$ ng/mL vs. dans le groupe des hommes fertiles : $48,31 \pm 38,59$ ng/mL) et la morphologie anormale des spermatozoïdes, l'insuffisance de protamine (protéine essentielle à la condensation et à la stabilisation de l'ADN dans la tête des spermatozoïdes) et la fragmentation d'ADN (Salehi et al., 2013). Cependant, certains travaux contredisent ceux mentionnés ci-dessus. Zalata et al. ont trouvé que l'expression génique de CLU a été significativement augmentée dans les échantillons de sperme d'hommes infertiles et qui est corrélée négativement avec le nombre de spermatozoïdes, la motilité, l'activité de l'acrosine, l'indice de linéarité et la vitesse linéaire, et positivement avec le pourcentage de formes anormales des spermatozoïdes et la fragmentation de l'ADN (Zalata et al., 2012).

L'expression de CLU dans le sperme était plus élevée aux premiers stades du processus de maturation des spermatozoïdes (Cui et al., 2016). Cependant, un niveau élevé de CLU aux stades ultérieurs du développement des spermatozoïdes suggère sa maturation anormale et correspond à une diminution de l'agrégation et de la motilité des spermatozoïdes, provoquant l'infertilité (Cui et al., 2016). Griffiths et al. ont étudié le rôle de la sCLU en tant que facteur de transport pour la protéine SPAM1 (*sperm adhesion molecule 1*), marqueur de maturité du sperme, vers la membrane plasmique des spermatozoïdes sur un modèle de souris et dans du sperme humain (Griffiths et al., 2009). Toutefois, une fertilité normale est trouvée chez les souris CLU KO mais une spermatogenèse perturbée dans ses stades terminaux (Bailey et al., 2002).

B. Le transport de lipides

CLU participe également au transport du cholestérol et est présente dans les complexes de HDL dans le plasma humain (Jenne et al., 1991) et pour cette raison, CLU est parfois appelée apolipoprotéine J (apoJ). La classification de CLU comme une apolipoprotéine s'appuie sur plusieurs raisons : (i) elle est associée aux lipides dans le plasma et le liquide céphalo-rachidien (de Silva et al., 1990) (ii) elle est sécrétée par les hépatocytes et les astrocytes en tant que lipoprotéine (Burkey et al., 1992; LaDu et al., 1998) et (iii) elle se lie à la protéine gp330 (mégaline), un membre de la famille des récepteurs aux lipoprotéines à faible densité (LDL,

low density lipoprotein) (Kounnas et al., 1995, p. 330) bien qu'il ait été initialement considéré que l'apoJ n'était présente que dans les HDL.

Dans le plasma, apoJ forme des particules HDL avec apoA-I et apoE et peut jouer un rôle important dans le transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie (Bettuzzi, 2009), qui est considéré comme le principal rôle des HDL dans la protection contre l'athérosclérose. Cependant la chaîne beta individuelle de CLU provoque une augmentation significative de l'accumulation de lipides cellulaires (Matukumalli et al., 2017). Les lapins ayant reçu une injection de la chaîne beta de CLU mais pas de la chaîne alpha présentent une augmentation de poids d'environ 40 % avec une hypertrophie des adipocytes et une stéatose hépatique et rénale (Matukumalli et al., 2017).

C. La clusterine entre apoptose et survie

Bien que l'expression de la CLU soit liée à des processus biologiques tels que la formation de cicatrices, le remodelage membranaire ou la maturation des spermatozoïdes (Wong et al., 1994), qui n'impliquent pas l'apoptose, les premières études ont révélé une corrélation entre la surexpression de l'ARNm-CLU et la mort cellulaire après différents signaux de stress toxiques (Buttayan et al., 1989; Léger et al., 1987, 1988). Cependant, par la suite des études ont montré des résultats contradictoires, établissant une relation entre la surexpression de CLU et la protection cellulaire (Schwochau et al., 1998; Sensibar et al., 1995).

L'identification de deux isoformes de CLU (sCLU et nCLU), avec une localisation cellulaire différente et des rôles opposés concernant la survie cellulaire, a contribué à clarifier ces divergences (Leskov et al., 2003; C.-R. Yang et al., 2000). Ainsi, alors que l'expression de nCLU est liée aux tissus sains, la surexpression de sCLU serait liée à la plupart des tumeurs malignes (Tellez et al., 2016). À cet égard, les cellules tumorales sont apparemment caractérisées pour présenter un microenvironnement favorable à la survie avec un rapport sCLU/nCLU accru (Essabbani et al., 2013; Leskov et al., 2011, p. 1).

Les modifications post-traductionnelles régulent apparemment les rôles différentiels de CLU (N. Kim & Choi, 2011), car la présence ou l'absence d'une séquence leader dans le peptide CLU déterminerait le type d'isoforme à exprimer, soit sCLU ou nCLU (survie ou apoptotique respectivement). À cet égard, il a été suggéré que la présence de la séquence leader agirait comme "*function -switch*" des différentes formes de CLU (Q. Zhang et al., 2006). Étant donné

que l'inhibition de l'exon 2 de l'ARNm-CLU induit le *silencing* de l'isoforme sCLU et que la résistance à l'apoptose est l'une des principales caractéristiques du cancer, cette découverte a été essentielle pour la conception de thérapies ciblées contre le cancer qui sont actuellement à l'étude.

Dans les cellules saines, Ku70 cytosolique, une protéine de réparation de l'ADN, se lie à la protéine BAX. BAX est une protéine pro-apoptotique qui subit un changement de conformation pendant le processus apoptotique, puis se transloque vers la membrane mitochondriale favorisant sa perméabilité ce qui entraîne la mort cellulaire (Alibek et al., 2014). La liaison de Ku70 à BAX forme un complexe inhibant le déplacement de BAX vers la mitochondrie. sCLU peut modifier cette interaction en se liant au complexe Ku70-BAX ce qui le stabilise, réduisant ainsi la quantité de BAX libre qui peut transloquer vers la mitochondrie pour induire l'apoptose (Trougakos et al., 2009; H. Zhang et al., 2005). La déplétion de CLU a permis de réduire la liaison de Ku70-BAX et d'augmenter les niveaux de BAX dans les mitochondries (Trougakos et al., 2009) avec l'accumulation résultante de protéines pro-apoptotiques, une augmentation de la libération de cytochrome C et l'expression accrue de la caspase 9. Cela s'accompagne d'une réduction des protéines anti-apoptotiques, dont Bcl-2, ce qui rend les cellules plus vulnérables aux effets pro-apoptotiques de BAX (Trougakos et al., 2009). Puisque sCLU est généralement localisée dans l'espace extracellulaire, le mécanisme permettant cette interaction intracellulaire reste peu clair. Cependant, l'internalisation de sCLU peut se produire après la liaison à des récepteurs tels que le récepteur de la mégaline (Ghiso et al., 1993; Zlokovic et al., 1996), et plusieurs groupes ont rapporté la présence de la CLU glycosylé dans le cytosol pendant le stress cellulaire (Nizard et al., 2007). En revanche, certaines données indiquent que la iCLU pourrait favoriser l'apoptose. Précédemment, Leskov et al. ont décrit nCLU comme un signal de mort cellulaire et on pense que nCLU se lie directement à Ku70 (Leskov et al., 2003; C.-R. Yang et al., 2000) bloquant l'interaction entre Ku70 et BAX favorisant ainsi la translocation de BAX vers la mitochondrie et donc la mort cellulaire. L'interaction et la liaison avec Ku70 ont été observées avec une protéine de CLU de 60 kDa mais pas avec la CLU mature et sécrétée. Ceci suggère que cette liaison est spécifique à la iCLU (C. R. Yang et al., 1999; C.-R. Yang et al., 2000).

Bien que l'on ait cru à l'origine que la iCLU provenait d'un transcrite d'ARNm distinct de celui de la sCLU, il est maintenant largement admis que ces deux protéines partagent le même transcrite d'ARNm et que la iCLU peut exister en raison d'une localisation altérée de la sCLU. Le stress peut altérer la capacité d'une cellule à sécréter la sCLU, ce qui entraîne sa localisation

à l'intérieur de la cellule. Autre possibilité, sCLU peut ne pas subir la biogénèse canonique, entraînant une glycosylation et/ou un clivage incomplet, ce qui peut conduire la sCLU immature à échapper à la voie sécrétoire et à rester à l'intérieur de la cellule. D'autres théories suggèrent que l'ARNm de la CLU peut subir un épissage alternatif induit par le stress et une traduction non canonique pour produire une protéine CLU tronquée, non glycosylée, dépourvue de l'exon 2, qui ne serait donc pas sécrétée mais s'accumulerait dans la cellule. En outre, sCLU peut être introduite dans les cellules par des mécanismes d'absorption. Les recherches indiquent une fonction pro-survie pour sCLU et une fonction pro-apoptotique pour iCLU. En revanche, iCLU entre en compétition avec BAX pour la liaison avec Ku70 et inhibe ainsi la formation de leur complexe, ce qui entraîne une augmentation de BAX libre qui peut transloquer vers les mitochondries. D'autre part, sCLU interagit avec les protéines Bcl-xl en favorisant sa fonction anti-apoptotique, alors que iCLU interagit avec cette même protéine pour réduire sa fonction anti-apoptotique. iCLU pourrait interagir avec la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PK) et inhibe ainsi la réparation de l'ADN, ce qui entraîne des lésions de l'ADN et un stress et alors une mort cellulaire.

Dans le cœur, les cardiomyocytes sont protégés de l'apoptose induite par H₂O₂ lorsqu'ils sont traités avec de la CLU. Les cellules montrent une expression accrue des protéines Bcl-2 et une expression réduite de BAX et les cellules traitées par la CLU présentent également une protection accrue contre la mort cellulaire induite par H₂O₂ (Jun et al., 2011). Après une transplantation cardiaque, l'expression de la CLU réduit l'expression des protéines inflammatoires, y compris TNF- α et BAX, en augmentant en outre l'expression de Bcl-xl à la fois *in vivo* et *in vitro*. Cela réduit la mort cellulaire et les lésions dues à l'ischémie et à la reperfusion après une transplantation cardiaque (G. Liu et al., 2018). En plus des interactions de la CLU avec les voies apoptotiques, il existe certaines preuves soutenant son interaction avec les voies pro-survie. PI3K active et phosphoryle l'Akt, qui se localise à la membrane plasmique et peut influencer plusieurs effecteurs en aval tels que mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Dans plusieurs lignées cellulaires, la CLU a été observée comme interagissant avec la voie de signalisation PI3K-Akt-mTOR et favorisant la survie cellulaire. Dans le cœur, la CLU protège les cardiomyocytes H9C2 de la mort cellulaire induite par le stress oxydatif, probablement en régulant la signalisation PI3K-Akt et GSK-3 β (Jun et al., 2011). D'autre part, l'inactivation de CLU stabilise également COMMD1 (*copper metabolism (Murr1) domain containing 1*) et I κ B, qui se complexent avec NF- κ B pour le retenir dans le cytoplasme. En revanche, la surexpression de CLU facilite le recrutement du complexe E3 ubiquitine ligase, le complexe SCF

(Skip/Cullin/F-box), à I- κ B et COMMD1 facilitant ainsi leur dégradation via le protéasome. Ceci, à son tour, libère le NF- κ B pour se transloquer dans le noyau et activer l'expression des gènes spécifiques de survie cellulaire (Zoubeidi et al., 2010). Les interactions entre les protéines de CLU et les voies apoptotiques/pro-survie sont mises en évidence dans la figure 19.

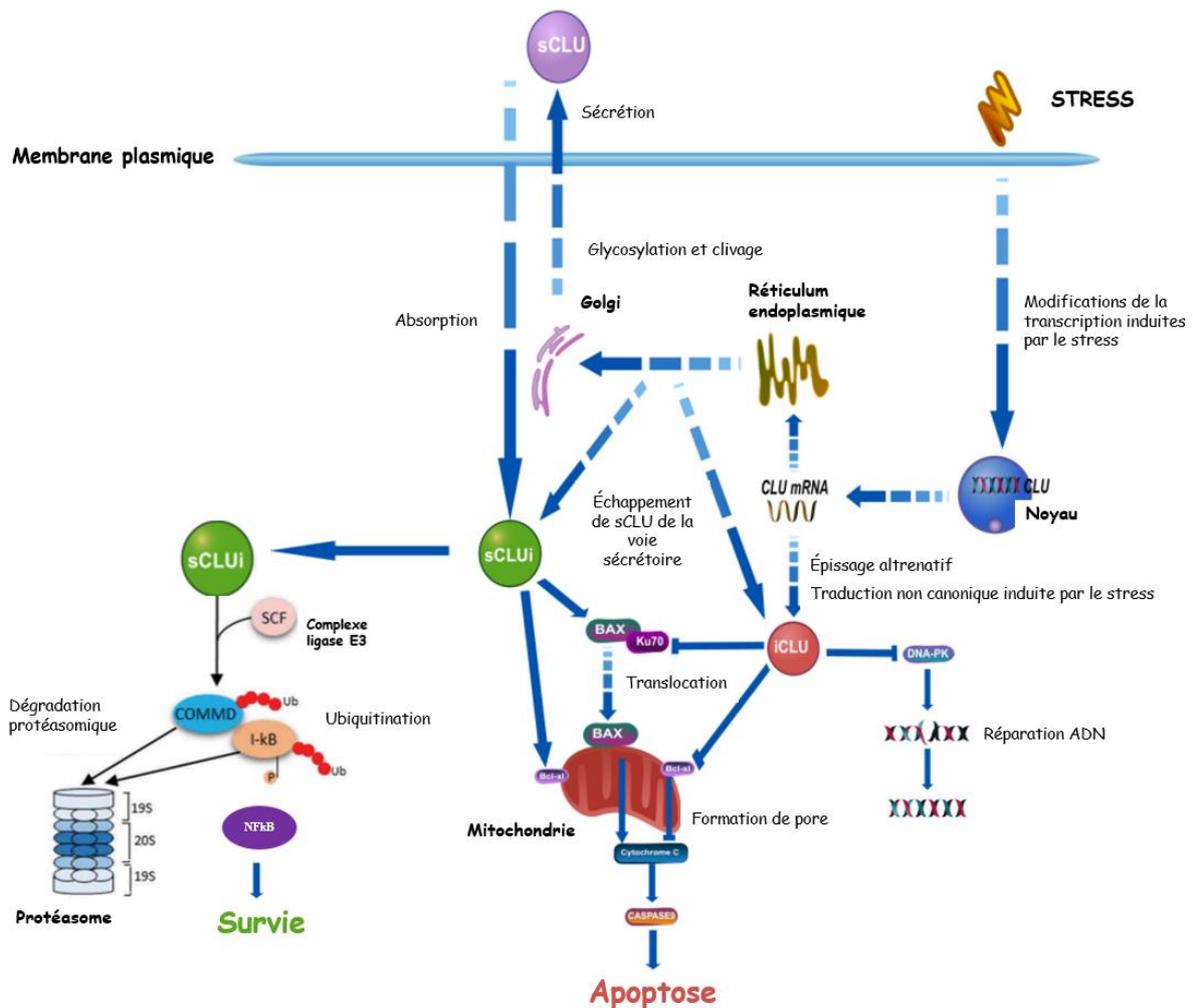


Figure 19 : La CLU entre apoptose et survie. Modifié d'après (Foster et al., 2019; Wilson & Zoubeidi, 2017).

D. L'inhibition du complexe d'attaque membranaire du système du complément

La capacité de CLU à inhiber l'activation du complément a été découverte tôt (Choi et al., 1990; Murphy et al., 1988, 1989). La CLU a été dénommée à cette occasion CLI (*complement lysis inhibitor*). Le système du complément fait référence à un ensemble de protéines sériques (± 30), jouant un rôle primordial dans l'immunité innée, qui complètent la capacité des anticorps et des cellules phagocytaires à éliminer les microbes pathogènes et les cellules endommagées (Rus et al., 2005). Le système du complément peut être activé en cascade selon trois voies : la voie classique, la voie des lectines ou la voie alterne. Ces trois voies convergent pour aboutir à la formation de complexes enzymatiques (C3 convertases) (C pour complément), capable de cliver le composant C3 et l'activer aboutissant par une voie finale commune à la formation d'un complexe macromoléculaire : le complexe d'attaque membranaire (CAM, C5b-9). Le CAM est à l'origine de la lyse des pathogènes [en s'ancrant à la membrane de la cellule permettant de former un pore lytique] ou de l'activation de certaines cellules de l'hôte. La CLU a été identifiée dans les dépôts immunitaires glomérulaires comme faisant partie du CAM (Murphy et al., 1988). Il a été démontré que la CLU purifiée inhibe l'hémolyse initiée par le C5b-6 de manière dose-dépendante (Murphy et al., 1989) en se liant au composant du complément C5b-9 (Choi et al., 1990; Daugan et al., 2017; Tschopp et al., 1993). Toutefois, les souris invalidées pour CLU ne développent pas spontanément de lésions liées à une activation dérégulée du complément, ce qui suggère que des mécanismes compensateurs existent ou que les rôles de CLU sur le système du complément sont accessoires (Bailey et al., 2002; Rosenberg et al., 2002).

E. La clusterine : une protéine chaperonne extracellulaire

Avant la découverte que la CLU était une chaperonne moléculaire, un rapport est apparu décrivant un élément d'ADN de 14 paires de bases strictement conservé entre les promoteurs proximaux du gène CLU de différentes classes de vertébrés. Cette région est spécifiquement reconnue par le facteur de transcription HSF1, le facteur de choc thermique 1 (HSF1, *heat shock factor 1*) (MICHEL et al., 1997). HSF1 était bien connu pour sa capacité à activer l'expression d'une famille de chaperones intracellulaires, les protéines de choc thermique (Miller & Fort, 2018). Comme mentionné ci-dessus, les premiers rapports décrivaient la régulation à la hausse

de l'expression de CLU dans de nombreux modèles différents de maladies et de stress. Ces observations ainsi que d'autres, ont servi à étayer les suggestions selon lesquelles (i) l'élément de réponse HSF1 expliquait la forte sensibilité de l'expression de CLU aux conditions de stress, et (ii) la CLU était une version extracellulaire d'une protéine de choc thermique (MICHEL et al., 1997). Deux ans plus tard, cette dernière hypothèse a été confirmée par l'équipe de Wilson lorsqu'ils ont montré que CLU inhibe spécifiquement l'agrégation des protéines *in vitro* (D. T. Humphreys et al., 1999).

En fonction de la protéine individuelle et des conditions physiques et chimiques qui prévalent, les protéines mal repliées peuvent interagir pour former des agrégats dépourvus de toute structure définissable (agrégats amorphes), ou s'assembler en structures fibrillaires ordonnées riches en feuillets bêta (amyloïde), comme le montrent les exemples suivant (Bettens et al., 2012; Khurana et al., 2001). Des essais *in vitro* ont démontré que la CLU est capable d'inhiber puissamment les deux formes d'agrégation de protéines, et est classée comme une chaperonne "holdase" (D. T. Humphreys et al., 1999; Poon et al., 2000; Yerbury et al., 2007). Le terme *holdase* signifie que, comme les petites protéines de choc thermique intracellulaires, CLU se lie aux protéines mal repliées d'une manière indépendante de l'ATP, afin de les stabiliser sous une forme soluble et d'empêcher leur agrégation.

Une démonstration de l'importance physiologique de la fonction chaperonne de CLU est l'observation que son immunodéplétion du plasma sanguin humain rend les protéines plasmatiques sensibles à la précipitation induite par le stress (Poon et al., 2002). En outre, les souris *knock-out* pour CLU présentent des dommages tissulaires accrus après un choc thermique (Bailey et al., 2002), une myocardite auto-immune induite par la myosine (McLaughlin et al., 2000), ou après une lésion cérébrale post-ischémique (Wehrli et al., 2001). Le vieillissement des souris *knock-out* pour CLU développe des dépôts de protéines dans les reins, ce qui entraîne une neuropathie glomérulaire, impliquant directement CLU dans la clairance des protéines mal repliées (Rosenberg et al., 2002).

Il a été suggéré que la sCLU facilite la clairance des protéines extracellulaires mal repliées et des agrégats qu'elles forment en se liant à elles et en favorisant leur internalisation *via* des récepteurs spécifiques de la surface cellulaire (Wyatt et al., 2011) pour une dégradation ultérieure *via* le système ubiquitine-protéasome et/ou l'autophagie (Nizard et al., 2007; F. Zhang et al., 2014). L'injection de complexes formés entre CLU et les protéines mal repliées dans les veines de la queue des rats, a montré leur absorption rapide par des hépatocytes et leur trafic ultérieur vers les lysosomes pour leur dégradation (Wyatt et al., 2011). Il a également été

proposé que la CLU travaille avec le système d'activation du plasminogène pour promouvoir la clairance des agrégats de protéines pathologiques de l'espace extracellulaire (Constantinescu et al., 2017). Les agrégats protéiques amorphes activent la plasmine *in vitro* et la plasmine activée facilite à son tour la décomposition protéolytique des agrégats de protéines en fragments protéiques de taille hétérogène générés par la plasmine qui contiennent des régions hydrophobes exposées (Constantinescu et al., 2017). Il a été proposé que la CLU fait partie d'un système de contrôle qualité des protéines extracellulaires qui contribue au maintien de la protéostase (Yerbury et al., 2005) (Figure 20).

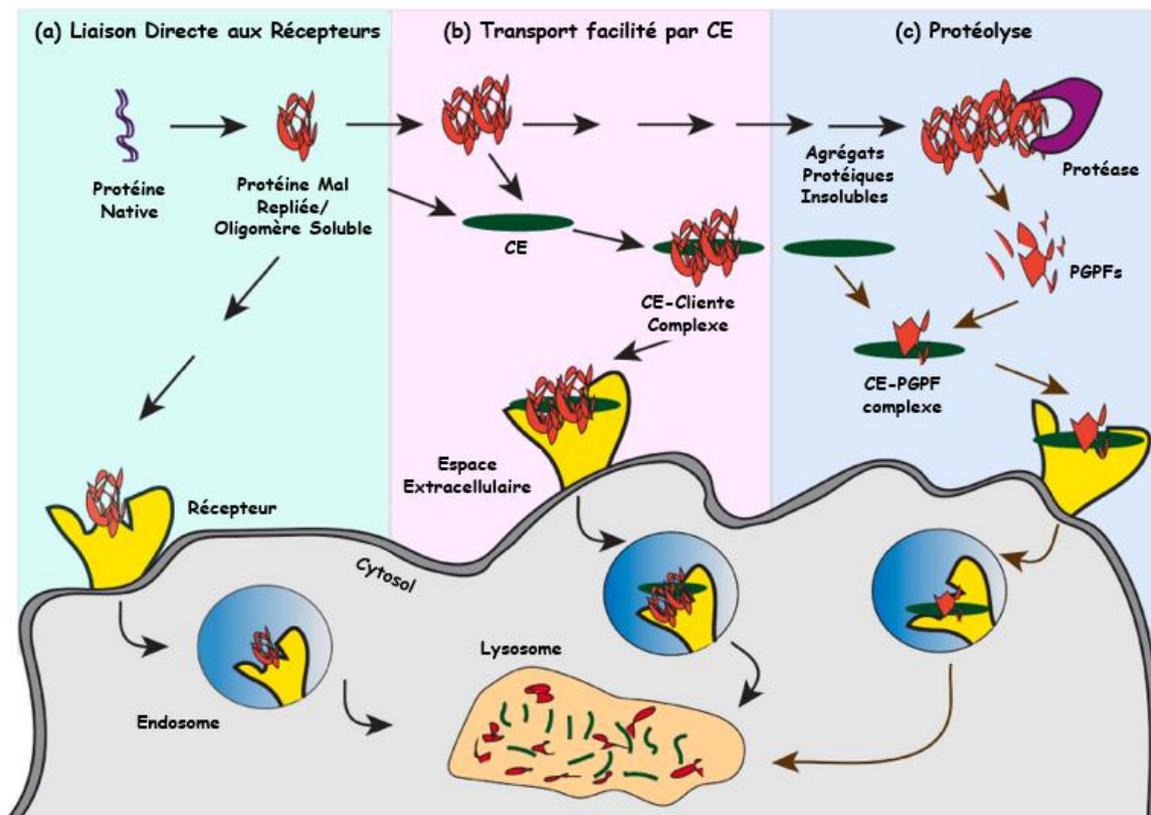


Figure 20 : Rôles des chaperons extracellulaires dans la protéostase. Les protéines mal repliées dans les fluides corporels peuvent se lier directement aux récepteurs de la surface cellulaire pour être internalisées puis dégradées dans les lysosomes (a). Par ailleurs, les protéines clientes mal repliées (sous forme de monomères ou d'oligomères potentiellement toxiques) peuvent être liées à un chaperon extracellulaire (CE) tel que la CLU qui neutralise leur toxicité, inhibe leur agrégation ultérieure et facilite leur absorption par les récepteurs et leur dégradation intracellulaire dans les lysosomes (b). Enfin, la CLU peut se lier à des fragments de protéines cytotoxiques générés par la plasmine (PGPF, plasmin-generated protein fragments) libérés par la dégradation protéolytique d'agrégats protéiques amorphes afin de neutraliser leur toxicité et de faciliter leur absorption/dégradation, comme décrit précédemment (c). Modifié d'après (Wilson et al., 2021).

IV. La clusterine dans des situations physiopathologiques

L'objectif principal dans cette partie est d'explorer le rôle de la CLU dans les pathologies ischémiques spécifiquement au niveau du cœur. Cependant, la compréhension du rôle de la CLU dans d'autres pathologies, tissus et cellules permet de mieux comprendre le mécanisme d'action de la CLU qui peut éclairer davantage son rôle dans l'I/R myocardique.

A. Maladies neuro dégénératives

La maladie d'Alzheimer (MA) est marquée par deux caractéristiques pathologiques, des plaques neuronales contenant la protéine β -amyloïde et des dégénérescences neurofibrillaires qui sont constituées de paires hélicoïdales de filaments contenant la protéine *tau* (Selkoe, 2004). Les mécanismes de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer ont fait l'objet d'une étude approfondie et la principale hypothèse soutenue par des preuves génétiques et neuropathologiques est l'hypothèse de la cascade amyloïde. Elle suggère que la MA est causée en partie par la surproduction et l'absence de clairance du peptide β -amyloïde ($A\beta$). L' $A\beta$ est générée par des clivages séquentiels de la protéine précurseur amyloïde par les β - et γ -sécrétases. L'oligomère $A\beta$ est l'espèce la plus toxique et cause une lésion directe aux neurones, accompagnée d'une neuro-inflammation accrue, d'une astrocytose, d'une gliose et finalement d'une perte neuronale. Les études d'association pangénomique ont révélé plusieurs polymorphismes mononucléotidiques (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) au sein du gène CLU qui sont des facteurs de risque de la MA (Bertram et al., 2007; Harold et al., 2009). En outre, des mutations dans la séquence codant pour la chaîne β de la CLU ont également été identifiées comme un facteur de risque génétique de la MA (Bettens et al., 2012). La CLU est surexprimée dans le cerveau des patients atteints de la MA par rapport aux sujets sains (Bertrand et al., 1995) et est physiquement associée aux plaques extracellulaires riches peptide en $A\beta$ (Calero et al., 2000; May et al., 1990). La CLU est distribuée à des niveaux élevés dans les régions du cerveau présentant une pathologie de plaque, reflétant approximativement la distribution régionale d' $A\beta$, et les niveaux de CLU sont corrélés positivement avec la gravité de l'angiopathie amyloïde cérébrale (Miners et al., 2017).

Les effets de CLU sur l'agrégation du peptide A β sont complexes. Dans un modèle murin de la MA, le *knockout* de la CLU a réduit le dépôt amyloïde A β fibrillaire et la neurotoxicité (DeMattos et al., 2002). Un résultat similaire a été montré pour les souris déficientes pour l'apolipoprotéine E (apo E), mais le double knock-out de la CLU et de l'apo E a entraîné une apparition précoce de la maladie, une augmentation marquée des taux de peptides A β et la formation d'amyloïdes (DeMattos et al., 2004). *In vitro*, la CLU peut soit inhiber puissamment la formation de l'amyloïde A β soit à des rapports très faibles de CLU:A β (par exemple, 1:500) augmenter la formation d'amyloïdes (Yerbury et al., 2007).

B. Cancer

La surexpression de CLU a été trouvée dans la majorité des tumeurs étudiées, notamment cancer gastrique (Mu et al., 2020), de la prostate (Zellweger et al., 2003), du sein (Yom et al., 2009), du poumon (July et al., 2004) et du mélanome (Mustafi et al., 2017), sans corrélation avec le sexe, l'âge ou le type histologique (Niu et al., 2007), et elle a été proposée comme une cible valable dans la recherche sur le cancer (Shannan et al., 2006; Tellez et al., 2016). Un niveau élevé de sCLU était significativement lié au stade pathologique et au grade de la tumeur avancée dans le cancer, ainsi qu'à une faible survie sans récurrence des patients (Kurahashi et al., 2005; Miyake et al., 2005). De nombreuses études certifient aussi que CLU est un biomarqueur utile et prometteur dans différents types de cancer, notamment le cancer de l'œsophage (W. Guo et al., 2014), le carcinome hépatocellulaire (Nafee et al., 2012), le cancer colorectal (Artemaki et al., 2020), l'ostéosarcome (J. Ma et al., 2019), le cancer de l'ovaire (Lyu et al., 2018), le cancer de la prostate (Blumenstein et al., 2013) et le cancer gastrique (Bi et al., 2010). Cependant, son rôle précis au cours de l'apparition et de la progression du cancer n'est toujours pas clair et fait l'objet d'études intensives.

Les cellules tumorales semblent perdre leur capacité à accumuler la nCLU (Leskov et al., 2011) et peuvent rapidement dégrader la CLU par l'intermédiaire du protéasome pour éviter l'apoptose (Rizzi & Bettuzzi, 2010). Elles deviennent également plus agressives et plus résistantes aux cytotoxiques et à plusieurs cytokines dont le TGF- β et le TNF- α (Flanagan et al., 2010). Dans cette optique, les cellules tumorales sont caractérisées par la surexpression de sCLU et par la régulation négative de nCLU. Cette augmentation du rapport sCLU/nCLU a été liée à l'initiation et à la progression spontanée de la tumeur (Hassan et al., 2011; Koltai, 2014; Redondo et al., 2000; B. Sun et al., 2007).

C. Maladies cardiovasculaires

Comme évoqué ci-dessus, la CLU possède à la fois des fonctions pro-survie et pro-apoptotiques et elle est cytoprotectrice dans les cellules tumorales. Le rôle de la CLU dans le cœur est considéré principalement comme protecteur dans les cellules cardiaques lors de dommages et des maladies. On observe fréquemment une augmentation de l'expression de la CLU dans le cœur après un dommage (Ishikawa et al., 1998; G. Liu et al., 2018; McLaughlin et al., 2000; Swertfeger et al., 1996). Cette élévation de la CLU est un marqueur potentiel de pronostic pour les lésions cardiaques : les patients ayant subi une greffe de cœur qui se rétablissent présentent une augmentation de la CLU plasmatique par rapport à ceux qui ne se rétablissent pas (Hollander et al., 2014). Des preuves solides suggèrent que le rôle protecteur de la CLU est lié à sa fonction de transport de lipides et de graisses. Premièrement, la CLU n'est exprimée que dans des artères endommagées dans les premiers stades de l'athérosclérose, où elle peut agir pour augmenter le transport des graisses et des lipides, et non pas dans les artères saines (Ishikawa et al., 1998). Deuxièmement, la CLU et l'APOE forment des particules HDL dans le plasma sanguin avec l'APOA-I et la paraoxonase (Baralla et al., 2015), favorisant leur transport et leur transformation dans le foie (Rizzi, Coletta, et al., 2009). Troisièmement, la CLU élimine le cholestérol des macrophages spumeux, qui sont un type cellulaire clé dans les lésions d'athérosclérose (Gelissen et al., 1998). Cela ne veut pas dire que les fonctions anti-apoptotiques et anti-oxydantes de la CLU ne contribuent pas également à son rôle protecteur. Il a été démontré que la CLU inhibe l'apoptose et protège les cellules cardiaques de l'I/R après une transplantation cardiaque (G. Liu et al., 2018), et elle est associée à une réduction des signaux pro-inflammatoires tels que le TNF- α et le signal pro-apoptotique BAX, et à une augmentation du gène anti-apoptotique BCL-XL (Foglio et al., 2015; Jun et al., 2011; G. Liu et al., 2018). La CLU peut également agir comme un anti-oxydant dans le cœur (Mackness et al., 1997), fonction qui semble dépendante de la phosphorylation des voies Akt/GSK-3 β et PI3K (Jun et al., 2011; X. Liu et al., 2015).

Il existe de multiples preuves suggérant que la CLU humaine peut avoir une association clinique significative avec de multiples facettes du risque cardiovasculaire. Les niveaux de CLU plasmatique circulante (sCLU) sont fortement associés au facteur pro-inflammatoire, la CRP (Won et al., 2014), à divers marqueurs lipidiques de risque cardiovasculaire accru et à l'augmentation de la pression artérielle systolique et diastolique (Aronis et al., 2011; Bradley et al., 2019). La CLU circulante est aussi associée négativement avec la leptine dans les maladies cardiovasculaires liées à l'obésité (Poulakou et al., 2008). L'analyse protéomique a montré des

niveaux plus élevés de CLU dans les plaques athérosclérotiques carotidiennes par rapport aux plaques non athérosclérotiques (Aragonès et al., 2016). Toutes les études, cependant, n'ont pas confirmé un rôle bénéfique de la CLU dans les maladies cardiovasculaires. Une étude récente a montré qu'un taux plus faible de CLU sérique était associé à des taux plus élevés de mortalité chez les patients souffrant d'insuffisance cardiaque (Koller et al., 2017), indiquant une incertitude sur l'importance de la CLU circulante dans le processus des maladies cardiovasculaires.

D. Pathologies ischémiques

La CLU est impliquée dans les pathologies ischémiques et pourrait jouer un rôle protecteur vis-à-vis des lésions secondaires liés à l'I/R. Au niveau cérébral et rénal, des souris invalidées pour CLU et soumises à une I/R développent des lésions plus sévères et une cicatrisation pathologique (Imhof et al., 2006; W. Zhou et al., 2010). Des études menées sur des modèles animaux confirment le rôle neuroprotecteur de la CLU dans les événements ischémiques précoces et ont démontré que cette glycoprotéine joue un rôle central dans le remodelage des dommages ischémiques (Imhof et al., 2006). De même, la perfusion intraventriculaire de CLU a un effet protecteur en cas de lésion cérébrale traumatique en supprimant la réponse inflammatoire (activation gliale, expression des cytokines), la rupture de la barrière hémato-encéphalique et l'œdème cérébral chez les souris (Z. Huang et al., 2016). En outre, Song et al. ont mesuré la CLU sérique chez des patients ayant subi un AVC ischémique aigu dans les 24 heures suivant l'apparition de l'AVC et ont observé des concentrations sériques de CLU significativement plus élevées chez les patients ayant subi un AVC que chez les témoins sains (Song et al., 2019).

Au niveau rénal, la CLU supprime l'infiltration des macrophages et le M1 pro-inflammatoire pendant la période de récupération suivant les lésions I/R, ce qui peut être en partie responsable de la réparation des tissus dans les reins des souris *wild type* après une lésion (J. Guo et al., 2016; Sarkar et al., 2021; Weng et al., 2021). Il est intéressant de noter que la surexpression de la CLU semble être protectrice, car les souris *knockout* pour la CLU ont montré une plus grande sensibilité aux lésions I/R rénale et une altération de la réparation rénale par les lésions I/R (Nguan et al., 2014; W. Zhou et al., 2010).

Les taux plasmatiques de CLU ont été montrés soit augmentés soit diminués selon le stade de l'infarctus (Cubedo et al., 2011; Trougakos et al., 2002). Récemment, des études montrent des résultats contradictoires : des niveaux élevés de CLU plasmatique ont été détectés 120 minutes après le début de l'IDM suggérant la CLU comme un biomarqueur précoce supplémentaire de l'ischémie myocardique (Traxler et al., 2020), ou des niveaux circulants de CLU réduits très tôt après le début de l'ischémie. Sa diminution continue serait un marqueur de mauvais pronostic, et permettrait d'identifier les patients présentant une ischémie prolongée après l'IDM (Cubedo et al., 2022). En outre, des taux plasmatiques élevés de CLU seraient associés au remodelage du ventricule gauche (Turkieh et al., 2018). De plus, l'expression de la CLU serait plus élevée dans la zone d'infarctus et la zone bordant le territoire ischémique que dans la zone saine (Krijnen et al., 2005; Silkensen et al., 1998). Outre son rôle diagnostique, la CLU a également été utilisée à des fins thérapeutiques dans des études animales. L'injection répétée de CLU pendant 3 jours débutant dès la reperfusion pourrait diminuer la taille de l'infarctus chez le rat (Dijk et al., 2010).

BUT DU TRAVAIL

Nous avons vu dans les chapitres précédents que des approches thérapeutiques, telles que la prévention de libération de DAMPs, la neutralisation des DAMPs ou le blocage de leurs récepteurs et/ou de leurs voies de signalisation pourraient être envisagées comme stratégie de cardioprotection (Zuurbier et al., 2019). Parmi les DAMPs, les histones ont été associés à des effets cytotoxiques dans le cadre d'une I/R myocardique (Vogel et al., 2015). Il a récemment été démontré que la CLU pouvait neutraliser les effets pro-inflammatoires et cytotoxiques des histones dans le cadre du choc septique (données non publiées du laboratoire Inserm U1307 – CNRS UMR 6075 - CRCI²NA - Equipe 4). Cependant, le rôle physiopathologique de la CLU dans le contexte de l'I/R myocardique n'est pas connu. Nous avons émis l'hypothèse que la CLU, par son rôle de protéine chaperonne sur les histones, pouvait jouer un rôle régulateur/protecteur au décours de l'IDM.

Les travaux de la thèse sont donc organisés en trois parties (Figure 21) :

Première partie : L'objectif est de déterminer la cinétique de la libération de la CLU, des histones et de la formation des complexes CLU-histones au décours de l'IDM.

Deuxième partie : L'objectif est d'analyser l'existence d'un effet cardioprotecteur de la CLU dans des modèles *in vitro* et pré-clinique d'IDM.

Troisième partie : L'objectif est de rechercher les voies de signalisation inflammatoire modulées par la CLU dans le contexte de l'IDM.

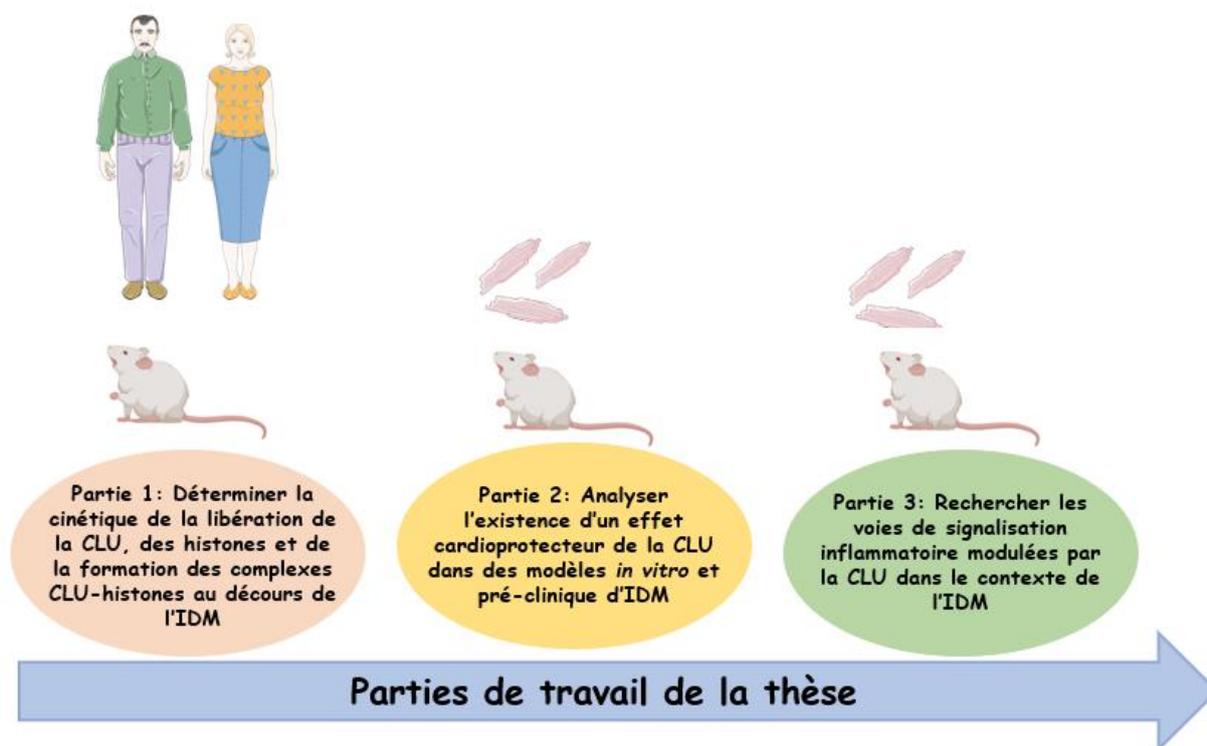


Figure 21 : Parties de travail de la thèse.

MATERIELS ET METHODES

I. Modèle *in vitro* d'hypoxie-réoxygénation

L'ischémie correspond à une diminution ou même un arrêt de la circulation sanguine au niveau d'un organe aboutissant à une diminution de l'apport d'O₂ et de nutriments aux cellules. La reperfusion consiste à rétablir cette circulation et donc à un afflux brutal d'O₂ et des nutriments. Afin de mimer une ischémie *in vitro*, deux conditions sont essentielles : priver les cellules en O₂ et en nutriments. Ceci est assuré respectivement par une chambre à hypoxie et en remplaçant le milieu de culture nutritif par une solution isotonique (Tyrode) dépourvue de nutriments.

A. Lignée cellulaire H9C2

Nous avons travaillé sur la lignée cellulaire H9C2 (American Type Culture Collection [ATCC], CRL-1446). La lignée H9C2 constitue une lignée immortalisée de cardiomyoblastes dérivées de cœurs embryonnaires de rats. Les cellules H9C2 se sont avérées proches des cardiomyocytes primaires normaux en ce qui concerne leurs caractéristiques de métabolisme énergétique. Comme les cardiomyocytes primaires, elles sont sensibles à l'hypoxie, par conséquent elles peuvent être adaptées à la conception du modèle *in vitro* d'IDM. En outre, il est approprié de les utiliser pour étudier les mécanismes des lésions d'I/R et évaluer l'efficacité de diverses interventions thérapeutiques (Kuznetsov et al., 2015).

Les cellules H9C2 sont cultivées dans du milieu de culture standard (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) – high glucose 4,5 g/L) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Eurobio) et 1% d'antibiotiques (Penicilline/Streptomycine 10 000 U/10 mg/mL, PAN-Biotech) dans un incubateur à dioxyde de carbone (CO₂) (21% O₂, 5% CO₂, 74% azote (N₂)) à 37°C. Les cellules sont détachées lorsqu'elles atteignent 70 à 80% de confluence afin d'éviter la différenciation des cellules H9C2 en myotubes polynucléés et elles sont réensemencés de nouveau (Kimes & Brandt, 1976).

B. Modèle d'hypoxie-réoxygénation

Pour réaliser l'hypoxie-réoxygénation (H/R), nous avons utilisé une chambre à hypoxie (O2Sens box, ADEL BIO SAS, Clermont-Ferrand, Auvergne, France). Cette enceinte hermétique en plexiglas est alimentée par un mélange de 95% de N₂ et 5% de CO₂. Le taux

d'O₂ dans la chambre est monitoré en continu pour être inférieur à 1% grâce à un logiciel (O₂ sens monitor) et une sonde sensible à l'O₂ reliée à la chambre (Figure 22).

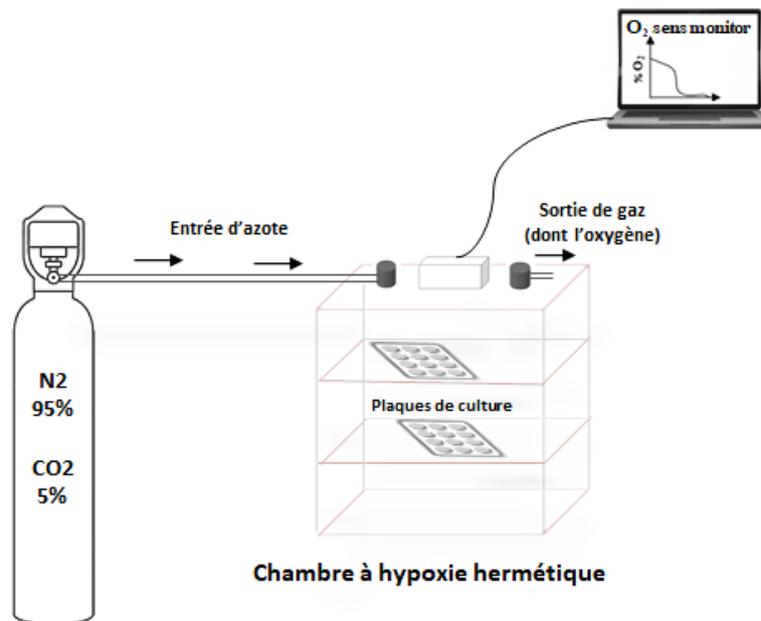


Figure 22 : Chambre à hypoxie.

Les cellules ont étéensemencées la veille de l'expérience dans des plaques de culture à 12 puits à une densité de 60% soit une densité cellulaire moyenne de 8000 cellules/cm². Le lendemain, les cellules du groupe H/R sont mises dans la chambre à hypoxie (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂) à 37°C en présence d'une solution de Tyrode (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, pH =7.4) après 3 lavages avec cette même solution pendant une séquence appelée « séquence d'hypoxie ». La réoxygénation consiste ensuite à ajouter dans chaque puit un milieu complet (DMEM + 10% SVF + 1% d'antibiotiques) et mettre les cellules dans un incubateur à CO₂ (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) à 37°C pendant une séquence appelée « séquence de réoxygénation ». Les cellules du groupe contrôle (CTL) sont laissées en parallèle dans du DMEM complet et dans l'incubateur à CO₂ pendant toute la séquence d'H/R.

Nous avons mis au point une séquence d'H/R pour nos conditions expérimentales *in vitro*. Cette séquence a été obtenue en testant différentes durées d'hypoxie et différentes durées de réoxygénation. Pour chaque séquence d'H/R, la mortalité cellulaire des cellules était le critère de référence. Une mortalité cellulaire entre 20% et 30% était considérée convenable pour l'évaluation de l'efficacité des traitements. Dans nos conditions expérimentales, une hypoxie

de 6 heures suivie de 2 heures de réoxygénation s'est révélée la séquence d'H/R optimale (Figure 23).

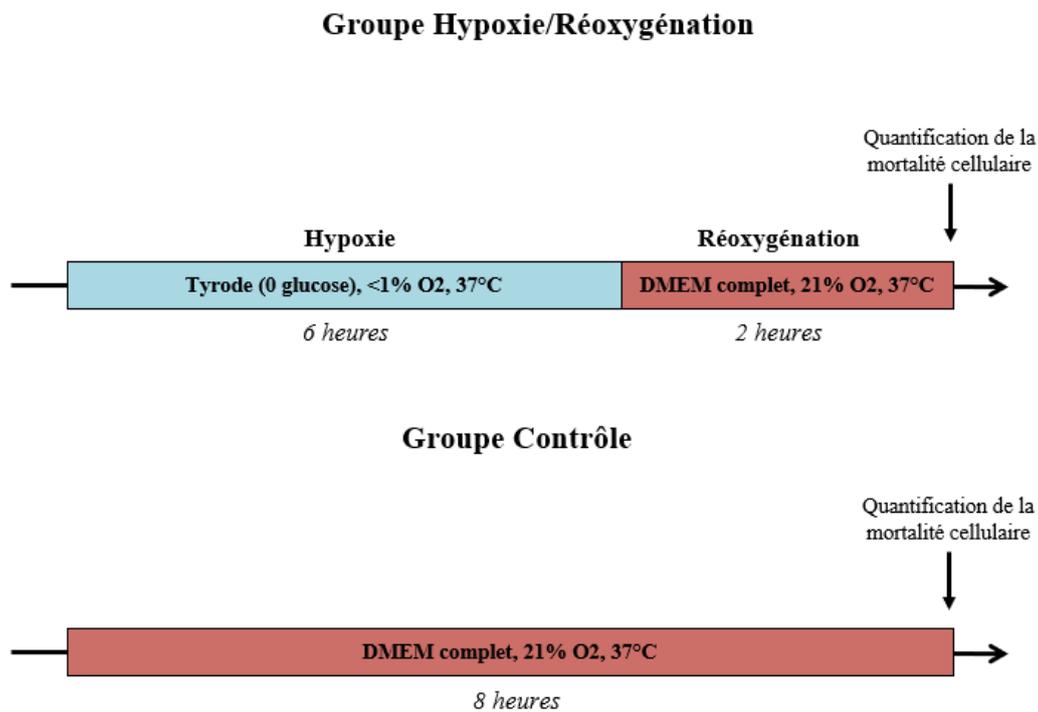


Figure 23 : Protocole expérimental in vitro d'hypoxie/réoxygénation.

C. Quantification de la mortalité cellulaire

La quantification de la mortalité cellulaire est faite après que les cellules ont été décollées à la fin de la séquence d'H/R et de la séquence contrôle (CTL) par l'analyse du marquage à l'iodure de propidium (IP) (5µg/ml) en cytométrie en flux (MACSQuant Analyzer). L'IP, marqueur de l'intégrité membranaire, est un agent intercalant des acides nucléiques capable de pénétrer dans les cellules en cas de membrane cellulaire endommagée, c'est-à-dire qui présentent une membrane perméabilisée ou fragilisée. Une fois fixé à l'ADN, l'IP émet une fluorescence ce qui permet sa détection en cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules positives à l'IP est considéré comme le pourcentage de cellules mortes. L'analyse de la mortalité cellulaire est effectuée sur un total de 10000 évènements.

II. Modèle *in vivo* d'ischémie-reperfusion

Nous avons utilisé un modèle expérimental d'IDM chez la souris. Cette technique consiste à induire chirurgicalement une I/R myocardique *in vivo* par ligature de l'artère coronaire.

A. Souris

Les animaux utilisés sont des souris mâles âgées de 12 à 16 semaines et pesant 25 à 30 grammes :

Souris C57BL/6J provenant de l'élevage Janvier Labs (Le Genest St Isle, France)

Souris déficientes en CLU (CLU $-/-$) et leurs compagnons de portée *wild type* (WT) provenant de l'élevage Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) en collaboration avec l'équipe (Innate Immunity and Immunotherapy - CNRS 6299 - INSERM U892 – Angers – France).

Les autorisations de projet utilisant des animaux ont été obtenues auprès du Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche et de l'Innovation sous le numéro APAFIS # 14109-2018031514075152 v4.

B. Modèle d'ischémie-reperfusion myocardique

Les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (80 mg/kg, Céva Santé Animale). Elles sont intubées et ventilées avec un ventilateur Minivent Typ845 (Hugo-Sachs Elektronik, March Hugstetten, Allemagne). La température corporelle des souris est monitorée par un thermomètre rectal relié à un monitor (Harvard Apparatus, Les Ulis, France) et elle doit être maintenue entre 36.5 et 38°C à l'aide d'un tapis chauffant et d'une couverture. Les souris reçoivent une injection intra-péritonéale d'héparine (1,000 IU/kg, Heparine Choay, Sanofi aventis, Paris, France) avant la procédure chirurgicale. Une thoracotomie gauche est réalisée au niveau du 4ème espace intercostal avec ouverture du péricarde. Un fil chirurgical PREMIO 7-0 (Péters Surgical, Domalain, France) est placé autour de l'artère interventriculaire antérieure (IVA) et la ligature est maintenue grâce à un tube de polyéthylène de 0,5 cm de long (Cole-Parmer, Vernon Hills, Etats-Unis).

Une séquence d'I/R est réalisée avec occlusion de l'artère IVA pendant 40 minutes suivie d'une reperfusion soit de 3 heures soit de 24 heures [une séquence d'I/R (40 minutes/3 heures) est utilisé pour étudier les voies inflammatoires au niveau du tissu cardiaque après IDM]. L'ischémie est confirmée visuellement par l'apparition d'une cyanose à la surface du myocarde. La phase de reperfusion débute une fois les 40 minutes d'ischémie réalisées en relâchant le tube de polyéthylène d'autour de l'IVA. Le thorax est refermé en laissant le fil chirurgical autour de l'IVA et les souris sont placées dans une couveuse chauffée jusqu'à leur réveil complet. Une injection post-opératoire en sous-cutané d'un analgésique, la buprénorphine (0,1 mg/kg, Buprécare, Animalecare Ltd, York, Royaume-Unis) est effectuée.

C. Quantification de la taille de l'infarctus

Après 40 minutes d'ischémie et 24 heures de reperfusion, les souris sont de nouveau anesthésiées et ventilées selon le protocole décrit précédemment. Le thorax est réouvert et l'IVA est ré-occluse à l'aide du fil laissé en place. Une solution de colorant bleu, le Bleu d'Evans à 4% (400 µl, Sigma-Aldrich Co, Missouri, Etats-Unis) est injectée au niveau de l'apex du cœur afin de délimiter l'AAR. Le Bleu d'Evans permet de délimiter la partie du cœur non soumise à l'ischémie (en bleu) de celle soumise à l'ischémie (AAR) qui apparaîtra non colorée. Ensuite, le cœur est prélevé et le ventricule gauche (VG) est récupéré afin de le sectionner parallèlement au sillon auriculo-ventriculaire en 6 coupes transversales. Toutes les coupes sont photographiées grâce au logiciel *Leica Application Suite V3.8 (LAS)* permettant la mesure de l'AAR. Les coupes sont ensuite incubées pendant 4 minutes dans une solution de Chlorure de Triphényltétrazolium 1% (TTC, Sigma-Aldrich) à 37°C et elles sont fixées dans une solution de formol à 10 % pendant 24 heures. Les coupes de myocarde sont de nouveau photographiées et pesées. Le TTC permet de séparer l'AAR en deux parties : en blanc l'aire nécrosée (AN) et en rouge brique l'aire non nécrosée où le myocarde viable. L'AAR et l'AN sont quantifiées à l'aide du logiciel de planimétrie ImageJ (National Institutes of Health, MD, Etats-Unis). L'AAR et l'AN sont rapportées au poids des coupes, exprimé en milligrammes. Les rapports AN/AAR, AN/VG, AAR/VG sont alors calculés. (Figure 24).

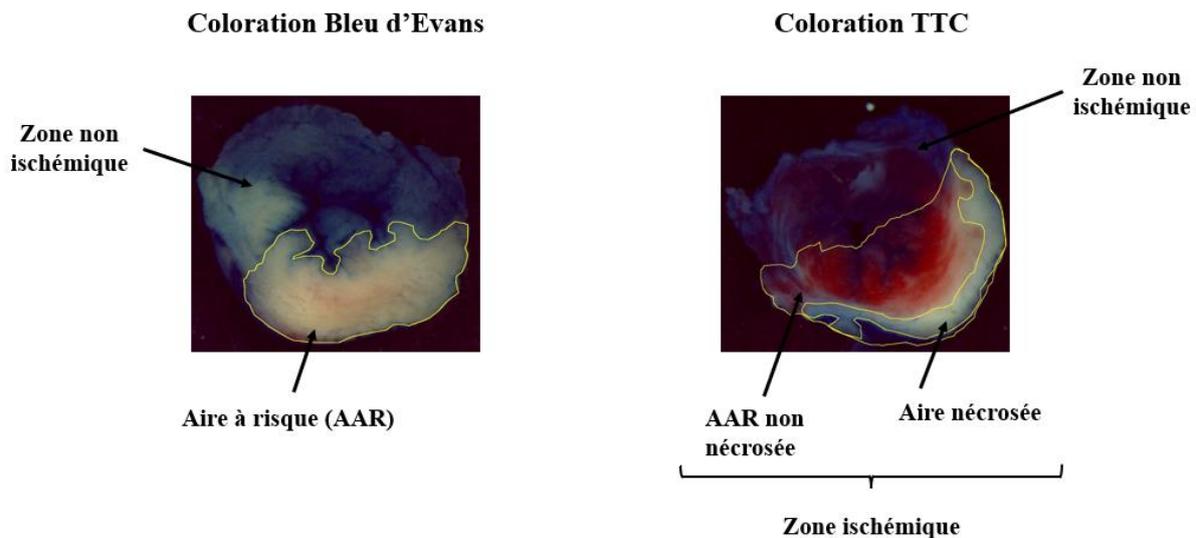


Figure 24 : Evaluation de taille de l'infarctus par planimétrie après la séquence d'I/R. La figure de gauche montre la coupe du ventricule gauche après coloration de Bleu d'Evans alors que la figure de droite montre la coupe après coloration au TTC. TTC : Chlorure de Triphényltétrazolium, AAR : aire à risque.

III. Etude clinique

Le travail sur la cohorte HIBISCUS-STEMI est faite en collaboration avec Dr Thomas Bochaton (Unité de soins intensifs cardiologiques USIC - Hospices Civils de Lyon /CarMeN Laboratory - INSERM U1060 – Lyon – France). Les autorisations du travail sur cette cohorte ont été obtenues auprès de l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des Produits de santé) ainsi que des avis favorables auprès du CPP (Comité de Protection des Personnes) Sud-Est III. Cette étude fait partie du RHU (projet de Recherche Hospitalo-Universitaire en Santé) Marvelous (ANR-16-RHUS-0009).

A. Cohorte HIBISCUS-STEMI

Les patients étudiés sont issus de la cohorte HIBISCUS-STEMI (*coHort of patients to Identify Biological and Imaging markerS of Cardiovascular outcomes in ST Elevation Myocardial Infarction*). Ils ont été hospitalisés pour un syndrome coronarien aigu avec sus-décalage du segment ST et ont bénéficié d'une coronarographie en urgence avec revascularisation par angioplastie coronaire. Des prélèvements sanguins ont été réalisés au moment de la

revascularisation, après 4 heures, 24 heures, 48 heures et 1 mois ainsi qu'une IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) cardiaque au 30ème jour.

B. Donneurs sains

Les sérums et les plasmas des donneurs sains proviennent du centre de collecte de sang (EFS Pays de la Loire, Angers, France, accord ANG-2003-2).

IV. Méthodes d'analyses

A. Analyse de l'expression des protéines par western Blot

1. Extraction et dosage des protéines

Les échantillons ventriculaires congelés ont été broyés à l'aide d'un homogénéiseur (Polytron® PT2100) dans un tampon d'extraction (30 mM HEPES, 2.5 mM EGTA, 2.5 mM EDTA, 20 mM KCl, 40 mM B-glycérophosphate, 40 mM NaF, 4 mM NaPPi, Glycérol 10 %, Nonidet P4 0.1 % + 1% inhibiteur de protéase et phosphatase 100 X (Thermo scientific)) à 4°C. L'homogénat obtenu a ensuite été centrifugé à 1300 tours/minute pendant une heure à 4°C. Le surnageant était ensuite récupéré et congelé à - 80°C. Les protéines des cellules H9C2 sont extraites par grattage des cellules dans du tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris-base, Triton X-100 1%, Na déoxycholate 0.5%, SDS 0.1% + 1% inhibiteur de protéase et phosphatase 100 X (Thermo scientific)) après les avoir rincées 2 fois avec du PBS 1X froid. L'homogénat obtenu était ensuite centrifugé à 12000 rpm pendant 20 minutes à 4°C. Le surnageant était ensuite récupéré et congelé à - 80°C.

Le dosage des protéines est fait à l'aide d'un kit de dosage BCA (bicinchonidic acid) (Pierce Micro BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). La concentration en protéines de l'échantillon est déterminée par rapport à une gamme étalon BSA (Bovine Serum Albumine) de concentrations protéiques connues (de 0 à 50 µg/ml). Le dosage des protéines était réalisé par spectrophotométrie à 562 nm.

2. Western Blot

Les échantillons étaient préparés avec du β -mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich) et bouillis pendant 5 minutes à 95°C afin de dénaturer les protéines. Une même quantité de protéines (15 à 75 μ g) de chaque échantillon était déposée et séparée par électrophorèse sur un gel polyacrylamide-SDS (10-15%) puis transférées sur une membrane nitrocellulose ou PVDF (polyvinylidène difluoride). Le transfert des protéines est vérifié au Rouge Ponceau. Un marqueur de poids moléculaire (New England BioLabs) était également déposé sur chaque gel. Pour la CLU, toutes les procédures ont été réalisées en condition non-dénaturante. Pour cela les échantillons étaient préparés à froid, sans agent dénaturant β -mercaptoéthanol. Ensuite les membranes étaient incubées pendant 1 heure dans une solution de blocage TBS-T (Tris-buffered saline, 0.1 % Tween 20) avec du lait à 5 % ou de la BSA à 5%. Une fois cette étape terminée, les membranes étaient rincées 3 fois dans du TBS-T puis incubées sous agitation lente avec l'anticorps primaire spécifique pendant toute la nuit à 4° C (Tableau 3). Ensuite les membranes étaient rincées 3 fois au TBS-T puis incubées avec l'anticorps secondaire approprié couplé à la peroxidase (HRP pour HorseRadish Peroxidase) (Tableau 4) sous agitation lente pendant 1 heure à température ambiante. A nouveau les membranes étaient rincées 3 fois au TBS-T puis exposées à un réactif luminescent : soit le Clarity Western ECL Substrate (BioRad) soit le SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity substrate (Thermo Scientific™). Enfin, la révélation des protéines se fait à l'aide de la caméra à détection chimioluminescente (ChemiDoc™ MP imaging system de BioRad). Les bandes des protéines ont été quantifiées par le logiciel Image Lab (BioRad). Les niveaux d'expression des protéines évaluées ont été exprimées en fonction de la quantité de GAPDH de l'échantillon.

Anticorps primaire	Espèce	Fournisseur	Référence	Dilution
Anti-Clusterin	Souris	R&D systems	#AF2747	1/2000
Anti-GAPDH	Souris	Sigma-Aldrich	G8795	1/10000
Anti-GAPDH	Lapin	Cell signaling	#2118	1/1000
Anti-p-p65	Lapin	Cell signaling	#3033	1/1000
Anti-p65	Lapin	Cell signaling	#4764	1/1000
Anticorps secondaire	Espèce	Fournisseur	Référence	Dilution
Anti-rabbit HRP	Chèvre	Thermo Scientific	Fisher #31460	1/5000
Anti-mouse HRP	Chèvre	Thermo Scientific	Fisher #31430	1/5000
Anti-goat HRP	Âne	Thermo Scientific	Fisher #31402	1/5000

Tableau 4 : Anticorps primaires et secondaires utilisés en Western Blot. Anti-GAPDH: Anti-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Anti-JNK : Anti-c-Jun N-terminal Kinase, HRP : HorseRadish Peroxidase.

B. Analyse de l'expression des gènes par RT-qPCR

1. Extraction et dosage des ARN

L'extraction des ARN à partir des tissus ventriculaires et des cellules H9C2 est réalisée à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Les échantillons ventriculaires congelés sont d'abord broyés et homogénéisés dans le tampon de lyse Qiazol (Qiagen) avec un broyeur-homogénéiseur, l'ultra turrax (PRO scientifique PRO250). Après ajout de chloroforme, les extraits ont été centrifugés à 4°C à 12 000 g durant 15 min. La phase aqueuse est récupérée, mélangée avec un volume égal d'éthanol 70%, et déposée sur une mini colonne de spin ARN fournie avec le kit. Pour les H9C2, les cellules lavées avec du PBS sont d'abord lysées dans un tampon de lyse supplémenté de β -mercaptoéthanol 1% (v/v). Elles sont mélangées avec un volume égal d'éthanol 70%, et déposées sur la mini colonne de spin ARN. Après plusieurs lavages dans différents tampons, l'ARN purifié est élué dans de l'eau RNase-

free (30-50µl). Les ARN ainsi obtenus ont été dosés par spectrophotométrie sur un NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific), puis conservés à -20°C.

2. Transcription inverse et PCR quantitative

Les ARN extraits ont été ensuite rétrotranscrits en ADN complémentaire (ADNc) en utilisant le kit Quantitect Reverse Transcription (Qiagen). L'ADN génomique est éliminé par incubation des échantillons avec le mix gDNA Wipeout pendant 2 min à 42°C dans le thermocycleur. Après l'ajout du mix réactionnel, la synthèse d'ADNc a été effectuée en plaçant de nouveau les échantillons dans l'appareil en utilisant le programme suivant : 30 min à 42°C, 3 min à 95°C.

Les ADNc ainsi obtenus ont été amplifiés par PCR quantitative en utilisant le SYBR™ Select Master Mix (Applied biosystems). Les amorces utilisées sont listées dans le tableau 5. La réaction d'amplification a été réalisée dans le thermocycleur LightCycler® 480 II (Roche) selon la séquence suivante : 3 min à 95°C puis 40 cycles d'amplification de 15s à 95°C et de 1 min à 60°C. La valeur de Ct (Cycle threshold ou encore cycle de seuil) du gène d'intérêt obtenue pour chaque échantillon est soustraite de la moyenne de la valeur des Ct des gènes de référence (Gapdh, Gusb et Hprt) et utilisée pour une quantification relative du niveau d'expression du gène d'intérêt par rapport au groupe contrôle *in vitro* ou par rapport à la zone non ischémique *in vivo* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Gènes	Espèce	Séquence sens	Séquence anti-sens
<i>Gapdh</i>	Souris	GACAATGAATACGGCTACAGCA	GGCCTCTCTTGCTCAGTGTC
<i>Gusb</i>	Souris	CTCTGGTGGCCTTACCTGAT	CAGTTGTTGTCACCTTCACCTC
<i>Hprt</i>	Souris	TGATAGATCCATTCTATGACTGTAGA	AAGACATTCTTTCCAGTTAAAGTTGAG
<i>Il-1β</i>	Souris	TGTAATGAAAGACGGCACACC	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
<i>Il-6</i>	Souris	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA	GATGGATGCTACCAAAGTGA
<i>Nlrp3</i>	Souris	TTTGTACCCAAGGCTGCTATCT	GTCTCGGGGCTTAGGTCCAC
<i>Gusb</i>	Rat	CTCTGGTGGCCTTACCTGAT	CAGACTCAGGTGTTGTCATCG
<i>Il-18</i>	Rat	ACGGAGCATAAATGACCAAGTTC	TCTGGGATTTCGTTGGCTGTT
<i>Il-6</i>	Rat	GTATGTATGAACAGCGATGATG	CTCCAGGTAGAAACGGAAGTTC

Tableau 5 : Liste des amorces utilisés pour la PCR quantitative. *Gapdh* : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Gusb* : glucuronidase beta, *Hprt* : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, *Nlrp3* : NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, *Il-1 β* : Interleukine 1 β , *Il-18* : Interleukine 18, *Il-6* : Interleukine 6, *Tnf- α* : Tumor necrosis factor- α .

C. Dosage immunologique

1. Dosage de clusterine

Le dosage de CLU dans le sérum humain et murin est réalisé en utilisant des kits ELISA commercialisés respectivement human clusterin immunoassay et mouse clusterin immunoassay (R&D systems). Le principe de ces kits repose sur des plaques déjà coatées avec l'anticorps de capture, l'anticorps monoclonal anti-clusterin, sur lesquelles les échantillons dilués au 1/2000 ont été ajoutés. Après incubation de 2 heures à température ambiante, l'anticorps conjugué, l'anticorps polyclonal anti-clusterin couplé à la peroxydase, est ajouté. Après 2 heures d'incubation à température ambiante, le substrat TMB est ajouté. La réaction est enfin stoppée par l'ajout de solution stop et la plaque est lue à une longueur d'onde de 450 nm et 570 nm.

2. Dosage de nucléosomes

Le dosage de nucléosomes dans le sérum humain et murin ainsi que dans le milieu de culture cellulaire est réalisé en utilisant le kit cell death detection ELISA^{plus} (Roche Diagnostics). Le principe de ce kit repose sur l'ajout de la solution d'anticorps (anti-histone-biotine et anti-ADN couplé à la peroxydase) et 20 µl d'échantillons sur des plaques recouvertes de streptavidin. Après incubation de 2 heures à température ambiante, les plaques sont lavées 3 fois avec la solution de lavage avant d'ajouter le substrat. La réaction est ensuite stoppée et la plaque est lue à une longueur d'onde de 405 nm.

3. Dosage du complexe clusterine-histones

Le complexe CLU-histones est dosé qualitativement dans le plasma humain en utilisant la technique ELISA (*homemade*). Les plaques 96 puits (Nunc Maxisorp®) sont incubées pendant une nuit à 4°C avec l'anticorps de capture, l'anti-CLU (anti clusterine humain, MAB 29372, R&D systems) à 5µg/ml (100 µl/puit). Le lendemain, les puits sont saturés avec du PBS-BSA 5% pendant 2 heures à température ambiante. Après 2 heures, les échantillons dilués au ½ incubés avec de la solution anti (H3-H4) -HRP, préparée avec le diluant (PBS-BSA 1%, 0,05% tween 20) à la dilution finale 1/1000 (anti-histone-H3-HRP et anti-histone-H4-HRP, respectivement ab53528 et ab 197517, Abcam) ont été ajoutés dans les puits coatés avec l'anti-CLU (150 µl/puit) pour une incubation de 24 heures à température ambiante. Ensuite, les plaques sont lavées 3 fois avec la solution de lavage (PBS, 0,05 % tween 20) avant d'ajouter le 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB) comme révélateur de la réaction. La réaction est ensuite stoppée par l'ajout d'acide sulfurique H₂SO₄ et la plaque est lue à une longueur d'onde de 450 nm et 570 nm.

V. Analyses statistiques des résultats

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 8.0.1. Les niveaux de CLU, d'histones et de complexes CLU-histones ont été identifiés comme ne suivant pas une distribution normale. Par conséquent, ces variables ont été exprimées en valeurs médianes avec écart interquartiles (IQR) et des tests non paramétriques ont été utilisés pour la comparaison entre les groupes. Le test *Wilcoxon matched-pairs signed rank* a été utilisé pour comparer entre les différents temps chez les patients STEMI ou les souris et le test *Kruskal-Wallis* a été utilisé pour comparer les patients STEMI aux donneurs sains. Les différences entre deux groupes ont

été évaluées avec un test de *Mann-Whitney*. Lorsque la distribution normale a été vérifiée, les différences entre plusieurs groupes ont été évaluées avec un test d'*ANOVA* suivie d'un test *post-hoc*, le test de différence significative minimale (LSD) Fisher. Les résultats sont exprimés en valeurs moyenne \pm SEM (écart à la moyenne). Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative.

RESULTATS ET DISCUSSION

Introduction

Bien que la reperfusion soit le moyen le plus efficace connu pour sauver le myocarde ischémique et diminuer les lésions d'ischémie post-IDM, elle peut paradoxalement induire des lésions tissulaires irréversibles au sein du myocarde. Le stress induit par l'I/R entraîne la mort massive des cardiomyocytes, associée à la libération de signaux de danger, les DAMPs. Ces derniers sont responsables de l'initiation d'une réponse inflammatoire stérile qui occupe récemment une place centrale dans le développement des stratégies thérapeutiques cardioprotectrices. Parmi les DAMPs, les histones extracellulaires peuvent induire l'activation des récepteurs de l'immunité innée, comme les TLR2/TLR4, TLR9 et NLRP3, induisant des voies de signalisation inflammatoires et stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Allam et al., 2012, 2013; H. Huang et al., 2011; X. Yang et al., 2016). D'où la nécessité de développer une stratégie de cardioprotection capable de neutraliser les effets cytotoxiques et pro-inflammatoires des histones extracellulaires et d'inhiber l'activation de NLRP3, source majeure d'IL-1 β . De nombreux essais cliniques ont testé divers agents anti-inflammatoires dans le contexte de l'IDM aigu afin de limiter la réponse inflammatoire post-infarctus. Cependant, aucune de ces stratégies ne s'est avérée capable d'atténuer la réponse inflammatoire et de montrer un bénéfice significatif.

La CLU, également appelée apolipoprotéine J, est une protéine chaperonne extracellulaire qui se trouve d'une manière quasi-ubiquitaire dans les tissus et les fluides biologiques. Dans des conditions de stress cellulaire et de lésions tissulaires telles que l'IDM, les niveaux de CLU sont augmentés. Plusieurs études ont montré une augmentation de taux de CLU dans le cœur et le plasma à une stade précoce après un IDM (Traxler et al., 2020) ainsi que dans le ventricule gauche de patients souffrant d'insuffisance cardiaque, associée à un remodelage ventriculaire gauche (Turkieh et al., 2018). De plus, un effet protecteur de la CLU contre les lésions d'I/R myocardiques a été démontré chez le rat (Dijk et al., 2010). Cependant, les mécanismes moléculaires de la protection induite par la CLU n'ont pas été entièrement élucidés à ce jour. Il est intéressant de noter que les histones, qui s'accumulent à la surface des cellules apoptotiques tardives (Radic et al., 2004), ont été identifiées comme des éléments de liaison à la CLU (Cunin et al., 2016).

Dans ce travail, nous avons essayé en premier lieu de mettre en évidence le rôle protecteur de la CLU contre les lésions d'I/R myocardiques par différentes approches expérimentales, dans un modèle préclinique d'IDM chez la souris et un modèle d'H/R sur les cellules de la lignée H9C2 ainsi que dans une étude clinique portant sur des patients de la cohorte HIBISCUS-

STEMI. Ensuite, nous nous sommes intéressés aux potentiels mécanismes par lesquels la CLU pourrait protéger le cœur en testant l'hypothèse que la CLU, en tant que chaperonne extracellulaire, est capable de neutraliser les effets cytotoxiques et pro-inflammatoires des histones extracellulaires.

Résultats

Les résultats obtenus de cette étude sont présentés sous forme d'un article, qui sera soumis à *Basic Research in Cardiology*, intitulé :

Cardioprotective effects of the extracellular chaperon clusterin in myocardial infarction

Cardioprotective effects of the extracellular chaperon clusterin in acute myocardial infarction

Louwana Allawa^a, Antoine Poirier^{a,b}, Justine Beaumont^a, Lucie Lebeau^a, Agnès Barbelivien^a,
Pascale Pignon^c, Thomas Bochaton^d, Céline Beauvillain^{c,e}, Daniel Henrion^a, Yves Delneste^c,
Pascale Jeannin^{c,e}, Fabrice Prunier^{a,b*}, Sophie Tamareille^{a*}

^aLaboratoire MitoVasc, CNRS UMR 6015 INSERM U1083, Université d'Angers, Angers, France

^bService de Cardiologie, CHU Angers, Angers, France

^cCRCI²NA, INSERM U1307, CNRS 6075, Université d'Angers, Université de Nantes, LabEx IGO, Angers, France

^dService d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires & CIC de Lyons, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

^eLaboratoire d'Immunologie et Allergologie, CHU d'Angers, Angers, France

*both authors contributed equally to this work as last co-authors

Abstract

Acute myocardial infarction (AMI) remains one of the leading causes of mortality worldwide. Recently, a cardioprotective effect of clusterin (CLU), a highly ubiquitous extracellular chaperone, has been reported. However, the underlying mechanisms remain unresolved. We hypothesized that CLU exerts its protective effect on AMI by neutralizing cytotoxic and proinflammatory properties of extracellular histones, a new class of damage-associated molecular pattern (DAMPs), that are released after massive cell injury. *In vitro*, we showed that exogenous CLU reduces histone-induced cell death in H9C2 cells after hypoxia/reoxygenation. Moreover, we found increased CLU protein levels in the ischemic zone vs. non-ischemic zone after AMI in mice. Correspondingly, CLU-deficient ($Clu^{-/-}$) mice presented significantly increased infarct size vs. wild type ($Clu^{+/+}$) mice. This cardioprotective effect of CLU is accompanied by an attenuation of the post-AMI proinflammatory response, through a decrease in the expression of proinflammatory cytokines IL-6 and IL-1 β , a decrease in phosphorylated NF- κ B p65, as well as a decrease in the activation of the NLRP3 inflammasome. Also, we found that in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI), circulating CLU-histone complexes were significantly increased. From these results, CLU protects the heart from inflammatory injury in AMI and this cardioprotection is due at least in part to its ability to neutralize extracellular histones released from the damaged tissue.

Key words Myocardial infarction, clusterin, inflammation, cardioprotection, extracellular histones, clusterin-histone complexes

Abbreviations

AAR: Area at risk

AMI: Acute myocardial infarction

AN: Area of necrosis

CLU: Clusterin

DAMPs: Associated Molecular Patterns

HR: Hypoxia-reoxygenation

IR: Ischemia-reperfusion

LV: Left ventricle

MI: Myocardial Infarction

Introduction

Acute myocardial infarction (AMI) remains a leading cause of morbidity and mortality worldwide [18, 33]. While prompt reperfusion of the myocardium is essential to limit excessive cardiomyocyte death, it can itself induce myocardial damage, called reperfusion injury [14].

Inflammation is a hallmark of AMI and reperfusion injury [2]. AMI triggers an intense local and systemic inflammatory response, which leads to deterioration of cardiac function. There is increasing evidence that inflammation induced by myocardial ischaemia-reperfusion may contribute to cardiomyocyte death [24]. Thus, it is important to find new cardioprotective strategies to limit inflammation and ameliorate prognosis of AMI patients.

During AMI, the dying cells release endogenous danger molecules called damage-associated molecular pattern (DAMPs) [40]. DAMPs stimulate the innate immune response, generating severe inflammation which in turn exacerbates myocardial tissue damage leading to deterioration of cardiac function [16].

Among the DAMPs, extracellular histones have emerged as major mediators of tissue injury in a variety of disease including AMI [35]. When released in excess, histones are recognized as highly cytotoxic, detrimental molecules with potent inflammatory properties [36]. In addition to triggering the secretion of inflammatory cytokines, extracellular histones also induce cell death [1]. Based on these observations, extracellular histones may represent an anti-inflammatory therapeutic target of specific interest for treating AMI patients. Therefore, there is a crucial need for drugs that neutralize the damaging effects of extracellular histones.

Clusterin (CLU), also known as apolipoprotein J, is a highly conserved extracellular chaperone constitutively expressed in almost all mammalian tissues and secreted in a variety of biological fluids [47]. Depending on isoform, localization and cellular type, CLU is involved in multiple

physiological processes including cell differentiation, cell-cycle regulation, DNA repair, transcription, apoptosis, lipid transport, tissue remodelling and regulation of protein degradation [31, 42, 43]. In pathological conditions, it can exert anti-inflammatory, cytoprotective and anti-apoptotic effects [32]. Under conditions of cell stress and tissue injury, CLU levels are up-regulated [48]. Several studies have shown increased CLU levels in the heart and plasma at early stage after myocardial infarction [42], and also in left ventricle (LV) of heart failure patients, associated with left ventricular remodeling [44]. CLU has been shown to exert an antiapoptotic effect and to protect cardiac cells from ischemia-reperfusion (IR) after heart transplantation [29]. In animal studies, CLU has been shown to exert a protective effect against myocardial IR in rats [46]. Interestingly, it has also been associated with a reduction in pro-inflammatory signals [29]. Nevertheless, the molecular mechanism of CLU-induced cardioprotection has not been fully elucidated to date. As a chaperone, CLU has been shown to interact with and to stabilize a broad range of proteins, including extracellular histones released by dying cells, inducing their rapid clearance [8].

The aim of the present study was to investigate the role of CLU in myocardial IR injury by different experimental approaches including *in vivo* AMI in mice, *in vitro* hypoxia-reoxygenation (HR) in H9C2 cell line and in a cohort of STEMI patients. We sought to investigate the molecular mechanisms of CLU-induced cardioprotection. We evaluated the hypothesis that CLU, as a protein chaperone, is capable of neutralizing the cytotoxic effect of extracellular histones, thus attenuating myocardial damage.

Material and methods

In vitro H9C2 HR

We used the rat cardiomyoblasts cell line H9C2 as an *in vitro* HR model. Cells were cultured in a standard cell culture medium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) with high glucose (4.5 g/L), antibiotics (penicillin and streptomycin 1%) and 10% of Fetal Calf Serum (FCS).

Cells were seeded in 12-well plates. Hypoxia was induced by replacing the complete medium by a glucose- and serum-free isotonic solution (Tyrode's solution [mM]) (NaCl 130, KCl 5, Hepes 10, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.8, pH 7.4). The cells were placed into a hypoxia chamber (Adelbio; Clermont-Ferrand, France) for 6 hours at 37°C (Fig. 1A). Hypoxia was obtained by flushing a stream of gas composed of 95% N₂ and 5% CO₂ until oxygen rate reaches a value between 0.5 to 1%. Reoxygenation was achieved by replacing Tyrode's solution with the complete medium in a standard incubator under normoxic conditions for 2 hours.

Cells were subjected to HR in the absence or presence of 20 µg/ml recombinant human CLU [25] (R&D Systems, Minneapolis, MN) and 100 µg/ml calf thymus histones (Sigma Aldrich, Missouri, United States). Histone concentration was determined based on its toxicity on H9C2 (data not shown).

Cell death assessment

At the end of reoxygenation (i.e., 2 hours), the cells were detached from the plates using trypsin/EDTA. Cell death was quantified using a MACSQuant flow cytometer (Miltenyi Biotec, San Diego, CA) using 5 µg/ml propidium iodide (PI) (Sigma Aldrich, Missouri, United States). Cell death in the HR group was considered equal to one, and other data were expressed

as relative mortality compared to HR. A total of 10,000 events were acquired by fluorescence-activated cell sorting (FACS) for each sample.

Myocardial infarction model

All experimental procedures with animals conforms to the European Parliament Directive 2010/63/EU and were approved by the regional ethics committee “Comité d’Ethique en Experimentation Animale des Pays de la Loire” and by the French Ministry of Higher Education and Research. C57BL6/J, CLU-deficient ($Clu^{-/-}$) and wild type ($Clu^{+/+}$) mice were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (80 mg/kg, Ceva Santé Animale, France) and ventilated via endotracheal intubation on a rodent ventilator (Minivent type 845, Harvard Apparatus, Germany). Body temperature was maintained at a constant 37 °C using a homeothermic warming blanket (Harvard Apparatus, Germany). The mice received an injection of heparin (1,000 IU/kg, Heparine Choay1, Sanofi, Gentilly, France) prior to thoracotomy. Following skin incision, the chest was opened using a left lateral thoracotomy and the pericardium was removed. Coronary ligation was performed using a 7–0 prolene monofilament suture (Ethicon) placed around the left coronary artery 1.5mm under the tip of the left auricle and passed through a short piece of polyethylene tubing in order to create a reversible snare, as previously described [6, 21]. Coronary occlusion was initiated by clamping the snare onto the epicardial surface directly above the coronary artery. Ischemia was confirmed through observations of dyskinesia and epicardial cyanosis of the myocardial region below the suture. For myocardial infarct size, mice were undergoing 40min coronary artery occlusion followed by 24h reperfusion (Fig. 1B). For inflammatory markers evaluation mice underwent 3h reperfusion. After 40 min of coronary occlusion, reperfusion was achieved by loosening the snare and confirmed by a marked hyperemic response at the time of reperfusion. For sham group, animals underwent the same surgical procedure without coronary artery ligation.

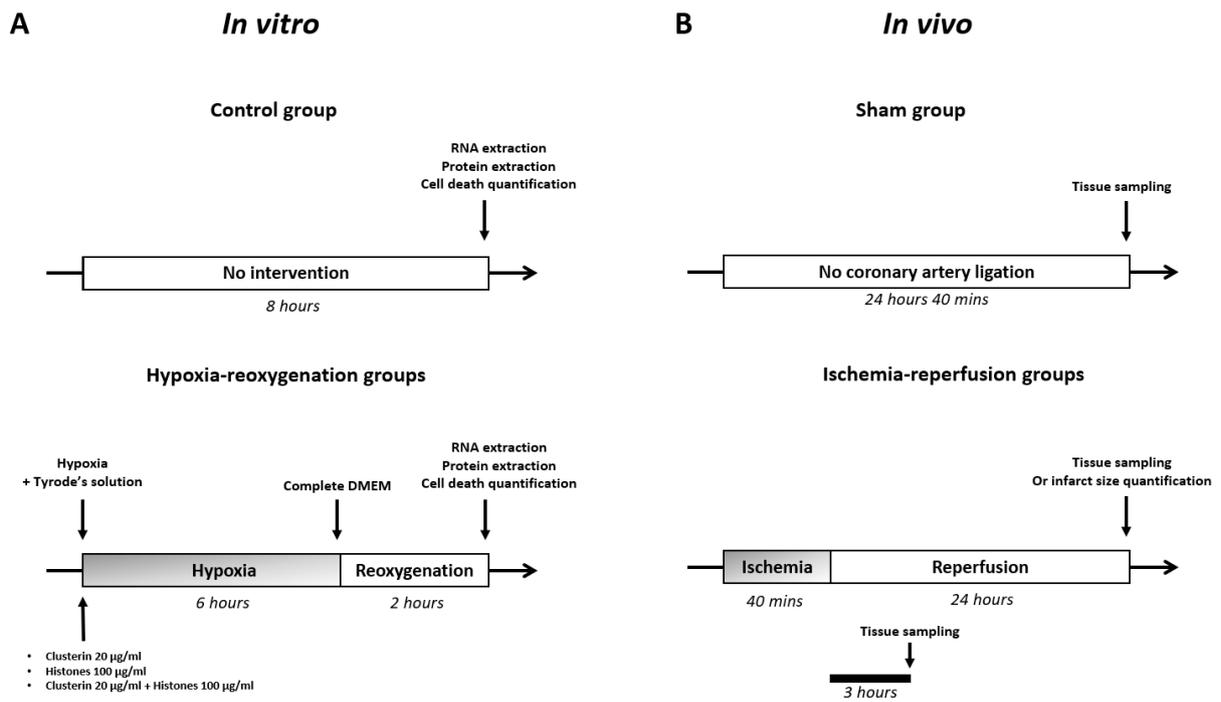


Fig. 1 *In vitro* and *in vivo* experimental design. **(A)** *In vitro*: H9C2 control cells underwent no intervention, cells from the HR groups were submitted to 6 hours of hypoxia followed by 2 hours of reoxygenation and were either treated with vehicle (PBS) or with CLU (20 µg/ml) or with histones (100 µg/ml) or with both during hypoxia. Cell death quantification, RNA as well as protein extraction was performed 2 hours after reoxygenation. **(B)** *In vivo*: Sham mice underwent no coronary artery ligation. Mice from the IR groups were subjected to 40 min coronary occlusion followed by 24 hours reperfusion for infarct size assessment and tissue sampling was performed after either 3 hours or 24 hours.

Infarct size assessment

At the end of the 24-hour reperfusion period, coronary ligation was repeated using the monofilament suture kept in place, and 400µl of Evans Blue 4% (Sigma Aldrich, Missouri, United States) were injected through the left-ventricular apex, coloring the perfused (non-ischemic) myocardium blue while the area at risk (AAR) remained unstained. The area-at-risk (AAR) was then identified as the non-blue myocardium area and expressed as a percentage of LV area. The LV was cut into six to seven equal slices and incubated with 1% 2,3,5-

triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma Aldrich, Missouri, United States) pH 7.4 at 37 °C for 4 min to distinguish non-viable (pale) from viable (red) myocardium. The slices were subsequently fixed in 10% formalin, thereby delimiting the viable myocardium in red and area of necrosis (AN) in pale white. Quantification of infarct size (planimetry) was performed blindly using ImageJ 1.47 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Infarct size was expressed as a percentage of the area at risk (AN/AAR) and AAR as a percentage of total ventricular area (AAR%LV).

Analysis of CLU, nucleosomes and CLU-histone complexes

Human and mouse serum CLU were quantified using commercial ELISA (R&D Systems). Serum and cell culture medium levels of nucleosomes were determined using the Cell Death Detection ELISA^{PLUS} assay (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Complexes formed by the interaction of CLU with histones H3 and H4 were evaluated in human plasma using a homemade immunoassay using an anti-human CLU mAb as capture Ab (R&D Systems) and HRP-conjugated anti-H3 and anti-H4 pAbs as detection Abs (Abcam, Cambridge, UK). Briefly, 96-wells plates (MaxiSorp[®]; Nunc, Roskilde, Denmark) were either uncoated or coated (overnight at 4°C) with 5 µg/ml anti-CLU mAb (100 µL/well; R&D Systems). After saturation with 5% BSA for 2h, plates were incubated for 24 h at room temperature with plasma (150 µl/well) diluted 1:2 in anti-(H3-H4)-HRP solution, prepared with diluent (PBS containing 1% (w/v) BSA and 0.05% (v/v) Tween 20) at final dilution 1/1000. After washing, bound Abs were detected using the chromogenic substrate 3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine (TMB). Results are expressed as OD values (after subtraction of the OD value obtained with uncoated wells).

Western blot analysis

Western blots were performed on total protein extracts from either freeze-clamped LV myocardium or cell lysates (H9C2 cell line) as previously described [41]. Briefly, 15µg-75µg

of total proteins were separated on a 10-15% SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience). After the nonspecific binding sites were blocked with 5% nonfat milk for 1 h in Tris-buffered saline Tween (TBST), the membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit antibodies against CLU (1/1000, R&D Systems), phosphorylated (p-)p65 (1/1000, Cell Signaling Technology), p65 (1/1000, Cell Signaling Technology). GAPDH (1/10000, Sigma Aldrich, Missouri, United States) was used as a loading control. After being washed in TBST, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with appropriate (rabbit or mouse) horseradish peroxidase-conjugated appropriate (rabbit or mouse) secondary antibodies (1/5000, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, United States). The bound antibody was detected using an enhanced chemiluminescence Western blotting kit (Santa Cruz Biotechnologies). The band densities with appropriated molecular mass (80 kDa for CLU, 65 kDa for p65) were determined semi-quantitatively using Chemidoc imaging system (Biorad, California, United States).

RT-qPCR

We quantified the expression of IL-6, NLRP3, IL-1 β , and IL-18 in H9C2 or LV. Genes encoding hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh) and glucuronidase beta (gusb) were employed as a reference. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions. The cDNA was synthesized using the Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. In a total volume of 20 μ l reaction system (10ng of cDNA), SYBRTMSelect Master Mix (Applied Biosystems, California, United States) was applied to perform qPCR using a Lightcycler[®]480 II Thermocycler (Roche, Switzerland). The thermal cycling conditions were as follows: 95°C for 3 min, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 60 °C for 1 min. The relative expression of target genes was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, normalized to the reference genes, and

then compared with the control group *in vitro* or the non-ischemic zone *in vivo*. Primer sequences are presented in Table 1.

Table 1 Forward and reverse primer sequences for target and reference genes.

Genes	Species	Forward sequence	Reverse sequence
Gapdh	Mice	GACAATGAATACGGCTACAGCA	GGCCTCTCTTGCTCAGTGTC
Gusb	Mice	CTCTGGTGGCCTTACCTGAT	CAGTTGTTGTCACCTCACCTC
Hprt	Mice	TGATAGATCCATTCCTATGACTGTAG A	AAGACATTCTTCCAGTTAAAGTTGA G
Il-1β	Mice	TGTAATGAAAGACGGCACACC	TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG
Il-6	Mice	CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA	GATGGATGCTACCAAAGTGA
Nlrp3	Mice	TTTGTACCCAAGGCTGCTATCT	GTCTCGGGGCTTAGGTCCAC
Gusb	Rat	CTCTGGTGGCCTTACCTGAT	CAGACTCAGGTGTTGTCATCG
Il-18	Rat	ACGGAGCATAAATGACCAAGTTC	TCTGGGATTCGTTGGCTGTT
Il-6	Rat	GTATGTATGAACAGCGATGATG	CTCCAGGTAGAAACGGAACTC

Clinical study

The HIBISCUS-STEMI (coHort of patients to Identify Biological and Imaging markerS of CardiovascUlar outcomes in ST elevation myocardial infarction) is a multicentric cohort composed of patients admitted for an acute STEMI. The trial design and protocol have been registered ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02823886. All patients gave written informed consent and the study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. STEMI was defined according to the European Society of Cardiology guidelines by the presence of clinical symptoms (chest pain) associated with an ST-segment elevation of more than 2mm in two contiguous leads on a standard 12-lead electrocardiogram, and significant troponin-I elevation. Urgent reperfusion was achieved in all patients by primary percutaneous

intervention (PCI) at admission. Blood from HIBISCUS patient cohort were collected at five time-points: admission (H0), 4 h (H4), 24 h (H24), 48 h (H48), and 1 month (M1) after reperfusion. Plasma or serum samples were frozen at -80°C and stored at the local hospital biobank (NeuroBioTec Biological Resource Center, Hospices Civils de Lyon).

Serums and plasmas from healthy donors were from the blood collection center (EFS Pays de la Loire, Angers, France, agreement ANG-2003-2).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8.0.1. Levels of CLU, histones and CLU-histone complexes were identified as not normally distributed. Therefore, those variables were expressed as medians, and interquartile range (IQR) and non-parametric tests were used for comparison between groups. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was used to compare at different points of STEMI patients or mice and Kruskal-Wallis test was used to compare each time of STEMI patients to healthy donors. Differences between two groups were evaluated using the Mann–Whitney U test. When the normal distribution is verified, one-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Fisher's least significant difference (LSD) was performed for multiple group comparisons. Data are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). A p-value <0.05 was considered significant.

Results

Exogenous CLU reduces histone-induced cell death during HR in vitro.

Extracellular histones have been shown to be cytotoxic and to induce cell death [50]. We thus investigated whether CLU could protect cardiomyocytes from histone-induced cell death. Fig. 2A shows that free histones derived from calf thymus, which contain a range of histones including histone H4 and H3, added in culture medium are significantly toxic to cultured H9C2 cells, a rat cardiomyoblasts cell line. Histones dose-dependently induced cell death in H9C2, as measured by IP staining in flow cytometry. We determined histone concentration which led to 50% of cell death (lethal concentration 50, LC50= 275 µg/mL). The cytotoxicity of 275 µg/ml histones (LC50) to H9C2 cells was reduced when CLU was added to 100 µg/ml in culture medium ($36.71 \pm 3.53\%$ vs. $46.43 \pm 3.07\%$, $p=0.0565$) (Fig. 2B). These data indicate that CLU can protect cardiomyocytes from extracellular histone-induced cell death.

Thus, we evaluated, in an experimental model of HR in H9C2, histones release in the culture medium. After 6 hours hypoxia followed by 2 hours reoxygenation, we observed a significant release of nucleosomes in the culture medium, as a reflect of extracellular histones release (Fig. 2C). We next examined HR-induced mortality in H9C2. Relative mortality was significantly increased in HR group compared to control group ($p=0.0008$). We next investigated whether exogenous CLU was able to prevent HR-induced cell death in H9C2. Fig. 2D shows that HR-induced cell death was significantly inhibited by 20 µg/mL CLU added in the culture medium during hypoxia (0.67 ± 0.04 vs. HR group, $p=0.0334$). Thus, exogenous CLU protects H9C2 cells from HR. Exogenous histones added to the culture medium during HR could potentiate HR-induced cell mortality (1.48 ± 0.18 vs. HR group, $p=0.0035$). Interestingly, histones and HR act in concert to induce cell mortality. CLU also significantly reduced HR-induced cell death in the presence of exogenous histones added to the culture medium during HR (0.98 ± 0.10 vs.

1.48±1.18, p=0.0025). This set of experiments confirmed that CLU is able to suppress the cytotoxic properties of extracellular histones in an HR cellular model.

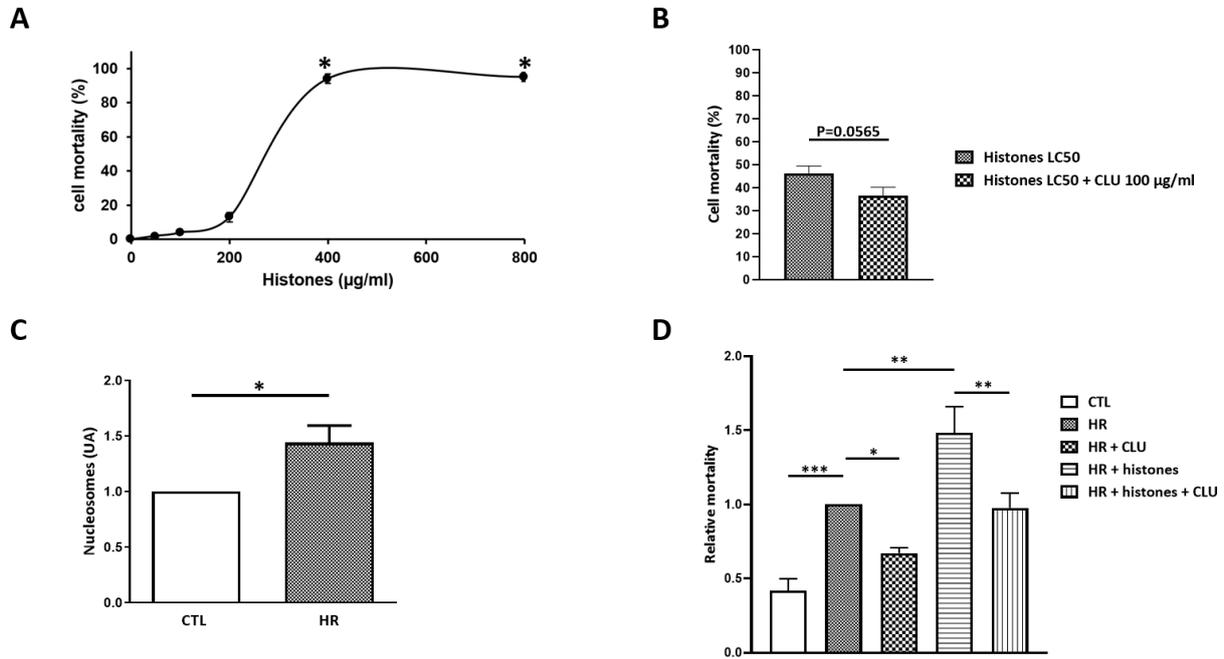


Fig. 2 (A) The toxic effects of different histone concentrations on H9C2 cells (n=3 individual experiments). Values are expressed as mean±SEM. *p < 0.05 vs. untreated cells. (B) CLU (100 µg/ml) in protecting H9C2 cells treated with 275 µg/ml histones (LC50) (n=7 individual experiments). Values are expressed as mean±SEM. (C) Measurement of levels of nucleosomes in the culture supernatants of H9C2 control cells and HR cells (n=8 individual experiments). Values are expressed as mean±SEM. *p < 0.05 versus CTL. (D) Quantification of cell death in control (CTL), HR, HR + CLU, HR + histones and HR + histones + CLU groups (n=4 individual experiments). Values are expressed as mean±SEM. *p < 0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

Exogenous CLU reduces HR-induced pro-inflammatory cytokine expression.

HR has been shown to induce the production of inflammatory cytokines [15]. We then evaluated the capacity of CLU to modulate the production of IL-6 in H9C2 cells subjected to 6 hours hypoxia followed by 2 hours reperfusion. IL-6 and IL-18 mRNA expression was

significantly increased after HR (Fig 3A, 3B). CLU significantly reduced HR-induced IL-6 and IL-18 mRNA levels. Levels of phosphorylated NF-κB p65, a potent transcription factor of IL-6, was also significantly increased after HR and was reduced in the presence of CLU, although it did not reach significance (Fig 3C). Collectively, these above results indicate that CLU can inhibit the inflammatory effects of HR *in vitro*.

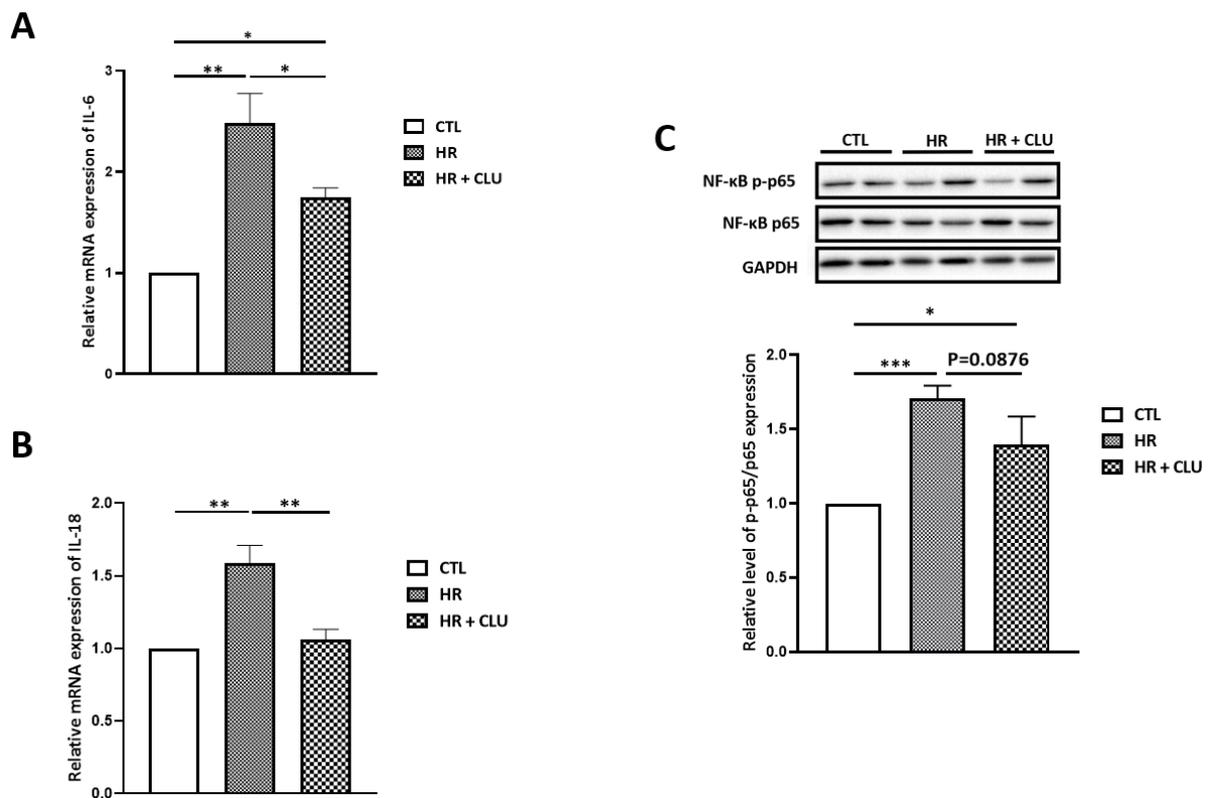


Fig. 3 Inflammatory markers mRNA and protein expression, respectively by means of RT-qPCR and western blot. IL-6 (A), IL-18 (B) mRNA expression in control (CTL), HR and HR + CLU sample cells (n=3). (B) Representative immunoblots and histogram quantification of protein expression for NF-κB p-p65 and NF-κB p65 in CTL, HR and HR +CLU groups (n=3). Values are expressed as mean±SEM. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001.

CLU levels are increased following myocardial IR in mice.

We first evaluated circulating CLU levels in serum of C57BL6/J mice subjected to 40min coronary artery ligation followed by 24-h reperfusion. CLU levels were significantly increased at 24H post-AMI compared to baseline (80.80 $\mu\text{g/ml}$ IQR [68.96–92.91] vs. 48.83 $\mu\text{g/ml}$ IQR [40.77–52.42], $p=0.002$) (Fig 4A).

We next measured CLU protein levels in LV myocardial tissue from sham mice and mice subjected to 40-min myocardial ischemia followed by 24-h reperfusion. CLU was significantly increased in ischemic zone compared to non-ischemic zone (5.28 ± 2.19 vs. 2.15 ± 0.72 , $p=0.0244$) (Fig 4B).

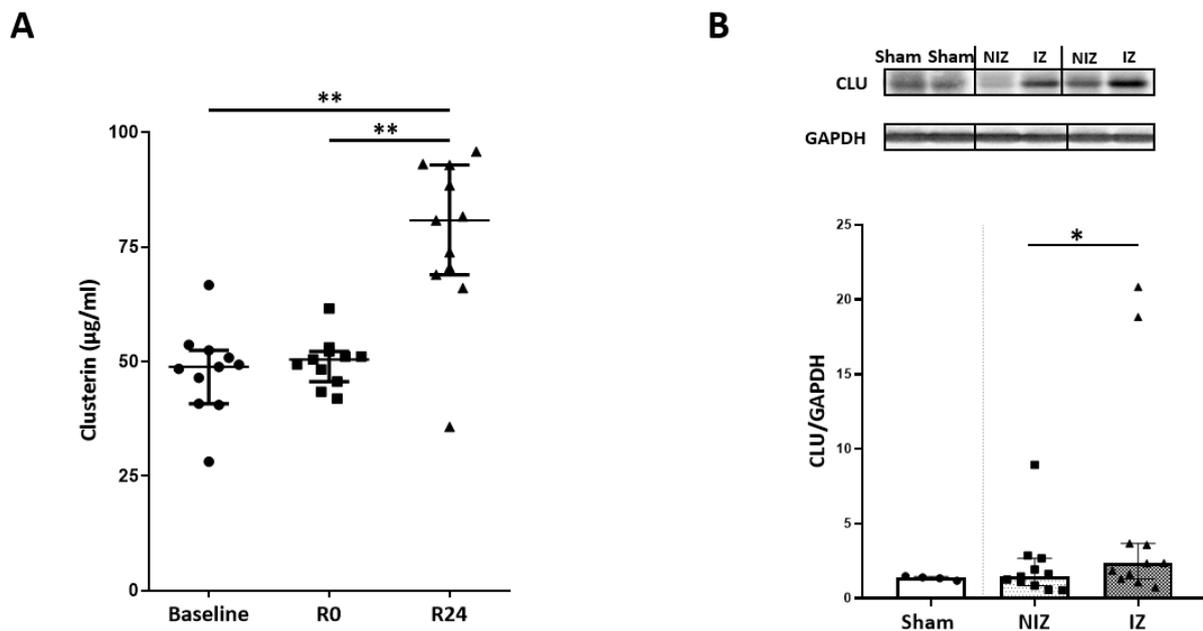


Fig. 4 (A) Circulating levels of CLU were quantified in mice at baseline (before ischemia), R0 (at the time of reperfusion) and R24 (24 hours after reperfusion) (n=11). (B) Representative immunoblots and histogram quantification of protein expression for CLU in LV myocardial tissue from sham group (n=4) and in ischemic zone (IZ) and non-ischemic zone (NIZ) after 24 hours of reperfusion (n=11). GAPDH was used as loading control. Values are expressed as median IQR (25–75 percentiles). * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Clu^{-/-} mice are more susceptible to myocardial IR in vivo.

We next evaluated the protective role of CLU in an experimental mouse model of AMI. $Clu^{-/-}$ mice were more susceptible to acute myocardial infarction than $Clu^{+/+}$ mice (Fig 5A). Infarct size was significantly higher in $Clu^{-/-}$ compared to $Clu^{+/+}$ mice ($46.29 \pm 5.13\%$ vs. $27.47 \pm 1.92\%$, $p=0.0176$), whereas area at risk did not significantly differ between the two groups ($43.94 \pm 2.15\%$ vs. $46.32 \pm 3.2\%$, $p=0.670$) (Fig 5B). Of note, the percentage of mortality induced by the AMI experimental model was significantly higher in $Clu^{-/-}$ compared to $Clu^{+/+}$ mice (data not shown), further highlighting the protective role of CLU during AMI.

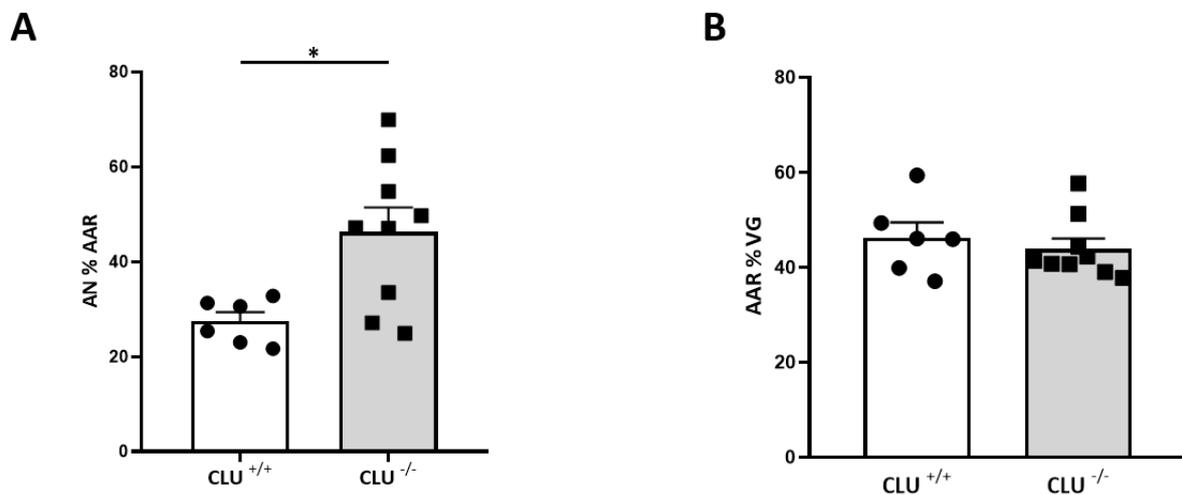


Fig. 5 Scatter dot blot showing (A) area of necrosis (AN) as a percentage of area at risk (AAR), and (B) AAR as a percentage of total LV area after 24 hours of reperfusion (n=6-9); Values are expressed as mean \pm SEM. * $p<0.05$.

Pro-inflammatory cytokines and NLRP3 inflammasome are upregulated in $Clu^{-/-}$ mice subjected to myocardial IR

To investigate whether inflammation was upregulated in ischemic LV $Clu^{-/-}$ mice. Mice were subjected to 40 min ischemia and 3h reperfusion, and NLRP3, IL-1 β , and IL-6 mRNA levels were evaluated at 3-h reperfusion duration. IL-6 mRNA expression was significantly increased in $Clu^{-/-}$ mice compared to $Clu^{+/+}$ mice (Fig 6A). $Clu^{-/-}$ mice also showed increased levels of phosphorylated NF- κ B p65 compared to $Clu^{+/+}$ mice (Fig 6B). Moreover, the ischemic hearts

of $Clu^{-/-}$ exhibited enhanced inflammasome activation as evidenced by increased NLRP3 and IL-1 β expression compared to $Clu^{+/+}$ mice (Fig. 6 C and D).

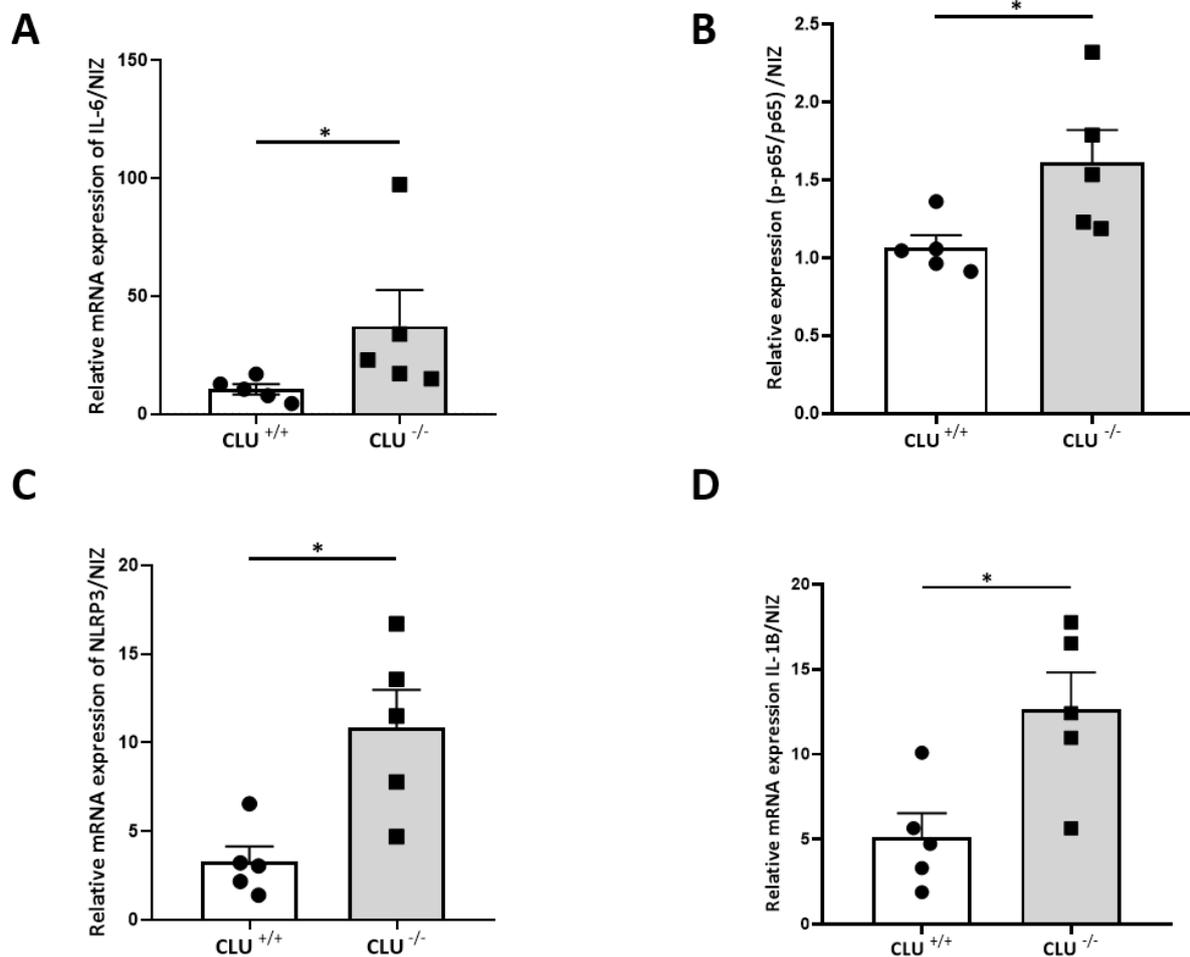


Fig. 6 Inflammatory markers mRNA and protein expression, respectively by means of RT-qPCR and western blot. IL-6 (A), IL-1 β (B) and NLRP3 (C) mRNA expression in $Clu^{+/+}$ and $Clu^{-/-}$ mice left ventricle samples after 3 hours of reperfusion (n=5). (D) Histogram quantification of protein expression for p-p65, p65 in $Clu^{+/+}$ and $Clu^{-/-}$ mice left ventricle samples after 3 hours of reperfusion (n=5). Values are expressed as mean \pm SEM. * p<0.05.

Levels of CLU, histones and CLU-histone complexes in AMI patients

In order to evaluate the implication of CLU in the context of AMI in human STEMI patients, we first quantified serum CLU levels in a large cohort of 36-40 STEMI patients with acute coronary syndrome at five time-points: admission (H0), and 4 h (H4), 24 h (H24), 48 h (H48),

and 1 month (M1) after revascularization (Fig 7A). After coronary angioplasty, serum CLU levels of STEMI patients (acute coronary syndrome with ST- segment elevation) were significantly lower compared to healthy donors, at H0, H4, H24 and H48 after revascularization (323.9 $\mu\text{g/ml}$ IQR [290.6–380.8]; 213.1 $\mu\text{g/ml}$ IQR [178.7–269.3]; 220.8 $\mu\text{g/ml}$ IQR [191.5–258.9]; 227.2 $\mu\text{g/ml}$ IQR [181.3–257.4]; 215.6 $\mu\text{g/ml}$ IQR [177.8–256.7]; vs. 346.0 $\mu\text{g/ml}$ IQR [315.4–401.6], $p < 0.0001$). Interestingly, one-month post-AMI, circulating CLU levels were significantly increased compared to early stage of AMI, reaching the levels of healthy subjects. We then evaluated levels of circulating histones in AMI patients (Fig. 7B). The levels of nucleosomes released by dying cells reflect the severity of tissue injury [38], especially during AMI [35], and can be used as a biomarker to monitor the levels of circulating histones. Serum nucleosomes levels were significantly increased in the STEMI patients at H4, H24 and H48 compared to healthy subjects (arbitrary unit (AU)= 1.63 IQR [0.57–2.53]; 2.10 IQR [1.20–3.70]; 2.90 IQR [1.26–6.24]; vs. 0.68 IQR [0.26–1.07], $p = 0.0227$, $p = 0.0004$ and $p < 0.0001$ respectively). Nucleosome levels were significantly decreased 1 month after reperfusion compared to H48 (arbitrary unit (AU)= 2.30 IQR [1.02–4.53] vs. 2.90 IQR [1.26–6.24], $p = 0.0491$)

In order to analyse the ability of CLU to interact with histones in AMI patients, we evaluated the presence of CLU-histone complexes in the plasma of STEMI patients and healthy control subjects, using a home-made ELISA which detects H3 and H4 bound to CLU (Fig. 7C). The levels of CLU-histone complexes were significantly increased in STEMI patients compared to healthy subjects (OD values = 0.15 IQR [0.06–0.38]; 0.15 IQR [0.08–0.42]; 0.14 IQR [0.06–0.36]; 0.13 IQR [0.06–0.45]; 0.16 IQR [0.06–0.43] vs. 0.03 IQR [0.00–0.12] respectively; $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p = 0.0002$, $p = 0.0002$ and $p < 0.0001$ respectively). Interestingly, the levels of CLU-(H3-H4) complexes parallel circulating nucleosomes levels up to 48h.

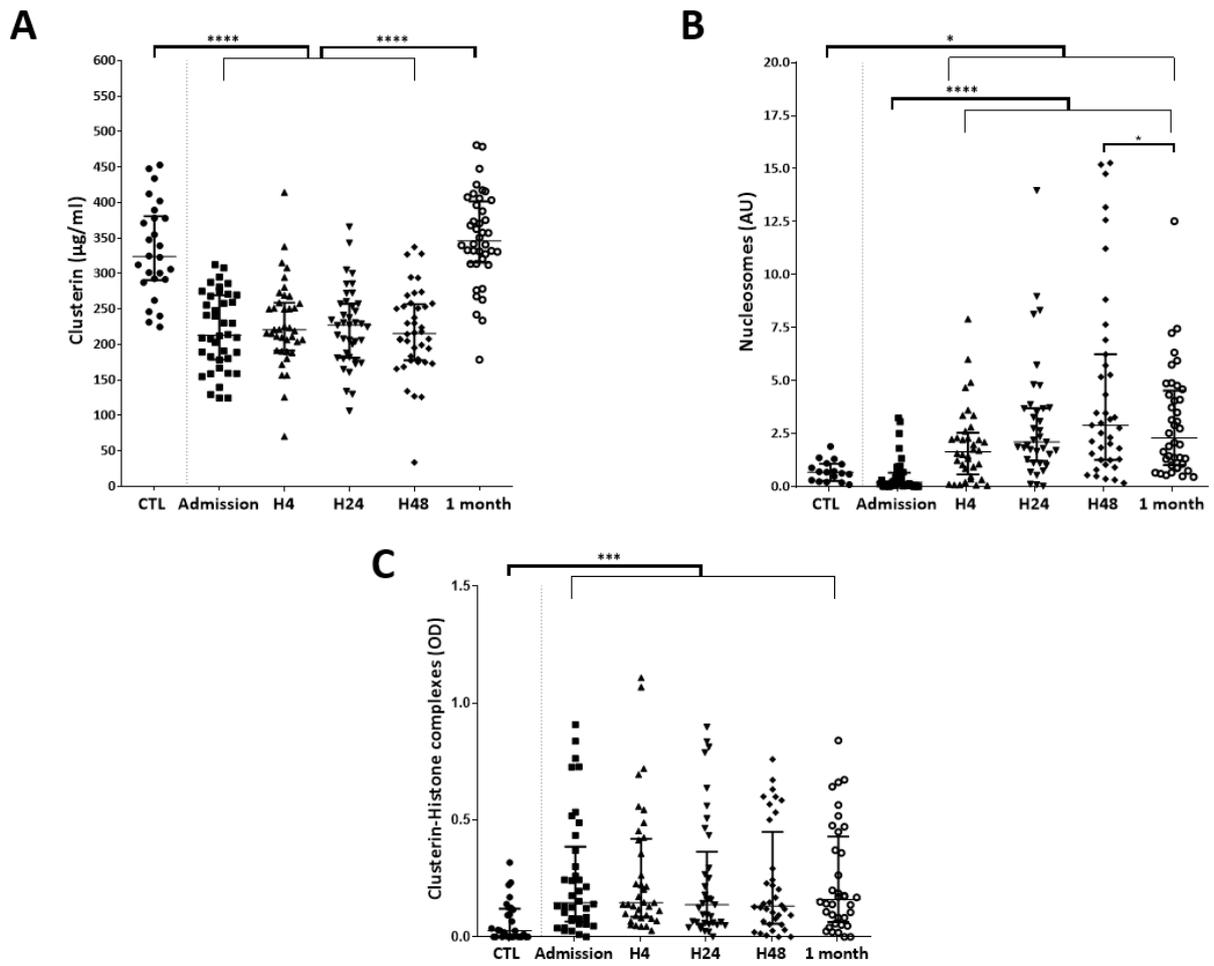


Fig. 7 Measurement of circulating levels of CLU (A), nucleosomes (B) and CLU-histones complexes (C) in STEMI patients at different time points after coronary angioplasty (n=36-40) and healthy subjects (CTL) (n=17-29). Values are expressed as median IQR (25–75 percentiles). * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001; **** p<0.0001.

Discussion

In the present study, we sought to examine the cardioprotective role of the extracellular chaperone CLU in AMI and to explore the underlying cellular and molecular mechanisms. Using an *in vitro* model of HR, we showed that exogenous CLU is able to suppress the cytotoxic and pro-inflammatory properties of extracellular histones in H9C2 cardiac cells. Moreover, we observed that *Clu*^{-/-} mice are more susceptible to myocardial IR injuries *in vivo*. In patients, we showed that CLU levels decrease after AMI, which is associated with circulating histones and CLU-histone complexes increase. Our results suggests that CLU is likely to neutralize extracellular histones released by dying cells during AMI, therefore preventing histone-induced myocardial damage.

Extracellular histones released by dying cells have emerged as major DAMPs in several diseases including sepsis [28], ischemic stroke [9] and AMI [35]. Circulating extracellular histones have been implicated in multiple organ injury pathogenesis [23]. Myocardial IR has been shown to cause an increase in circulating nucleosomes, which correlated with infarct size [34]. Interestingly, released nucleosomes likely originate from Netosis [22]. Recent evidence suggest that extracellular histones trigger sterile inflammation and exert potent cytotoxic effects in cardiomyocytes *in vitro* [11, 35]. Histones are known to stimulate TLR2/TLR4, TLR9 and NLRP3 [3, 4, 17, 51]. Considering the critical role of inflammation in response to cardiac injury, their neutralization appears as an interesting therapeutic strategy in AMI.

Several studies have reported the value of neutralizing extracellular histones in various pathological conditions [26, 30, 37]. Negatively-charged agents, including heparin, albumin, pentraxin 3 (PTX3), and C-reactive protein (CRP), which can bind histones through a charge interaction to neutralize their positive charge have been shown to attenuate histone cytotoxicity [23].

CLU is an ubiquitous, multifunctional secreted glycoprotein that is present in almost all tissues and biological fluids [47, 48]. It plays numerous and contrary roles in a number of physiological and pathophysiological situations, which makes it an enigmatic protein. The secreted form of CLU is increased in response to a wide variety of stress conditions, including IR injury. In brain IR injury, CLU has been identified as a potential biomarker in patients undergoing carotid endarterectomy [19]. In AMI, both an increase and decrease of plasma CLU levels have been reported, depending on the stage of MI. Several studies have shown increased circulating CLU levels at the early stage of AMI [12, 43, 45]. On the contrary, some studies found lower CLU levels in AMI patients immediately after the event than in healthy subject [7]. Elevated plasma CLU levels have also been reported in plasma of patients at late stage after MI and were associated with left ventricular remodeling [44]. In a preclinical porcine model of reperfused AMI, plasma CLU levels have been shown to be increased 120 min after the onset of AMI and returned to normal levels after 3 days [42]. Here, in STEMI patients, we found decreased circulating levels of CLU that returned to normal until 1 month. Those reduced levels were associated with a parallel increase in circulating histones. Thus, the decrease of CLU plasma levels seen in our study in STEMI patients might be due to its binding to cytotoxic histones released in the plasma by dead myocardial cells. Histones would be subsequently removed from circulation as CLU-histones complexes. Cubedo et al related the alterations in ApoJ proteomic profile in AMI patients to a differential glycosylation pattern [7]. In our work, we noticed a higher mortality rate in $Clu^{-/-}$ mice compared to $Clu^{+/+}$ following AMI, suggesting that the capacity of CLU to neutralize histones was overwhelmed, leaving histones available to exert their cytotoxicity.

We showed that CLU heart tissue levels were upregulated in the ischemic area of infarcted mice. Interestingly, CLU plasma levels were also higher in mice 24-hours after reperfusion. Our results are in accordance with earlier studies showing higher CLU expression in the infarct

and border zone tissue after AMI [12, 39, 45]. The origin of this cardiac expression remains to be elucidated. It could result from a local synthesis of CLU by cardiomyocytes in response to ischemia (tissue injury). Indeed, Krijnen *et al* showed that CLU was rapidly expressed in response to ischemia in H9C2 cells [25]. Alternatively, Väkevä *et al.* suggested that CLU could originate from circulation following reperfusion. They observed CLU deposits in infarcted regions of human myocardium [45]. The authors suggest a likely selective accumulation due to diffusion from plasma in infarcted lesions.

Multiple lines of evidence suggest that CLU exerts cytoprotective effects [48]. However, the mechanism whereby CLU protects injured cardiomyocytes is not yet clear. CLU cytoprotective properties have been earlier related with anti-apoptotic and anti-inflammatory processes [32]. Following cardiac transplantation, CLU reduces the expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α through inhibition of the NF- κ B signaling pathway, reducing apoptosis and IR injury [10, 29]. CLU has also been shown to protect cardiomyocytes against H₂O₂-induced oxidative stress through activation of Akt/ GSK-3 β signaling pathway [20]. In infarcted human heart, CLU was found to colocalize with complement on jeopardized human cardiomyocytes after AMI [45]. CLU was also found to protect cardiomyocytes against ischemic cell death via a complement-independent pathway [25].

Besides its role in activating survival signalling pathways, CLU is thought to function as an extracellular chaperone which binds (interact) to a wide variety of ligands, including misfolded or damaged proteins, toxic molecules, components of the complement membrane attack complex, or lipids [47]. It was also suggested that CLU binds to cellular debris and thereby protects cells from debris-inflicted damage [5]. However, little is known about how CLU exerts its potent chaperone action to stabilize stressed proteins. CLU forms stable, soluble high-molecular-weight complexes with misfolded client proteins [49]. CLU would interact with

hydrophobic domains present in histones [8] through amphipathic alpha helices with higher hydrophobic moments [13]. The question remains unresolved as to whether CLU acts both intracellularly and extracellularly to protect cells from myocardial IR injury.

Here we show, for the first time, that $Clu^{-/-}$ mice are more susceptible to myocardial IR than $Clu^{+/+}$ mice. This cardioprotective effect is accompanied by a decrease in local pro-inflammatory response at the early phase of reperfusion. Our data indicate that a loss of CLU expression results in an increase in inflammation and aggravate mice susceptibility to IR injury. We also showed an increase in the pro-inflammatory cytokine IL-1 β in the ischemic area of $Clu^{-/-}$ mice at the early phase of reperfusion. This reflects the activation of the NLRP3 inflammasome and its involvement in the installation of IR injury in $Clu^{-/-}$ mice. Similarly, a recent study showed that overexpression of CLU attenuates cholesterol crystal-induced inflammation through inhibition of the NLRP3 inflammasome pathway while preventing excretion of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-18 [27]. The protective effect of exogenous CLU administered *in vivo* in rats after acute myocardial infarction was shown to be protective, independently of its receptor megalin [46]. Taken together, our data indicate a cardioprotective role of CLU in the context of AMI, through neutralisation of extracellular histones released from injured cells.

Acknowledgements

The authors would like to thank the animal facility (Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire) for taking care of the animals, and the cytometry and molecular biology facility (Plateforme d'Analyse Cellulaire et Moléculaire) for technical assistance.

References

1. Abrams ST, Zhang N, Dart C, Wang SS, Thachil J, Guan Y, Wang G, Toh C-H (2013) Human CRP Defends against the Toxicity of Circulating Histones. *J Immunol* 191:2495–2502. doi: 10.4049/jimmunol.1203181
2. Algoet M, Janssens S, Himmelreich U, Gsell W, Pusovnik M, Van den Eynde J, Oosterlinck W (2022) Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation. *Trends Cardiovasc Med* S1050-1738(22)00029–9. doi: 10.1016/j.tcm.2022.02.005
3. Allam R, Darisipudi MN, Tschopp J, Anders H-J (2013) Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome. *Eur J Immunol* 43:3336–3342. doi: 10.1002/eji.201243224
4. Allam R, Scherbaum CR, Darisipudi MN, Mulay SR, Hägele H, Lichtnekert J, Hagemann JH, Rupanagudi KV, Ryu M, Schwarzenberger C, Hohenstein B, Hugo C, Uhl B, Reichel CA, Krombach F, Monestier M, Liapis H, Moreth K, Schaefer L, Anders H-J (2012) Histones from Dying Renal Cells Aggravate Kidney Injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol JASN* 23:1375–1388. doi: 10.1681/ASN.2011111077
5. Bartl MM, Luckenbach T, Bergner O, Ullrich O, Koch-Brandt C (2001) Multiple receptors mediate apoJ-dependent clearance of cellular debris into nonprofessional phagocytes. *Exp Cell Res* 271:130–141. doi: 10.1006/excr.2001.5358
6. Bouche L, Kamel R, Tamareille S, Garcia G, Villedieu C, Pillot B, Gueguen N, Chehaitly A, Chao de la Barca JM, Beaumont J, Baetz D, Ovize M, Sesaki H, Henrion D, Reynier P, Lenaers G, Prunier F, Mirebeau-Prunier D (2021) DRP1 haploinsufficiency

attenuates cardiac ischemia/reperfusion injuries. PLoS ONE 16:e0248554. doi: 10.1371/journal.pone.0248554

7. Cubedo J, Padró T, García-Moll X, Pintó X, Cinca J, Badimon L (2011) Proteomic signature of Apolipoprotein J in the early phase of new-onset myocardial infarction. *J Proteome Res* 10:211–220. doi: 10.1021/pr100805h

8. Cunin P, Beauvillain C, Miot C, Augusto J-F, Preisser L, Blanchard S, Pignon P, Scotet M, Garo E, Fremaux I, Chevailler A, Subra J-F, Blanco P, Wilson MR, Jeannin P, Delneste Y (2016) Clusterin facilitates apoptotic cell clearance and prevents apoptotic cell-induced autoimmune responses. *Cell Death Dis* 7:e2215. doi: 10.1038/cddis.2016.113

9. De Meyer SF, Suidan GL, Fuchs TA, Monestier M, Wagner DD (2012) Extracellular chromatin is an important mediator of ischemic stroke in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1884–1891. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.250993

10. Du J, Liu L, Yu B, Hao F, Liu G, Jing H, Xu H (2018) Clusterin (apolipoprotein J) facilitates NF- κ B and Bax degradation and prevents I/R injury in heart transplantation. *Int J Clin Exp Pathol* 11:1186–1196

11. Fattahi F, Russell MW, Malan EA, Parlett M, Abe E, Zetoune FS, Ward PA (2018) Harmful Roles of TLR3 and TLR9 in Cardiac Dysfunction Developing during Polymicrobial Sepsis. *BioMed Res Int* 2018:4302726. doi: 10.1155/2018/4302726

12. Foglio E, Puddighinu G, Fasanaro P, D’Arcangelo D, Perrone GA, Mocini D, Campanella C, Coppola L, Logozzi M, Azzarito T, Marzoli F, Fais S, Pieroni L, Marzano V, Germani A, Capogrossi MC, Russo MA, Limana F (2015) Exosomal clusterin, identified in the pericardial fluid, improves myocardial performance following MI through epicardial activation,

enhanced arteriogenesis and reduced apoptosis. *Int J Cardiol* 197:333–347. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.06.008

13. Fritz IB, Burdzy K, Sétchell B, Blaschuk O (1983) Ram Rete Testis Fluid Contains a Protein (Clusterin) Which Influences Cell-Cell Interactions in Vitro. *Biol Reprod* 28:1173–1188. doi: 10.1095/biolreprod28.5.1173

14. Fröhlich GM, Meier P, White SK, Yellon DM, Hausenloy DJ (2013) Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *Eur Heart J* 34:1714–1722. doi: 10.1093/eurheartj/ehf090

15. Gao J-M, Meng X-W, Zhang J, Chen W-R, Xia F, Peng K, Ji F-H (2017) Dexmedetomidine Protects Cardiomyocytes against Hypoxia/Reoxygenation Injury by Suppressing TLR4-MyD88-NF- κ B Signaling. *BioMed Res Int* 2017:1674613. doi: 10.1155/2017/1674613

16. de Haan JJ, Smeets MB, Pasterkamp G, Arslan F (2013) Danger Signals in the Initiation of the Inflammatory Response after Myocardial Infarction. *Mediators Inflamm* 2013:206039. doi: 10.1155/2013/206039

17. Huang H, Evankovich J, Yan W, Nace G, Zhang L, Ross M, Liao X, Billiar T, Xu J, Esmon CT, Tsung A (2011) Endogenous Histones Function as Alarmins in Sterile Inflammatory Liver Injury Through Toll-like Receptor 9 in Mice. *Hepatology* 54:999–1008. doi: 10.1002/hep.24501

18. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, Caforio ALP, Crea F, Goudevenos JA, Halvorsen S, Hindricks G, Kastrati A, Lenzen MJ, Prescott E, Roffi M, Valgimigli M, Varenhorst C, Vranckx P, Widimský P, ESC Scientific Document Group (2018) 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in

patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 39:119–177. doi: 10.1093/eurheartj/ehx393

19. Ilzecka J, Ilzecki M, Grabarska A, Dave S, Feldo M, Zubilewicz T (2019) Clusterin as a potential marker of brain ischemia-reperfusion injury in patients undergoing carotid endarterectomy. *Ups J Med Sci* 124:193–198. doi: 10.1080/03009734.2019.1646359

20. Jun H-O, Kim D, Lee S-W, Lee HS, Seo JH, Kim JH, Kim JH, Yu YS, Min BH, Kim K-W (2011) Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis via Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Exp Mol Med* 43:53–61. doi: 10.3858/emm.2011.43.1.006

21. Kalakech H, Tamareille S, Pons S, Godin-Ribuot D, Carmeliet P, Furber A, Martin V, Berdeaux A, Ghaleh B, Prunier F (2013) Role of hypoxia inducible factor-1 α in remote limb ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol* 65:98–104. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.10.001

22. Kaplan MJ, Radic M (2012) Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. *J Immunol Baltim Md* 1950 189:2689–2695. doi: 10.4049/jimmunol.1201719

23. Kawai C, Kotani H, Miyao M, Ishida T, Jemal L, Abiru H, Tamaki K (2016) Circulating Extracellular Histones Are Clinically Relevant Mediators of Multiple Organ Injury. *Am J Pathol* 186:829–843. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.11.025

24. Konstantinidis K, Whelan RS, Kitsis RN (2012) Mechanisms of cell death in heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32:1552–1562. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.224915

25. Krijnen P a. J, Cillessen S a. GM, Manoe R, Muller A, Visser CA, Meijer CJLM, Musters RJP, Hack CE, Aarden LA, Niessen HWM (2005) Clusterin: a protective mediator for

- ischemic cardiomyocytes? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H2193-2202. doi: 10.1152/ajpheart.00355.2005
26. Lefrançais E, Looney MR (2017) Neutralizing Extracellular Histones in Acute Respiratory Distress Syndrome. A New Role for an Endogenous Pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 196:122–124. doi: 10.1164/rccm.201701-0095ED
27. Li Y, Song Y-Q, Zhang Y, Liu T, Qin Q (2021) Over-expression of Apolipoprotein J Inhibits Cholesterol Crystal-Induced Inflammatory Responses via Suppressing NLRP3 Inflammasome Activation in THP-1 Macrophages. *Folia Biol (Praha)* 67:183–190
28. Li Y, Wan D, Luo X, Song T, Wang Y, Yu Q, Jiang L, Liao R, Zhao W, Su B (2021) Circulating Histones in Sepsis: Potential Outcome Predictors and Therapeutic Targets. *Front Immunol* 12:650184. doi: 10.3389/fimmu.2021.650184
29. Liu G, Zhang H, Hao F, Hao J, Pan L, Zhao Q, Wo J (2018) Clusterin Reduces Cold Ischemia-Reperfusion Injury in Heart Transplantation Through Regulation of NF- κ B Signaling and Bax/Bcl-xL Expression. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 45:1003–1012. doi: 10.1159/000487295
30. Meara CHO, Coupland LA, Kordbacheh F, Quah BJC, Chang C-W, Simon Davis DA, Bezos A, Browne AM, Freeman C, Hammill DJ, Chopra P, Pipa G, Madge PD, Gallant E, Segovis C, Dulhunty AF, Arnolda LF, Mitchell I, Khachigian LM, Stephens RW, von Itzstein M, Parish CR (2020) Neutralizing the pathological effects of extracellular histones with small polyanions. *Nat Commun* 11:6408. doi: 10.1038/s41467-020-20231-y
31. Pereira RM, Mekary RA, da Cruz Rodrigues KC, Anaruma CP, Ropelle ER, da Silva ASR, Cintra DE, Pauli JR, de Moura LP (2018) Protective molecular mechanisms of clusterin

against apoptosis in cardiomyocytes. *Heart Fail Rev* 23:123–129. doi: 10.1007/s10741-017-9654-z

32. Rodríguez-Rivera C, Garcia MM, Molina-Álvarez M, González-Martín C, Goicoechea C (2021) Clusterin: Always protecting. Synthesis, function and potential issues. *Biomed Pharmacother* 134:111174. doi: 10.1016/j.biopha.2020.111174

33. Rosselló X, Huo Y, Pocock S, Van de Werf F, Chin CT, Danchin N, Lee SW-L, Medina J, Vega A, Bueno H (2017) Global geographical variations in ST-segment elevation myocardial infarction management and post-discharge mortality. *Int J Cardiol* 245:27–34. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.07.039

34. Savchenko AS, Borissoff JI, Martinod K, De Meyer SF, Gallant M, Erpenbeck L, Brill A, Wang Y, Wagner DD (2014) VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood* 123:141–148. doi: 10.1182/blood-2013-07-514992

35. Shah M, He Z, Rauf A, Beikoghli Kalkhoran S, Heiestad CM, Stensløkken K-O, Parish CR, Soehnlein O, Arjun S, Davidson SM, Yellon D (2022) Extracellular histones are a target in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 118:1115–1125. doi: 10.1093/cvr/cvab139

36. Shah M, Yellon DM, Davidson SM (2020) The Role of Extracellular DNA and Histones in Ischaemia-Reperfusion Injury of the Myocardium. *Cardiovasc Drugs Ther* 34:123–131. doi: 10.1007/s10557-020-06946-6

37. Shi H, Gandhi AA, Smith SA, Wang Q, Chiang D, Yalavarthi S, Ali RA, Liu C, Sule G, Tsou P-S, Zuo Y, Kanthi Y, Farkash EA, Lin JD, Morrissey JH, Knight JS (2021)

Endothelium-protective, histone-neutralizing properties of the polyanionic agent defibrotide. *JCI Insight* 6:149149. doi: 10.1172/jci.insight.149149

38. Silk E, Zhao H, Weng H, Ma D (2017) The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death Dis* 8:e2812. doi: 10.1038/cddis.2017.52

39. Silkensen JR, Hirsch AT, Lunzer MM, Chmielewski D, Manivel JC, Muellerleile MR, Rosenberg ME (1998) Temporal induction of clusterin in the peri-infarct zone after experimental myocardial infarction in the rat. *J Lab Clin Med* 131:28–35. doi: 10.1016/s0022-2143(98)90074-9

40. Silvis MJM, Kaffka Genaamd Dengler SE, Odille CA, Mishra M, van der Kaaij NP, Doevendans PA, Sluijter JPG, de Kleijn DPV, de Jager SCA, Bosch L, van Hout GPJ (2020) Damage-Associated Molecular Patterns in Myocardial Infarction and Heart Transplantation: The Road to Translational Success. *Front Immunol* 11:599511. doi: 10.3389/fimmu.2020.599511

41. Tamareille S, Mateus V, Ghaboura N, Jeanneteau J, Croué A, Henrion D, Furber A, Prunier F (2011) RISK and SAFE signaling pathway interactions in remote limb ischemic preconditioning in combination with local ischemic postconditioning. *Basic Res Cardiol* 106:1329–1339. doi: 10.1007/s00395-011-0210-z

42. Traxler D, Spannbaauer A, Einzinger P, Mester-Tonczar J, Lukovic D, Winkler J, Zlabinger K, Gugerell A, Mandic Lj, Gyöngyösi M, Pavo N (2020) Early Elevation of Systemic Plasma Clusterin after Reperfused Acute Myocardial Infarction in a Preclinical Porcine Model of Ischemic Heart Disease. *Int J Mol Sci* 21:E4591. doi: 10.3390/ijms21134591

43. Trougakos IP, Poulakou M, Stathatos M, Chalikia A, Melidonis A, Gonos ES (2002) Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in

diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction. *Exp Gerontol* 37:1175–1187. doi: 10.1016/s0531-5565(02)00139-0

44. Turkieh A, Fertin M, Bouvet M, Mulder P, Drobecq H, Lemesle G, Lamblin N, de Groote P, Porouchani S, Chwastyniak M, Beseme O, Amouyel P, Mouquet F, Balligand J-L, Richard V, Bauters C, Pinet F (2018) Expression and Implication of Clusterin in Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ Heart Fail* 11:e004838. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004838

45. Väkevä A, Laurila P, Meri S (1993) Co-deposition of clusterin with the complement membrane attack complex in myocardial infarction. *Immunology* 80:177–182

46. Van Dijk A, Vermond RA, Krijnen PAJ, Juffermans LJM, Hahn NE, Makker SP, Aarden LA, Hack E, Spreeuwenberg M, van Rossum BC, Meischl C, Paulus WJ, Van Milligen FJ, Niessen HWM (2010) Intravenous clusterin administration reduces myocardial infarct size in rats. *Eur J Clin Invest* 40:893–902. doi: 10.1111/j.1365-2362.2010.02345.x

47. Wilson MR, Easterbrook-Smith SB (2000) Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem Sci* 25:95–98. doi: 10.1016/s0968-0004(99)01534-0

48. Wilson MR, Zoubeidi A (2017) Clusterin as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* 21:201–213. doi: 10.1080/14728222.2017.1267142

49. Wyatt AR, Yerbury JJ, Wilson MR (2009) Structural characterization of clusterin-chaperone client protein complexes. *J Biol Chem* 284:21920–21927. doi: 10.1074/jbc.M109.033688

50. Xu J, Zhang X, Pelayo R, Monestier M, Ammollo CT, Semeraro F, Taylor FB, Esmon NL, Lupu F, Esmon CT (2009) Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nat Med* 15:1318–1321. doi: 10.1038/nm.2053
51. Yang X, Li L, Liu J, Lv B, Chen F (2016) Extracellular histones induce tissue factor expression in vascular endothelial cells via TLR and activation of NF- κ B and AP-1. *Thromb Res* 137:211–218. doi: 10.1016/j.thromres.2015.10.012

Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que la CLU protégeait le cœur contre les lésions inflammatoires dans le modèle d'I/R myocardique et que cette protection est due en partie à sa capacité à neutraliser les histones extracellulaires libérés par le tissu endommagé. Les principaux résultats de cette étude sont : 1) La CLU présente un effet cardioprotecteur à la phase aiguë de l'IDM, objectivé par une taille d'infarctus significativement plus importante chez les souris déficientes en CLU par rapport aux souris *wild type* ; 2) L'effet cardioprotecteur de la CLU *in vivo* s'accompagne d'une atténuation de la réponse pro-inflammatoire post-IDM, par la diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β) et par une diminution de l'activation de l'inflammasome NLRP3 ; 3) La CLU neutralise *in vitro* l'effet pro-inflammatoire et cytotoxique des histones, qui sont libérés en grande quantité dans notre modèle d'H/R par les cellules de la lignée cellulaire H9C2. La fixation de CLU aux histones inhibe leur entrée dans les cellules et donc l'induction de la mort cellulaire. De plus, CLU diminue la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (IL-6) par les H9C2 stimulées par l'H/R ; 4) Des complexes CLU-histones sont détectés dans le plasma des patients STEMI, ce qui est corrélé à une diminution de la CLU circulante. Ceci pourrait être dû à sa consommation par les histones extracellulaires. Dans l'ensemble, nos résultats suggèrent l'effet cardioprotecteur de la CLU à la phase aiguë de l'IDM et cela au moins en partie en protégeant le cœur contre les lésions induites par la réponse inflammatoire stérile dans l'I/R myocardique.

Nous avons pu montrer pour la première fois que les souris déficientes en CLU étaient plus sensibles aux lésions d'I/R myocardiques par rapport à leurs *wild type* dans notre modèle d'ischémie de 40 minutes suivie de 24 heures de reperfusion. Cet effet cardioprotecteur s'accompagne d'une diminution de la réponse pro-inflammatoire local à la phase précoce de la reperfusion (3 heures). La CLU a déjà été montrée comme capable de supprimer l'infiltration des macrophages et la polarisation pro-inflammatoire M1 et d'améliorer l'activité phagocytaire dans le modèle d'I/R rénale (Weng et al., 2021). Dans un modèle de transplantation cardiaque, la CLU est associée à une réduction des signaux pro-inflammatoires dans un modèle de transplantation cardiaque (G. Liu et al., 2018). La CLU pourrait donc exercer son effet cardioprotecteur en diminuant l'expression d'IL-6 inhibant ainsi l'infiltration des macrophages dans le myocarde infarci. Cependant, l'infiltration des macrophages est l'élément manquant dans notre démonstration. Il serait donc judicieux d'explorer cette piste pour compléter la compréhension du mécanisme cardioprotecteur *in vivo* de la CLU.

Nous montrons également que la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β est augmentée dans la zone infarctée des souris déficientes en CLU par rapport à leurs *wild type* à la phase précoce de la reperfusion. Ceci reflète l'activation de l'inflammasome NLRP3 et son implication dans l'installation des lésions d'I/R chez les souris déficientes en CLU. De manière similaire, une étude récente a montré que la surexpression de la CLU atténue l'inflammation induite par les cristaux de cholestérol par l'inhibition de la voie de l'inflammasome NLRP3/caspase-1 tout en empêchant l'excrétion des cytokines inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-18 (Y. Li et al., 2021a).

Toujours dans la description des scénarios de potentiels mécanismes protecteurs de la CLU à la phase aiguë de l'IDM et vu que la CLU a été identifiée capable de se lier aux différents types d'histones (données non publiées (Augusto *et al.*)), nous nous sommes intéressés à doser en premier lieu les histones libérées par les cellules mourantes après la séquence d'I/R. Dans notre modèle, nous avons montré que l'IDM induisait une libération importante et précoce d'histones dès le début de la reperfusion. Pendant l'ischémie, l'environnement pro-inflammatoire créé par les fragments d'ADN induit l'activation des TLRs des cellules cardiaques survivantes dans la zone bordant le myocarde infarcté conduisant à l'activation des voies de signalisation intracellulaires en aval, médiée par le facteur de transcription NF- κ B, et les composants protéiques qui constituent l'inflammasome NLRP3 (Boyd et al., 2006; Hall et al., 2006). De plus, nous avons détecté des complexes CLU-histones dans le plasma des patients STEMI. Plusieurs études ont rapporté l'intérêt de neutraliser les histones extracellulaires au cours de la phase aiguë de l'IDM. L'héparine en se liant aux histones protège l'endothélium coronaire et le myocarde des lésions d'I/R (Kouretas et al., 1998, 1999; Pevni et al., 2005; Thourani et al., 2000). Les dérivés de l'héparine réduisent la taille de l'infarctus dans un modèle d'I/R chez le rat (Collino et al., 2012). Pour étudier l'effet neutralisant de la CLU sur les histones, nous avons traité avec de la CLU exogène les cellules H9C2, incubées avec les histones, dans un modèle d'I/R, et un effet cytoprotecteur est observé par rapport aux cellules incubées avec les histones seuls. Cependant, d'autres études seront nécessaires pour étudier l'effet anti-inflammatoire de CLU en présence d'histones avec des doses d'histones plus faibles. Néanmoins, nos résultats n'excluent pas l'effet immunomodulateur de la CLU sur l'inflammasome.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans ce travail de thèse, nos objectifs étaient d'une part d'analyser l'existence d'un effet cardioprotecteur de la CLU, par son rôle de protéine chaperonne sur les histones (H3/H4) et, d'autre part de rechercher les voies de signalisation inflammatoire modulées par la CLU au décours de l'IDM. Les résultats des expérimentations *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur les cellules de la lignée H9C2 nous ont permis de mettre en évidence un rôle crucial de la CLU dans les mécanismes de protection du cœur face aux lésions liées à l'I/R.

Le rôle physiologique de CLU est complexe et dépend de ses isoformes, de sa localisation et des types cellulaires (Rohne et al., 2016). Plusieurs données suggèrent un rôle cytoprotecteur de CLU dans la phase précoce après un IDM. Dans un modèle de rat d'I/R myocardique par ligature coronaire, l'administration de CLU pendant 3 jours débutée dès la reperfusion a permis de réduire de façon significative la taille de l'infarctus et le taux de mortalité des rats (Dijk et al., 2010). En outre, le traitement avec la CLU après un infarctus aigu chez la souris a réduit l'apoptose des cardiomyocytes et a augmenté l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse, l'angiogenèse et la préservation de la fonction cardiaque (Foglio et al., 2015). *In vitro*, CLU protégeait les cardiomyocytes de la mort cellulaire induite par l'ischémie (Krijnen et al., 2005) ou des lésions cardiaques induites par l'éthanol (Y. Li et al., 2007). Nos résultats *in vitro*, sur les H9C2 dans notre modèle d'H/R, mettent en évidence cet effet cytoprotecteur de CLU en réduisant la mortalité cellulaire induite par l'H/R. De plus, notre travail a permis de valider pour la première fois le rôle cardioprotecteur de CLU sur des souris déficientes en CLU (CLU $-/-$). Nous avons montré que ces souris présentent une sensibilité plus importante aux lésions d'I/R myocardiques, objectivée par une taille d'infarctus significativement plus importante chez les souris CLU $-/-$ par rapport aux souris *wild type*. Dans un modèle d'I/R rénale, un travail avait montré que les souris déficientes en CLU présentent en plus des lésions sévères un taux de survie réduit (W. Zhou et al., 2010). Dans notre étude, la mortalité des souris CLU $-/-$ après I/R était également significativement augmentée par rapport aux souris *wild type* (données non montrées).

Chez des patients atteints d'IDM, les niveaux de CLU augmentent dans le plasma après 24 heures (Trougakos et al., 2002) et CLU a été récemment identifiée dans les exosomes isolés du fluide péricardique (Foglio et al., 2015). De plus, au stade tardif de l'infarctus, les données protéomiques ont montré une augmentation de niveau d'expression de CLU dans le ventricule gauche. Cette augmentation est associée au remodelage ventriculaire gauche (Turkieh et al., 2018). De plus, chez des rats soumis à une I/R myocardique, la CLU a également été détectée dans la zone péri-infarctique (Silkensen et al., 1998). Ces données appuient nos résultats, observés

in vivo, représentés par une augmentation du taux sérique de CLU ainsi que du niveau d'expression dans la zone ischémique chez des souris infarctées après 24 heures. Toutefois, l'origine de cette expression cardiaque reste à élucider. Elle pourrait résulter d'un dépôt tissulaire ou bien d'une synthèse locale.

Chez les patients STEMI, une diminution de CLU circulante est trouvée à différents temps après la revascularisation (H0, H4, H24, H48) par rapport aux sujets sains. De façon intéressante, une normalisation des niveaux plasmatiques est observée à 1 mois avec un retour aux niveaux des individus sains. Ceci suggère une consommation des stocks de CLU présents à l'état basal avec ou sans nouvelle synthèse. Cette diminution s'accorde avec les résultats précédents de Cubedo *et al.* qui montrent aussi cette diminution précoce de CLU plasmatique chez des patients STEMI après la revascularisation (Cubedo *et al.*, 2011, 2022). Cependant selon l'étude de Cubedo *et al.*, la diminution de CLU circulante, sous sa forme glycosylée, était due à l'ischémie elle-même qui induit un changement du profil de glycosylation de CLU en accumulant des variants intracellulaires non glycosylés de CLU (Cubedo *et al.*, 2022). Cette accumulation pourrait être liée à l'activité chaperonne accrue des variants intracellulaires de CLU dans un milieu hautement oxydatif pour faciliter le trafic, la liaison et/ou le repliement des protéines dénaturées dans le contexte de l'ischémie (Heusch, 2020; Heusch & Gersh, 2017; N. Li *et al.*, 2013; Rohne *et al.*, 2014). Alors que, Augusto *et al.* ont rapporté que CLU en tant que protéine chaperonne extracellulaire pourrait se lier aux histones circulantes, libérées par les cellules mortes, et réduit leurs propriétés inflammatoires et cytotoxiques dans le cadre du choc septique (données non publiées (Augusto *et al.*)).

Toutefois les résultats contradictoires que nous avons observés entre les souris infarctées et les patients STEMI peuvent être expliqués et interprétés par le fait que la technique de ligature coronaire choisie pour induire l'infarctus chez les souris provoque elle-même des dommages tissulaires et une augmentation de l'inflammation dû à la thoracotomie et la ventilation (Q. Sun *et al.*, 2018) d'une part. Et d'autre part, la CLU, en tant qu'une molécule anti inflammatoire, pourrait être sécrétée en quantité importante afin d'atténuer l'inflammation induite par l'intervention chirurgicale dans notre modèle (De Miguel *et al.*, 2021).

Les résultats obtenus nous ont amenés à clarifier le mécanisme par lequel la protection cardiaque est assurée par la CLU. Pour cela, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à étudier le rôle chaperonne de CLU sur les histones extracellulaires, libérées par les cellules mortes suite aux lésions d'I/R et à rechercher dans un second temps les voies de signalisation inflammatoire modulées par la CLU dans le contexte de l'IDM.

Après une I/R, les débris cellulaires libérés par les cellules mortes agissent comme des DAMPs et contribuent à la mort excessive des cardiomyocytes et à l'inflammation (Andreadou et al., 2019; Zuurbier et al., 2019). Les histones sont connues pour être des DAMPs majeurs, un fait démontré pour la première fois par l'observation que les souris meurent rapidement lorsque des histones libres sont administrées par voie intraveineuse (Xu et al., 2009). La toxicité des histones a été démontrée dans une grande variété de pathologies. Il a déjà été démontré que les histones extracellulaires sont cytotoxiques pour les cellules endothéliales (Silvestre-Roig et al., 2019) et les cellules rénales (Allam et al., 2012) et elles ont également été impliquées dans la pathogenèse de la cardiomyopathie septique (Kalbitz et al., 2015). Chez l'homme, la concentration maximale d'histones circulantes cliniquement détectée dans un trouble inflammatoire tel qu'un sepsis sévère se situe entre 200 et 400 $\mu\text{g/mL}$ (Ekaney et al., 2014). Il a été démontré précédemment que l'exposition des cardiomyocytes de rats à 50 $\mu\text{g/mL}$ d'histones pendant 3 heures était toxique *in vitro* (Fattahi et al., 2018). Ici, nous montrons que l'exposition des cellules de la lignée cellulaire H9C2 à différentes concentrations d'histones (50-800 $\mu\text{g/ml}$) en condition de normoxie et (25-100 $\mu\text{g/ml}$) pendant une séquence d'hypoxie de 6 heures induisait une mortalité cellulaire d'une manière concentration-dépendante [avec une concentration létale 50 (CL50) de 275 $\mu\text{g/ml}$ et une concentration de 100 $\mu\text{g/ml}$ induisant une mortalité cellulaire de 35 %, les 2 concentrations choisies dans l'ensemble de notre travail en condition de normoxie et en condition d'hypoxie respectivement]. Il est intéressant de noter que la capacité des histones extracellulaires à favoriser l'inflammation et l'agrégation plaquettaire et à induire la mort cellulaire dépend de leur concentration : de faibles concentrations d'histones stimulent, par l'intermédiaire des récepteurs de l'immunité innée, la production de cytokines (T. A. Fuchs et al., 2011; H. Huang et al., 2011, 2013) tandis que des concentrations élevées d'histones entraînent la mort cellulaire (Allam et al., 2012; H. Wang et al., 1999, p. 1; Xu et al., 2011).

Les histones extracellulaires sont significativement élevés après une I/R hépatique (H. Huang et al., 2011), rénale (Allam et al., 2012), pulmonaire (Bosmann et al., 2013), cérébrale (De Meyer et al., 2012) et myocardique (Shah et al., 2022). Dans notre étude, nous avons obtenu des résultats comparables pour la libération des histones dans le milieu extracellulaire après l'I/R myocardique, *in vivo* et *in vitro*. Les histones circulantes augmentent de façon marquée chez les patients STEMI à partir de la 4^e heure pour atteindre un pic à 48 heures après revascularisation et une diminution à 1 mois. De façon intéressante, l'augmentation du taux d'histones circulantes s'accompagne d'une augmentation du taux de leucocytes et plus

particulièrement de neutrophiles, qui représentent une des sources d'histones extracellulaires par le processus de NETose (Kaplan & Radic, 2012; Shah et al., 2020) (Bochaton et al., 2021, 2022). Ces résultats sont en accord avec une étude faite en 2016 qui a montré une augmentation de la libération des histones dans le sérum de patients STEMI avec un pic à 12 heures après revascularisation et une corrélation positive avec le nombre des leucocytes (Helseth et al., 2016).

D'autre part, les taux d'histones circulantes sont corrélés avec le taux de CRP et d'IL-6, qui sont des marqueurs systémiques de l'inflammation au décours de l'IDM (Bochaton et al., 2021, 2022). Il est bien connu que des taux élevés d'IL-6 en circulation dans les syndromes coronariens aigus ont une valeur pronostique (Lindmark et al., 2001; Miyao et al., 1993; Ridker, Rifai, et al., 2000). IL-6 en se liant aux récepteurs membranaires dans le cœur induit l'activation de deux cascades de signalisation majeures, les voies SHP2/ERK et STAT, qui sont importantes pour le processus de remodelage du myocarde (Fischer & Hilfiker-Kleiner, 2008). De plus, il a été démontré que les niveaux circulants d'IL-6 et de CRP sont associés à l'étendue de la nécrose myocardique (Ritschel et al., 2014).

A noter que le taux faible d'histones circulantes détecté chez les sujets sains est présumé en lien avec la mort cellulaire physiologique (Pemberton et al., 2010).

Ces données fournissent une preuve de principe que le ciblage des histones extracellulaires pourrait être un thérapie complémentaire utile pour contrer les lésions d'I/R, soit individuellement soit en combinaison avec d'autres traitements cardioprotecteurs (Davidson et al., 2019). Des études ont rapporté que la neutralisation des histones extracellulaires pourrait avoir un potentiel thérapeutique. Plusieurs molécules ont été identifiées dans ce contexte : des anticorps (De Meyer et al., 2012), des polyanions [vu que les histones extracellulaires sont hautement cationiques en raison du grand nombre de résidus basiques exposés à leur surface Par conséquent, les polyanions peuvent interagir électro statiquement avec les histones et les neutraliser] comme l'héparine (Iba et al., 2015; Y. Zhang et al., 2014), ou même des polyanions non anticoagulants (sulfate de sodium-b-O-Méthyl cellobioside, mCBS) (Meara et al., 2020; Shah et al., 2022), l'albumine (Cet effet inhibiteur est lié à la différence de charge entre l'albumine et les histones) (Lam et al., 2013), la thrombomoduline (Nakahara et al., 2013), et les pentraxines CRP et PTX3 (Abrams et al., 2013; Daigo et al., 2014). Cependant, les niveaux élevés de CRP observé dans le contexte de l'IDM sont liés à une augmentation de la mortalité hospitalière et un mauvais pronostic ((Berk et al., 1990; Heeschen et al., 2000; Toss et al.,

1997). Ces données suggèrent que, durant l'IDM, l'augmentation de cette molécule neutralisante n'est pas suffisante pour protéger les cellules et les tissus des histones.

Récemment, la CLU a été identifiée comme agent permettant l'opsonisation des cellules apoptotiques tardives et favorisant leur élimination par les phagocytes, ce qui suggère qu'elle pourrait agir comme un PRR soluble (Cunin et al., 2016). De plus, il est intéressant de noter que les histones, qui s'accumulent à la surface des cellules apoptotiques tardives (Radic et al., 2004), ont été identifiées comme des éléments de liaison à la CLU (Cunin et al., 2016). A partir de ces données, Augusto *et al.* ont montré que CLU se lie spécifiquement aux histones parmi les autres DAMPs (HSP70, HMGB1, ADN et la calréticuline) *in vitro* (données non publiées (Augusto *et al.*, en révision)). En particulier, la toxicité des histones était principalement due aux histones H3 et H4 par rapport aux autres sous-types des histones (Xu et al., 2009) et récemment H4 a été identifiée comme le médiateur toxique de la mort des cellules musculaires lisses dans un modèle murin d'athérosclérose (Silvestre-Roig et al., 2019). La liaison de CLU aux différents sous-types des histones a été alors analysée et les résultats ont montré que la CLU se fixe aux histones recombinants H2A, H2B, H3 et H4 (données non publiées (Augusto *et al.*)). Dans notre travail, des complexes CLU-histones (H3 et H4) circulantes ont été trouvés chez des patients STEMI aux différents temps après la revascularisation. De plus, la CLU permet de neutraliser les effets toxiques des histones exogènes dans notre modèle d'H/R *in vitro* ce qui évoque la liaison de CLU aux histones. Nous suggérons que l'interaction de CLU avec les histones se fait au niveau des groupements carbohydrates anioniques de la CLU qui représentent 30% de son poids moléculaire (Fritz et al., 1983). Il est intéressant de noter que la capacité de liaison de CLU à ses ligands est renforcée dans un milieu acide (Poon et al., 2002) une condition communément observée lors de l'IDM (Preusse et al., 1982; Sosunov et al., 2013). Une question qui se pose désormais est comment se fait l'élimination de ces complexes par la suite ? Des études chez le rat ont montré que la clairance des ligands de la CLU se fait par un mécanisme d'endocytose et de dégradation hépatique (Wyatt et al., 2011).

Compte tenu de l'effet anti-inflammatoire de CLU, nous montrons qu'elle pourrait diminuer l'inflammation post-IDM, soit d'une façon directe ou d'une façon indirecte par sa capacité à neutraliser les histones. Les propriétés pro-inflammatoires des histones semblent dépendre de l'activation des PRRs, tels que TLR2/ TLR4, TLR9 et NLRP3, qui induisent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires (Allam et al., 2012, 2013; H. Huang et al., 2011; X. Yang et al., 2016). Dans notre travail, la CLU induit une diminution de l'activation du facteur de transcription NF- κ B et de l'expression en aval d'IL-6 *in vivo* et *in vitro*. Nous avons également

étudié la voie de signalisation inflammatoire de l'inflammasome NLRP3 et les cytokines en aval de cette voie, et nous avons constaté que la CLU est capable de réduire de manière significative les niveaux de NLRP3 tout en diminuant la sécrétion de cytokines inflammatoire IL-1 β . Une étude récente montre que la surexpression de CLU pourrait atténuer l'inflammation induite par les cristaux de cholestérol par l'inhibition de la voie de l'inflammasome NLRP3 (Y. Li et al., 2021b). Cette surexpression de CLU pourrait être due à l'activation des TLRs eux-même. C'est ce qu'ont suggéré les travaux de Baiersdörfer *et al.* qui ont montré que l'activation de TLR3 induisait l'expression de CLU cytoprotectrice et anti-inflammatoire par les cellules musculaires lisses et *in vivo* chez les souris, pour potentiellement contrer l'athérosclérose (Baiersdörfer et al., 2010).

Il est important de souligner que la modulation / l'inhibition de l'inflammation dans le contexte d'IDM n'est pas simple et pourrait donner des résultats inattendus en raison de la présence de multiples effecteurs. Dans notre étude, la neutralisation des histones extracellulaires par la CLU pourrait être une piste thérapeutique intéressante. Cependant, les histones partagent avec des autres types de DAMPs les mêmes récepteurs, TLRs et NLRP3, d'une part. Et d'autre part, malgré la grande variété des PRRs, la liaison des DAMPs au PRRs déclenchent des voies de signalisation communes qui convergent vers la production de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I. De plus, on ne connaît pas l'impact de CLU sur les cellules inflammatoires dans le contexte de l'IDM. Dans un modèle d'I/R rénale chez la souris, la CLU pourrait supprimer l'infiltration des macrophages et la polarisation pro-inflammatoire M1 pendant la période de récupération qui suit les lésions d'I/R (Weng et al., 2021). Ce qui encourage à continuer les recherches expérimentales utilisant la CLU dans l'IDM afin de dévoiler toutes les voies inflammatoires impliquées dans l'effet protecteur de CLU observé dans notre étude et de tester le *timing* idéal de l'injection de CLU durant la séquence d'I/R pour obtenir un effet protecteur maximal.

CONCLUSION

Les lésions d'I/R myocardiques restent à ce jour une réalité et découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques est une priorité pour améliorer le pronostic des patients après un IDM. Ce travail de thèse a permis d'étudier l'effet protecteur de la protéine chaperonne extracellulaire CLU, dans le contexte d'I/R myocardique.

Ces travaux montrent que la CLU atténue les effets pro-inflammatoires et cytotoxiques des histones extracellulaires libérés au décours d'une I/R cardiaque. Les résultats *in vivo* mettent en évidence le rôle cardioprotecteur de la CLU dans un modèle d'IDM chez la souris déficiente en CLU. Nous montrons, que le niveau de CLU circulante est diminué au décours de l'IDM, probablement en rapport avec la formation des complexes CLU-histones.

Une approche consistant à moduler la réponse inflammatoire post-infarctus par une administration de protéines chaperonnant les DAMPs pourrait ainsi représenter une stratégie thérapeutique prometteuse.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbate, A., Salloum, F. N., Vecile, E., Das, A., Hoke, N. N., Straino, S., Biondi-Zoccai, G. G. L., Houser, J.-E., Qureshi, I. Z., Ownby, E. D., Gustini, E., Biasucci, L. M., Severino, A., Capogrossi, M. C., Vetrovec, G. W., Crea, F., Baldi, A., Kukreja, R. C., & Dobrina, A. (2008). Anakinra, a Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist, Inhibits Apoptosis in Experimental Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, *117*(20), 2670-2683. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.740233>
- Abbate, A., Trankle, C. R., Buckley, L. F., Lipinski, M. J., Appleton, D., Kadariya, D., Canada, J. M., Carbone, S., Roberts, C. S., Abouzaki, N., Melchior, R., Christopher, S., Turlington, J., Mueller, G., Garnett, J., Thomas, C., Markley, R., Wohlford, G. F., Puckett, L., ... Van Tassel, B. W. (2020). Interleukin-1 Blockade Inhibits the Acute Inflammatory Response in Patients With ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *Journal of the American Heart Association*, *9*(5), e014941. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.014941>
- Abrams, S. T., Zhang, N., Dart, C., Wang, S. S., Thachil, J., Guan, Y., Wang, G., & Toh, C.-H. (2013). Human CRP Defends against the Toxicity of Circulating Histones. *The Journal of Immunology*, *191*(5), 2495-2502. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1203181>
- Adameova, A., Goncalvesova, E., Szobi, A., & Dhalla, N. S. (2016). Necroptotic cell death in failing heart: Relevance and proposed mechanisms. *Heart Failure Reviews*, *21*(2), 213-221. <https://doi.org/10.1007/s10741-016-9537-8>
- Adameova, A., Hrdlicka, J., Szobi, A., Farkasova, V., Kopaskova, K., Murarikova, M., Neckar, J., Kolar, F., Ravingerova, T., & Dhalla, N. S. (2017). Evidence of necroptosis in hearts subjected to various forms of ischemic insults. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *95*(10), 1163-1169. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0609>
- Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, *4*(7), 499-511. <https://doi.org/10.1038/nri1391>
- Alibek, K., Irving, S., Sautbayeva, Z., Kakpenova, A., Bekmurzayeva, A., Baiken, Y., Imangali, N., Shaimerdenova, M., Mektepbayeva, D., Balabiyev, A., & Chinybayeva, A. (2014). Disruption of Bcl-2 and Bcl-xL by viral proteins as a possible cause of cancer. *Infectious Agents and Cancer*, *9*, 44. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-9-44>
- Allam, R., Darisipudi, M. N., Tschopp, J., & Anders, H.-J. (2013). Histones trigger sterile inflammation by activating the NLRP3 inflammasome. *European Journal of Immunology*, *43*(12), 3336-3342. <https://doi.org/10.1002/eji.201243224>
- Allam, R., Scherbaum, C. R., Darisipudi, M. N., Mulay, S. R., Hägele, H., Lichtnekert, J., Hagemann, J. H., Rupanagudi, K. V., Ryu, M., Schwarzenberger, C., Hohenstein, B., Hugo, C., Uhl, B., Reichel, C. A., Krombach, F., Monestier, M., Liapis, H., Moreth, K., Schaefer, L., & Anders, H.-J. (2012). Histones from Dying Renal Cells Aggravate Kidney Injury via TLR2 and TLR4. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *23*(8), 1375-1388. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011111077>
- Andersen, C. L., Schepeler, T., Thorsen, K., Birkenkamp-Demtröder, K., Mansilla, F., Aaltonen, L. A., Laurberg, S., & Ørntoft, T. F. (2007). Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, *6*(6), 1039-1048. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600261-MCP200>

Andersson, U., Antoine, D. J., & Tracey, K. J. (2014). Expression of Concern : The functions of HMGB1 depend on molecular localization and post-translational modifications. *Journal of Internal Medicine*, 276(5), 420-424. <https://doi.org/10.1111/joim.12309>

Andrassy, M., Volz, H. C., Igwe, J. C., Funke, B., Eichberger, S. N., Kaya, Z., Buss, S., Autschbach, F., Pleger, S. T., Lukic, I. K., Bea, F., Hardt, S. E., Humpert, P. M., Bianchi, M. E., Mairbörl, H., Nawroth, P. P., Remppis, A., Katus, H. A., & Bierhaus, A. (2008). High-Mobility Group Box-1 in Ischemia-Reperfusion Injury of the Heart. *Circulation*, 117(25), 3216-3226. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.769331>

Andreadou, I., Cabrera-Fuentes, H. A., Devaux, Y., Frangogiannis, N. G., Frantz, S., Guzik, T., Liehn, E. A., Gomes, C. P. C., Schulz, R., & Hausenloy, D. J. (2019). Immune cells as targets for cardioprotection: New players and novel therapeutic opportunities. *Cardiovascular Research*, 115(7), 1117-1130. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz050>

Andrews, A. J., & Luger, K. (2011). Nucleosome structure(s) and stability : Variations on a theme. *Annual Review of Biophysics*, 40, 99-117. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-042910-155329>

Aragonès, G., Auguet, T., Guiu-Jurado, E., Berlanga, A., Curriu, M., Martinez, S., Alibalic, A., Aguilar, C., Hernández, E., Camara, M.-L., Canela, N., Herrero, P., Ruyra, X., Martín-Paredero, V., & Richart, C. (2016). Proteomic Profile of Unstable Atheroma Plaque : Increased Neutrophil Defensin 1, Clusterin, and Apolipoprotein E Levels in Carotid Secretome. *Journal of Proteome Research*, 15(3), 933-944. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00936>

Arai, M., Lefer, D. J., So, T., DiPaula, A., Aversano, T., & Becker, L. C. (1996). An anti-CD18 antibody limits infarct size and preserves left ventricular function in dogs with ischemia and 48-hour reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology*, 27(5), 1278-1285. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(95\)00578-1](https://doi.org/10.1016/0735-1097(95)00578-1)

Araszkiwicz, A., Grygier, M., Pyda, M., Rajewska, J., Michalak, M., Sławek-Szmyt, S., & Lesiak, M. (2019). Ischemic postconditioning reduces infarct size and microvascular obstruction zone in acute ST-elevation myocardial infarction – a randomized study. *Postępy w Kardiologii Interwencyjnej = Advances in Interventional Cardiology*, 15(3), 292-300. <https://doi.org/10.5114/aic.2019.87882>

Aronis, K. N., Vamvini, M. T., Chamberland, J. P., & Mantzoros, C. S. (2011). Circulating clusterin (apolipoprotein J) levels do not have any day/night variability and are positively associated with total and LDL cholesterol levels in young healthy individuals. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(11), E1871-1875. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-1555>

Arslan, F., de Kleijn, D. P., & Pasterkamp, G. (2011). Innate immune signaling in cardiac ischemia. *Nature Reviews Cardiology*, 8(5), 292-300. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2011.38>

Arslan, F., Houtgraaf, J. H., Keogh, B., Kazemi, K., de Jong, R., McCormack, W. J., O'Neill, L. A. J., McGuirk, P., Timmers, L., Smeets, M. B., Akeroyd, L., Reilly, M., Pasterkamp, G., & de Kleijn, D. P. V. (2012). Treatment With OPN-305, a Humanized Anti-Toll-Like Receptor-2 Antibody, Reduces Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Pigs. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 5(2), 279-287. <https://doi.org/10.1161/CIRCINTERVENTIONS.111.967596>

Arslan, F., Smeets, M. B., Riem Vis, P. W., Karper, J. C., Quax, P. H., Bongartz, L. G., Peters, J. H., Hoefler, I. E., Doevendans, P. A., Pasterkamp, G., & de Kleijn, D. P. (2011). Lack of fibronectin-EDA promotes survival and prevents adverse remodeling and heart function deterioration after myocardial infarction. *Circulation Research*, *108*(5), 582-592. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.224428>

Arslan Fatih, Smeets Mirjam B., O'Neill Luke A.J., Keogh Brian, McGuirk Peter, Timmers Leo, Tersteeg Claudia, Hoefler Imo E., Doevendans Pieter A., Pasterkamp Gerard, & de Kleijn Dominique P.V. (2010). Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury Is Mediated by Leukocytic Toll-Like Receptor-2 and Reduced by Systemic Administration of a Novel Anti-Toll-Like Receptor-2 Antibody. *Circulation*, *121*(1), 80-90. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.880187>

Artemaki, P. I., Sklirou, A. D., Kontos, C. K., Liosi, A.-A., Gianniou, D. D., Papadopoulos, I. N., Trougakos, I. P., & Scorilas, A. (2020). High clusterin (CLU) mRNA expression levels in tumors of colorectal cancer patients predict a poor prognostic outcome. *Clinical Biochemistry*, *75*, 62-69. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.10.008>

Asea, A., Kraeft, S.-K., Kurt-Jones, E. A., Stevenson, M. A., Chen, L. B., Finberg, R. W., Koo, G. C., & Calderwood, S. K. (2000). HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature Medicine*, *6*(4), 4. <https://doi.org/10.1038/74697>

Atar, D., Arheden, H., Berdeaux, A., Bonnet, J.-L., Carlsson, M., Clemmensen, P., Cuvier, V., Danchin, N., Dubois-Rande, J.-L., Engblom, H., Erlinge, D., Firat, H., Halvorsen, S., Hansen, H. S., Hauke, W., Heiberg, E., Koul, S., Larsen, A.-I., Le Corvoisier, P., ... Jensen, S. E. (2015). Effect of intravenous TRO40303 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-elevation myocardial infarction: MITOCARE study results. *European Heart Journal*, *36*(2), 112-119. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu331>

Aversano, T., Zhou, W., Nedelman, M., Nakada, M., & Weisman, H. (1995). A chimeric IgG4 monoclonal antibody directed against CD18 reduces infarct size in a primate model of myocardial ischemia and reperfusion. *Journal of the American College of Cardiology*, *25*(3), 781-788. [https://doi.org/10.1016/0735-1097\(94\)00443-T](https://doi.org/10.1016/0735-1097(94)00443-T)

Baiersdörfer, M., Schwarz, M., Seehafer, K., Lehmann, C., Heit, A., Wagner, H., Kirschning, C. J., & Koch-Brandt, C. (2010). Toll-like receptor 3 mediates expression of clusterin/apolipoprotein J in vascular smooth muscle cells stimulated with RNA released from necrotic cells. *Experimental Cell Research*, *316*(20), 3489-3500. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.07.022>

Bailey, R. W., Aronow, B., Harmony, J. A. K., & Griswold, M. D. (2002). Heat shock-initiated apoptosis is accelerated and removal of damaged cells is delayed in the testis of clusterin/ApoJ knock-out mice. *Biology of Reproduction*, *66*(4), 1042-1053. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.1042>

Bailey, R. W., Dunker, A. K., Brown, C. J., Garner, E. C., & Griswold, M. D. (2001). Clusterin, a Binding Protein with a Molten Globule-like Region †. *Biochemistry*, *40*(39), 11828-11840. <https://doi.org/10.1021/bi010135x>

- Bajpai, G., Schneider, C., Wong, N., Bredemeyer, A., Hulsmans, M., Nahrendorf, M., Epelman, S., Kreisel, D., Liu, Y., Itoh, A., Shankar, T. S., Selzman, C. H., Drakos, S. G., & Lavine, K. J. (2018). The Human Heart Contains Distinct Macrophage Subsets with Divergent Origins and Functions. *Nature medicine*, 24(8), 1234-1245. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0059-x>
- Baralla, A., Sotgiu, E., Deiana, M., Pasella, S., Pinna, S., Mannu, A., Canu, E., Sotgiu, G., Ganau, A., Zinellu, A., Sotgia, S., Carru, C., & Deiana, L. (2015). Plasma Clusterin and Lipid Profile : A Link with Aging and Cardiovascular Diseases in a Population with a Consistent Number of Centenarians. *PloS One*, 10(6), e0128029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128029>
- Benhabbouche, S., Crola da silva, C., Abrial, M., & Ferrera, R. (2011). Base des phénomènes d'ischémie reperfusion et de la protection myocardique. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 30, S2-S16. [https://doi.org/10.1016/S0750-7658\(11\)70002-8](https://doi.org/10.1016/S0750-7658(11)70002-8)
- Berk, B. C., Weintraub, W. S., & Alexander, R. W. (1990). Elevation of C-reactive protein in "active" coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*, 65(3), 168-172. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(90\)90079-G](https://doi.org/10.1016/0002-9149(90)90079-G)
- Bertram, L., McQueen, M. B., Mullin, K., Blacker, D., & Tanzi, R. E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies : The AlzGene database. *Nature Genetics*, 39(1), 17-23. <https://doi.org/10.1038/ng1934>
- Bertrand, P., Poirier, J., Oda, T., Finch, C. E., & Pasinetti, G. M. (1995). Association of apolipoprotein E genotype with brain levels of apolipoprotein E and apolipoprotein J (clusterin) in Alzheimer disease. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 33(1), 174-178. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(95\)00097-c](https://doi.org/10.1016/0169-328x(95)00097-c)
- Bettens, K., Brouwers, N., Engelborghs, S., Lambert, J.-C., Rogaeve, E., Vandenberghe, R., Le Bastard, N., Pasquier, F., Vermeulen, S., Van Dongen, J., Matheijssens, M., Peeters, K., Mayeux, R., St George-Hyslop, P., Amouyel, P., De Deyn, P. P., Sleegers, K., & Van Broeckhoven, C. (2012). Both common variations and rare non-synonymous substitutions and small insertion/deletions in CLU are associated with increased Alzheimer risk. *Molecular Neurodegeneration*, 7, 3. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-3>
- Bettuzzi, S. (2009). Conclusions and Perspectives. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 105, p. 133-150). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(09\)05008-8](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(09)05008-8)
- Bettuzzi, S., Hiipakka, R. A., Gilna, P., & Liao, S. T. (1989). Identification of an androgen-repressed mRNA in rat ventral prostate as coding for sulphated glycoprotein 2 by cDNA cloning and sequence analysis. *Biochemical Journal*, 257(1), 293-296.
- Bettuzzi, S., & Rizzi, F. (2009). Chapter 5 Nuclear CLU (nCLU) and the Fate of the Cell. In *Advances in Cancer Research* (Vol. 104, p. 59-88). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(09\)04005-6](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(09)04005-6)
- Bi, J., Guo, A. L., Lai, Y. R., Li, B., Zhong, J. M., Wu, H. Q., Xie, Z., He, Y. L., Lv, Z. L., Lau, S. H., Wang, Q., Huang, X. H., Zhang, L. J., Wen, J. M., & Guan, X. Y. (2010). Overexpression of clusterin correlates with tumor progression, metastasis in gastric cancer : A study on tissue microarrays. *Neoplasma*, 57(3), 191-197. https://doi.org/10.4149/neo_2010_03_191

- Binder, R. J. (2014). Functions of Heat Shock Proteins in pathways of the innate and adaptive immune system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(12), 5765-5771. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401417>
- Birkenmeier, E. H., Letts, V. A., Frankel, W. N., Magenheimer, B. S., & Calvet, J. P. (1993). Sulfated glycoprotein-2 (Sgp-2) maps to mouse Chromosome 14. *Mammalian Genome*, 4(2), 131-132. <https://doi.org/10.1007/BF00290441>
- Blaschuk, O., Burdzy, K., & Fritz, I. B. (1983). Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *Journal of Biological Chemistry*, 258(12), 7714-7720.
- Bliksøen, M., Mariero, L. H., Ohm, I. K., Haugen, F., Yndestad, A., Solheim, S., Seljeflot, I., Ranheim, T., Andersen, G. Ø., Aukrust, P., Valen, G., & Vinge, L. E. (2012). Increased circulating mitochondrial DNA after myocardial infarction. *International Journal of Cardiology*, 158(1), 132-134. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.04.047>
- Bliksøen, M., Mariero, L. H., Torp, M. K., Baysa, A., Ytrehus, K., Haugen, F., Seljeflot, I., Vaage, J., Valen, G., & Stensløkken, K.-O. (2016). Extracellular mtDNA activates NF-κB via toll-like receptor 9 and induces cell death in cardiomyocytes. *Basic Research in Cardiology*, 111(4), 42. <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0553-6>
- Blumenstein, B., Saad, F., Hotte, S., Chi, K. N., Eigl, B., Gleave, M., & Jacobs, C. (2013). Reduction in serum clusterin is a potential therapeutic biomarker in patients with castration-resistant prostate cancer treated with custirsén. *Cancer Medicine*, 2(4), 468-477. <https://doi.org/10.1002/cam4.93>
- Bochaton, T., Lassus, J., Paccalet, A., Derimay, F., Rioufol, G., Prieur, C., Bonnefoy-Cudraz, E., Crola Da Silva, C., Bernelin, H., Amaz, C., Espanet, S., de Bourguignon, C., Dufay, N., Cartier, R., Croisille, P., Ovize, M., & Mewton, N. (2021). Association of myocardial hemorrhage and persistent microvascular obstruction with circulating inflammatory biomarkers in STEMI patients. *PLoS ONE*, 16(1), e0245684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245684>
- Bochaton, T., Leboube, S., Paccalet, A., Crola Da Silva, C., Buisson, M., Mewton, N., Amaz, C., Varillon, Y., Bonnefoy-Cudraz, E., Rioufol, G., Cho, T.-H., Ovize, M., Bidaux, G., Nighoghossian, N., & Mechtouff, L. (2022). Impact of Age on Systemic Inflammatory Profile of Patients With ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction and Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 53(7), 2249-2259. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.121.036806>
- Bochaton, T., Paccalet, A., Jeantet, P., Crola Da Silva, C., Cartier, R., Prieur, C., Jossan, C., Bonnefoy-Cudraz, E., Mewton, N., & Ovize, M. (2020). Heat Shock Protein 70 as a Biomarker of Clinical Outcomes After STEMI. *Journal of the American College of Cardiology*, 75(1), 122-124. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.10.044>
- Bönner, F., Borg, N., Burghoff, S., & Schrader, J. (2012). Resident Cardiac Immune Cells and Expression of the Ectonucleotidase Enzymes CD39 and CD73 after Ischemic Injury. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034730>
- Borisoff, J. I., Joosen, I. A., Versteyle, M. O., Brill, A., Fuchs, T. A., Savchenko, A. S., Gallant, M., Martinod, K., ten Cate, H., Hofstra, L., Crijns, H. J., Wagner, D. D., & Kietselaer, B. L. J. H. (2013). Elevated Levels of Circulating DNA and Chromatin Are Independently Associated with Severe Coronary Atherosclerosis and a Prothrombotic State. *Arteriosclerosis*,

thrombosis, and vascular biology, 33(8), 2032-2040.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301627>

Bosmann, M., Grailer, J. J., Ruemmler, R., Russkamp, N. F., Zetoune, F. S., Sarma, J. V., Standiford, T. J., & Ward, P. A. (2013). *The FASEB Journal*, 27(12), 5010-5021.
<https://doi.org/10.1096/fj.13-236380>

Boyd, J. H., Mathur, S., Wang, Y., Bateman, R. M., & Walley, K. R. (2006). Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF- κ B dependent inflammatory response. *Cardiovascular Research*, 72(3), 384-393.
<https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.09.011>

Bradley, D., Blaszczyk, A., Yin, Z., Liu, J., Joseph, J. J., Wright, V., Anandani, K., Needleman, B., Noria, S., Renton, D., Yearsley, M., Wong, S. T. C., & Hsueh, W. A. (2019). Clusterin Impairs Hepatic Insulin Sensitivity and Adipocyte Clusterin Associates With Cardiometabolic Risk. *Diabetes Care*, 42(3), 466-475. <https://doi.org/10.2337/dc18-0870>

Braik, N., Ecollan, P., & Montalescot, G. (2018). Prise en charge de l'infarctus du myocarde, nouveautés des Recommandation ESC 2017. *Journal Européen des Urgences et de Réanimation*, 30(1), 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.jeurea.2018.05.004>

Bratton, D. L., & Henson, P. M. (2011). Neutrophil clearance : When the party is over, clean-up begins. *Trends in Immunology*, 32(8), 350-357. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.009>

Braunwald, E., & Kloner, R. A. (1982). The stunned myocardium : Prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 66(6), 1146-1149.
<https://doi.org/10.1161/01.cir.66.6.1146>

Broere, F., van der Zee, R., & van Eden, W. (2011). Heat shock proteins are no DAMPs, rather « DAMPERs ». *Nature Reviews Immunology*, 11(8), 8. <https://doi.org/10.1038/nri2873-c1>

Bucciarelli, L. G., Kaneko, M., Ananthakrishnan, R., Harja, E., Lee, L. K., Hwang, Y. C., Lerner, S., Bakr, S., Li, Q., Lu, Y., Song, F., Qu, W., Gomez, T., Zou, Y. S., Yan, S. F., Schmidt, A. M., & Ramasamy, R. (2006). Receptor for Advanced-Glycation End Products. *Circulation*, 113(9), 1226-1234. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.575993>

Bujak, M., Dobaczewski, M., Chatila, K., Mendoza, L. H., Li, N., Reddy, A., & Frangogiannis, N. G. (2008). Interleukin-1 Receptor Type I Signaling Critically Regulates Infarct Healing and Cardiac Remodeling. *The American Journal of Pathology*, 173(1), 57-67.
<https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070974>

Bujak, M., & Frangogiannis, N. G. (2009). The role of Interleukin-1 in the pathogenesis of heart disease. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, 57(3), 165-176.
<https://doi.org/10.1007/s00005-009-0024-y>

Burkey, B. F., Stuart, W. D., & Harmony, J. A. (1992). Hepatic apolipoprotein J is secreted as a lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, 33(10), 1517-1526.

Bustin, M., A. Lehn, D., & Landsman, D. (1990). Structural features of the HMG chromosomal proteins and their genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1049(3), 231-243. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(90\)90092-G](https://doi.org/10.1016/0167-4781(90)90092-G)

- Bustin, M., & Reeves, R. (1996). High-Mobility-Group Chromosomal Proteins : Architectural Components That Facilitate Chromatin Function. In W. E. Cohn & K. Moldave (Éds.), *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* (Vol. 54, p. 35-100b). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60360-8](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60360-8)
- Buttayan, R., Olsson, C. A., Pintar, J., Chang, C., Bandyk, M., Ng, P. Y., & Sawczuk, I. S. (1989). Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death. *Molecular and Cellular Biology*, 9(8), 3473-3481.
- Cabrera-Fuentes, H. A., Niemann, B., Grieshaber, P., Wollbrueck, M., Gehron, J., Preissner, K. T., & Böning, A. (2015). RNase1 as a potential mediator of remote ischaemic preconditioning for cardioprotection†. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*, 48(5), 732-737; discussion 737. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezu519>
- Cabrera-Fuentes, H. A., Ruiz-Meana, M., Simsekylmaz, S., Kostin, S., Inserte, J., Saffarzadeh, M., Galuska, S. P., Vijayan, V., Barba, I., Barreto, G., Fischer, S., Lochnit, G., Ilinskaya, O. N., Baumgart-Vogt, E., Böning, A., Lecour, S., Hausenloy, D. J., Liehn, E. A., Garcia-Dorado, D., ... Preissner, K. T. (2014). RNase1 prevents the damaging interplay between extracellular RNA and tumour necrosis factor- α in cardiac ischaemia/reperfusion injury. *Thrombosis and Haemostasis*, 112(6), 1110-1119. <https://doi.org/10.1160/TH14-08-0703>
- Calero, M., Rostagno, A., Matsubara, E., Zlokovic, B., Frangione, B., & Ghiso, J. (2000). Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease. *Microscopy Research and Technique*, 50(4), 305-315. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20000815\)50:4<305::AID-JEMT10>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20000815)50:4<305::AID-JEMT10>3.0.CO;2-L)
- Cao, J. Y., & Dixon, S. J. (2016). Mechanisms of ferroptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 2195-2209. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2194-1>
- Capsule outil : L'apoptose, ou la mort cellulaire programmée.* (s. d.). Consulté 13 janvier 2022, à l'adresse https://lecerveau.mcgill.ca/flash/capsules/outil_bleu17.html
- Cavassani, K. A., Ishii, M., Wen, H., Schaller, M. A., Lincoln, P. M., Lukacs, N. W., Hogaboam, C. M., & Kunkel, S. L. (2008). TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(11), 2609-2621. <https://doi.org/10.1084/jem.20081370>
- Chen, C., Feng, Y., Zou, L., Wang, L., Chen, H. H., Cai, J., Xu, J., Sosnovik, D. E., & Chao, W. (2014). Role of Extracellular RNA and TLR3-Trif Signaling in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 3(1), e000683. <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000683>
- Chen, G. Y., & Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation : Sensing and reacting to damage. *Nature reviews. Immunology*, 10(12), 826-837. <https://doi.org/10.1038/nri2873>
- Chen, H. H., Yuan, H., Cho, H., Feng, Y., Ngoy, S., Kumar, A. T. N., Liao, R., Chao, W., Josephson, L., & Sosnovik, D. E. (2017). Theranostic Nucleic Acid Binding Nanoprobe Exerts Anti-inflammatory and Cytoprotective Effects in Ischemic Injury. *Theranostics*, 7(4), 814-825. <https://doi.org/10.7150/thno.17366>

- Chen, R., Kang, R., Fan, X.-G., & Tang, D. (2014). Release and activity of histone in diseases. *Cell Death & Disease*, 5(8), e1370-e1370. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.337>
- Chien, G. L., Wolff, R. A., Davis, R. F., & Winkle, D. M. V. (1994). « Normothermic range » temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovascular Research*, 28(7), 1014-1017. <https://doi.org/10.1093/cvr/28.7.1014>
- Choi, N.-H., Nakano, Y., Tobe, T., Mazda, T., & Tomita, M. (1990). Incorporation of SP-40,40 into the soluble membrane attack complex (SMAC, SC5b-9) of complement. *International Immunology*, 2(5), 413-417. <https://doi.org/10.1093/intimm/2.5.413>
- Choi-Miura, N. H., Takahashi, Y., Nakano, Y., Tobe, T., & Tomita, M. (1992). Identification of the Disulfide Bonds in Human Plasma Protein SP-40,40 (Apolipoprotein-J)1. *The Journal of Biochemistry*, 112(4), 557-561. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123938>
- Chong, A. J., Shimamoto, A., Hampton, C. R., Takayama, H., Spring, D. J., Rothnie, C. L., Yada, M., Pohlman, T. H., & Verrier, E. D. (2004). Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 128(2), 170-179. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2003.11.036>
- Chorawala, M. R., Prakash, P., Doddapattar, P., Jain, M., Dhanesha, N., & Chauhan, A. K. (2018). Deletion of extra domain A of fibronectin reduces acute myocardial ischemia/reperfusion injury in hyperlipidemic mice by limiting thrombo-inflammation. *Thrombosis and haemostasis*, 118(8), 1450-1460. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1661353>
- Cochrane, D. R., Wang, Z., Muramaki, M., Gleave, M. E., & Nelson, C. C. (2007). Differential regulation of clusterin and its isoforms by androgens in prostate cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(4), 2278-2287. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608162200>
- Collino, M., Massimo, C., Pini, A., Alessandro, P., Mastroianni, R., Rosanna, M., Benetti, E., Elisa, B., Lanzi, C., Cecilia, L., Bani, D., Daniele, B., Jacopo, C., Manoni, M., Marco, M., Fantozzi, R., Roberto, F., Masini, E., & Emanuela, M. (2012). The non-anticoagulant heparin-like K5 polysaccharide derivative K5-N,OSepi attenuates myocardial ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(9), 2196-2207. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01530.x>
- Constantinescu, P., Brown, R. A., Wyatt, A. R., Ranson, M., & Wilson, M. R. (2017). Amorphous protein aggregates stimulate plasminogen activation, leading to release of cytotoxic fragments that are clients for extracellular chaperones. *The Journal of Biological Chemistry*, 292(35), 14425-14437. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.786657>
- Cour, M., & Argaud, L. (2010). Ischémie-reperfusion et protection cellulaire. *Réanimation*, 19(2), 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2010.01.008>
- Courties, G., Heidt, T., Sebas, M., Iwamoto, Y., Jeon, D., Truelove, J., Tricot, B., Wojtkiewicz, G., Dutta, P., Sager, H. B., Borodovsky, A., Novobrantseva, T., Klebanov, B., Fitzgerald, K., Anderson, D. G., Libby, P., Swirski, F. K., Weissleder, R., & Nahrendorf, M. (2014). In vivo silencing of the transcription factor IRF5 reprograms the macrophage phenotype and improves infarct healing. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(15), 1556-1566. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.11.023>

- Cubedo, J., Padró, T., García-Moll, X., Pintó, X., Cinca, J., & Badimon, L. (2011). Proteomic Signature of Apolipoprotein J in the Early Phase of New-Onset Myocardial Infarction. *Journal of Proteome Research*, *10*(1), 211-220. <https://doi.org/10.1021/pr100805h>
- Cubedo, J., Padró, T., Vilahur, G., Crea, F., Storey, R. F., Lopez Sendon, J. L., Kaski, J. C., Sionis, A., Sans-Rosello, J., Fernández-Peregrina, E., Gallinat, A., & Badimon, L. (2022). Glycosylated apolipoprotein J in cardiac ischaemia: Molecular processing and circulating levels in patients with acute ischaemic events. *European Heart Journal*, *43*(2), 153-163. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab691>
- Cui, Z., Sharma, R., & Agarwal, A. (2016). Proteomic analysis of mature and immature ejaculated spermatozoa from fertile men. *Asian Journal of Andrology*, *18*(5), 735-746. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.164924>
- Cung, T.-T., Morel, O., Cayla, G., Rioufol, G., Garcia-Dorado, D., Angoulvant, D., Bonnefoy-Cudraz, E., Guérin, P., Elbaz, M., Delarche, N., Coste, P., Vanzetto, G., Metge, M., Aupetit, J.-F., Jouve, B., Motreff, P., Tron, C., Labeque, J.-N., Steg, P. G., ... Ovize, M. (2015, septembre 9). *Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction (world)* [Research-article]. <Http://Dx.Doi.Org.Proxy.Insermbiblio.Inist.Fr/10.1056/NEJMoa1505489>; Massachusetts Medical Society. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1505489>
- Cunin, P., Beauvillain, C., Miot, C., Augusto, J.-F., Preisser, L., Blanchard, S., Pignon, P., Scotet, M., Garo, E., Fremaux, I., Chevailler, A., Subra, J.-F., Blanco, P., Wilson, M. R., Jeannin, P., & Delneste, Y. (2016). Clusterin facilitates apoptotic cell clearance and prevents apoptotic cell-induced autoimmune responses. *Cell Death & Disease*, *7*, e2215. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.113>
- Daigo, K., Nakakido, M., Ohashi, R., Fukuda, R., Matsubara, K., Minami, T., Yamaguchi, N., Inoue, K., Jiang, S., Naito, M., Tsumoto, K., & Hamakubo, T. (2014). Protective effect of the long pentraxin PTX3 against histone-mediated endothelial cell cytotoxicity in sepsis. *Science Signaling*, *7*(343), ra88. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005522>
- Daugan, M., Noe, R., Herman Fridman, W., Sautes-Fridman, C., & Roumenina, L. T. (2017). [The complement system: A double edge sword in tumor progression]. *Medecine Sciences: M/S*, *33*(10), 871-877. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173310019>
- Davidson, S. M., Ferdinandy, P., Andreadou, I., Bøtker, H. E., Heusch, G., Ibáñez, B., Ovize, M., Schulz, R., Yellon, D. M., Hausenloy, D. J., & Garcia-Dorado, D. (2019). Multitarget Strategies to Reduce Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of the American College of Cardiology*, *73*(1), 89-99. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.09.086>
- de Graaf, R., Kloppenburg, G., Kitslaar, P. J. H. M., Bruggeman, C. A., & Stassen, F. (2006). Human heat shock protein 60 stimulates vascular smooth muscle cell proliferation through Toll-like receptors 2 and 4. *Microbes and Infection*, *8*(7), 1859-1865. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.02.024>
- de Haan, J. J., Smeets, M. B., Pasterkamp, G., & Arslan, F. (2013). Danger signals in the initiation of the inflammatory response after myocardial infarction. *Mediators of Inflammation*, *2013*, 206039. <https://doi.org/10.1155/2013/206039>
- de Kleijn, D. P. V., Chong, S. Y., Wang, X., Yatim, S. M. J. M., Fairhurst, A.-M., Vernooij, F., Zharkova, O., Chan, M. Y., Foo, R. S. Y., Timmers, L., Lam, C. S. P., & Wang, J.-W. (2019).

- Toll-like receptor 7 deficiency promotes survival and reduces adverse left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 115(12), 1791-1803. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz057>
- De Meyer, S. F., Suidan, G. L., Fuchs, T. A., Monestier, M., & Wagner, D. D. (2012). Extracellular chromatin is an important mediator of ischemic stroke in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(8), 1884-1891. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.112.250993>
- De Miguel, Z., Khoury, N., Betley, M. J., Lehallier, B., Willoughby, D., Olsson, N., Yang, A. C., Hahn, O., Lu, N., Vest, R. T., Bonanno, L. N., Yerra, L., Zhang, L., Saw, N. L., Fairchild, J. K., Lee, D., Zhang, H., McAlpine, P. L., Contrepois, K., ... Wyss-Coray, T. (2021). Exercise plasma boosts memory and dampens brain inflammation via clusterin. *Nature*, 600(7889), 494-499. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04183-x>
- de Silva, H. V., Harmony, J. A., Stuart, W. D., Gil, C. M., & Robbins, J. (1990). Apolipoprotein J: Structure and tissue distribution. *Biochemistry*, 29(22), 5380-5389. <https://doi.org/10.1021/bi00474a025>
- Deb, M., Sengupta, D., Rath, S. K., Kar, S., Parbin, S., Shilpi, A., Pradhan, N., Bhutia, S. K., Roy, S., & Patra, S. K. (2015). Clusterin gene is predominantly regulated by histone modifications in human colon cancer and ectopic expression of the nuclear isoform induces cell death. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1852(8), 1630-1645. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.04.021>
- Del Re, D. P., Amgalan, D., Linkermann, A., Liu, Q., & Kitsis, R. N. (2019). Fundamental Mechanisms of Regulated Cell Death and Implications for Heart Disease. *Physiological Reviews*, 99(4), 1765-1817. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2018>
- DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Parsadanian, M., May, P. C., O'Dell, M. A., Taylor, J. W., Harmony, J. A. K., Aronow, B. J., Bales, K. R., Paul, S. M., & Holtzman, D. M. (2004). ApoE and clusterin cooperatively suppress Abeta levels and deposition: Evidence that ApoE regulates extracellular Abeta metabolism in vivo. *Neuron*, 41(2), 193-202. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00850-x](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00850-x)
- DeMattos, R. B., O'dell, M. A., Parsadanian, M., Taylor, J. W., Harmony, J. A. K., Bales, K. R., Paul, S. M., Aronow, B. J., & Holtzman, D. M. (2002). Clusterin promotes amyloid plaque formation and is critical for neuritic toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10843-10848. <https://doi.org/10.1073/pnas.162228299>
- Dewald, O., Zymek, P., Winkelmann, K., Koerting, A., Ren, G., Abou-Khamis, T., Michael, L. H., Rollins, B. J., Entman, M. L., & Frangogiannis, N. G. (2005). CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. *Circulation Research*, 96(8), 881-889. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000163017.13772.3a>
- Di Napoli, M., Elkind, M. S., Godoy, D. A., Singh, P., Papa, F., & Popa-Wagner, A. (2011). Role of C-reactive protein in cerebrovascular disease: A critical review. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 9(12), 1565-1584. <https://doi.org/10.1586/erc.11.159>

- Dijk, A. V., Vermond, R. A., Krijnen, P. A. J., Juffermans, L. J. M., Hahn, N. E., Makker, S. P., Aarden, L. A., Hack, E., Spreuwenberg, M., Rossum, B. C. van, Meischl, C., Paulus, W. J., Milligen, F. J. V., & Niessen, H. W. M. (2010). Intravenous clusterin administration reduces myocardial infarct size in rats. *European Journal of Clinical Investigation*, *40*(10), 893-902. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2010.02345.x>
- Ding, H.-S., Yang, J., Chen, P., Yang, J., Bo, S.-Q., Ding, J.-W., & Yu, Q.-Q. (2013). The HMGB1–TLR4 axis contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury via regulation of cardiomyocyte apoptosis. *Gene*, *527*(1), 389-393. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.05.041>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis : An Iron-Dependent Form of Non-Apoptotic Cell Death. *Cell*, *149*(5), 1060-1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Dutta, P., Courties, G., Wei, Y., Leuschner, F., Gorbatov, R., Robbins, C. S., Iwamoto, Y., Thompson, B., Carlson, A. L., Heidt, T., Majmudar, M. D., Lasitschka, F., Eitzrodt, M., Waterman, P., Waring, M. T., Chicoine, A. T., van der Laan, A. M., Niessen, H. W. M., Piek, J. J., ... Nahrendorf, M. (2012). Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature*, *487*(7407), 325-329. <https://doi.org/10.1038/nature11260>
- E. Rosenberg, M., & Silkensen, J. (1995). Clusterin: Physiologic and pathophysiologic considerations. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *27*(7), 633-645. [https://doi.org/10.1016/1357-2725\(95\)00027-M](https://doi.org/10.1016/1357-2725(95)00027-M)
- Egaña-Gorroño, L., López-Díez, R., Yepuri, G., Ramirez, L. S., Reverdatto, S., Gugger, P. F., Shekhtman, A., Ramasamy, R., & Schmidt, A. M. (2020). Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Mechanisms and Therapeutic Opportunities in Diabetes and Cardiovascular Disease : Insights From Human Subjects and Animal Models. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, *7*, 37. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00037>
- Ekane, M. L., Otto, G. P., Sossdorf, M., Sponholz, C., Boehringer, M., Loesche, W., Rittirsch, D., Wilharm, A., Kurzai, O., Bauer, M., & Claus, R. A. (2014). Impact of plasma histones in human sepsis and their contribution to cellular injury and inflammation. *Critical Care (London, England)*, *18*(5), 543. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0543-8>
- El-Zayat, S. R., Sibaii, H., & Mannaa, F. A. (2019). Toll-like receptors activation, signaling, and targeting : An overview. *Bulletin of the National Research Centre*, *43*(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>
- Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Pennells, L., Wood, A. M., White, I. R., Gao, P., Walker, M., Thompson, A., Sarwar, N., Caslake, M., Butterworth, A. S., Amouyel, P., Assmann, G., Bakker, S. J. L., Barr, E. L. M., Barrett-Connor, E., Benjamin, E. J., Björkelund, C., ... Danesh, J. (2012). C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction. *The New England Journal of Medicine*, *367*(14), 1310-1320. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1107477>
- Empana, J.-P., Jouven, X., Canoui-Poitrine, F., Luc, G., Tafflet, M., Haas, B., Arveiler, D., Ferrieres, J., Ruidavets, J.-B., Montaye, M., Yarnell, J., Morange, P., Kee, F., Evans, A., Amouyel, P., & Ducimetiere, P. (2010). C-Reactive Protein, Interleukin 6, Fibrinogen and Risk of Sudden Death in European Middle-Aged Men : The PRIME Study. *Arteriosclerosis*,

Thrombosis, and Vascular Biology, 30(10), 2047-2052.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.208785>

Engstrøm, T., Kelbæk, H., Helqvist, S., Høfsten, D. E., Kløvgaard, L., Clemmensen, P., Holmvang, L., Jørgensen, E., Pedersen, F., Saunamaki, K., Ravkilde, J., Tilsted, H.-H., Villadsen, A., Aarøe, J., Jensen, S. E., Raungaard, B., Bøtker, H. E., Terkelsen, C. J., Maeng, M., ... Køber, L. (2017). *JAMA Cardiology*, 2(5), 490-497.
<https://doi.org/10.1001/jamacardio.2017.0022>

Essabbani, A., Garcia, L., Zonetti, M. J., Fisco, T., Pucci, S., & Chiocchia, G. (2013). Exon-Skipping Strategy by Ratio Modulation between Cytoprotective versus Pro-Apoptotic Clusterin Forms Increased Sensitivity of LNCaP to Cell Death. *PLoS ONE*, 8(2), e54920.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054920>

F, K., H, K., Me, H., R, J., Aj, Z., Zq, Z., Ra, G., & J, V.-J. (2005, septembre). *Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors.* Basic Research in Cardiology; Basic Res Cardiol. <https://doi.org/10.1007/s00395-005-0539-2>

Fan, G.-C., Ren, X., Qian, J., Yuan, Q., Nicolaou, P., Wang, Y., Jones, W. K., Chu, G., & Kranias, E. G. (2005). Novel cardioprotective role of a small heat-shock protein, Hsp20, against ischemia/reperfusion injury. *Circulation*, 111(14), 1792-1799.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000160851.41872.C6>

Fang, X., Wang, H., Han, D., Xie, E., Yang, X., Wei, J., Gu, S., Gao, F., Zhu, N., Yin, X., Cheng, Q., Zhang, P., Dai, W., Chen, J., Yang, F., Yang, H.-T., Linkermann, A., Gu, W., Min, J., & Wang, F. (2019). Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(7), 2672-2680. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821022116>

Fattahi, F., Russell, M. W., Malan, E. A., Parlett, M., Abe, E., Zetoune, F. S., & Ward, P. A. (2018). Harmful Roles of TLR3 and TLR9 in Cardiac Dysfunction Developing during Polymicrobial Sepsis. *BioMed Research International*, 2018, 4302726.
<https://doi.org/10.1155/2018/4302726>

Favre Julie, Musette Philippe, Douin-Echinard Victorine, Laude Karine, Henry Jean-Paul, Arnal Jean-François, Thuillez Christian, & Richard Vincent. (2007). Toll-Like Receptors 2-Deficient Mice Are Protected Against Postischemic Coronary Endothelial Dysfunction. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(5), 1064-1071.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.140723>

Feng, Y., & Chao, W. (2011). Toll-Like Receptors and Myocardial Inflammation. *International Journal of Inflammation*, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/170352>

Feng, Y., Chen, H., Cai, J., Zou, L., Yan, D., Xu, G., Li, D., & Chao, W. (2015). Cardiac RNA Induces Inflammatory Responses in Cardiomyocytes and Immune Cells via Toll-like Receptor 7 Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(44), 26688-26698.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.661835>

Fischer, P., & Hilfiker-Kleiner, D. (2008). Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects. *British Journal of Pharmacology*, 153(Suppl 1), S414-S427. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.1>

- Flanagan, L., Whyte, L., Chatterjee, N., & Tenniswood, M. (2010). Effects of clusterin over-expression on metastatic progression and therapy in breast cancer. *BMC Cancer*, *10*, 107. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-107>
- Foglio, E., Puddighinu, G., Fasanaro, P., D'Arcangelo, D., Perrone, G. A., Mocini, D., Campanella, C., Coppola, L., Logozzi, M., Azzarito, T., Marzoli, F., Fais, S., Pieroni, L., Marzano, V., Germani, A., Capogrossi, M. C., Russo, M. A., & Limana, F. (2015). Exosomal clusterin, identified in the pericardial fluid, improves myocardial performance following MI through epicardial activation, enhanced arteriogenesis and reduced apoptosis. *International Journal of Cardiology*, *197*, 333-347. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2015.06.008>
- Foster, E. M., Dangla-Valls, A., Lovestone, S., Ribe, E. M., & Buckley, N. J. (2019). Clusterin in Alzheimer's Disease: Mechanisms, Genetics, and Lessons From Other Pathologies. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 164. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00164>
- Frangogiannis, N. G. (2012). Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circulation Research*, *110*(1), 159-173. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243162>
- Frangogiannis, N. G. (2014). The immune system and the remodeling infarcted heart: Cell biological insights and therapeutic opportunities. *Journal of cardiovascular pharmacology*, *63*(3), 185-195. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000003>
- Frangogiannis, N. G. (2015). Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Comprehensive Physiology*, *5*(4), 1841-1875. <https://doi.org/10.1002/cphy.c150006>
- Frangogiannis, N. G., Lindsey, M. L., Michael, L. H., Youker, K. A., Bressler, R. B., Mendoza, L. H., Spengler, R. N., Smith, C. W., & Entman, M. L. (1998). Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation*, *98*(7), 699-710. <https://doi.org/10.1161/01.cir.98.7.699>
- Frangogiannis, N. G., Mendoza, L. H., Lindsey, M. L., Ballantyne, C. M., Michael, L. H., Smith, C. W., & Entman, M. L. (2000). IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *165*(5), 2798-2808. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2798>
- Fritz, I. B., Burdzy, K., Sétchell, B., & Blaschuk, O. (1983). Ram Rete Testis Fluid Contains a Protein (Clusterin) Which Influences Cell-Cell Interactions in Vitro1. *Biology of Reproduction*, *28*(5), 1173-1188. <https://doi.org/10.1095/biolreprod28.5.1173>
- Fritz, I. B., & Murphy, B. (1993). Clusterin Insights into a multifunctional protein. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *4*(2), 41-45. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(05\)80013-x](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(05)80013-x)
- Fuchs, M., Hilfiker, A., Kaminski, K., Hilfiker-Kleiner, D., Guener, Z., Klein, G., Podewski, E., Schieffer, B., Rose-John, S., & Drexler, H. (2003). Role of interleukin-6 for left ventricular remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *The FASEB Journal*, *17*(14), 1-20. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0331fje>
- Fuchs, T. A., Bhandari, A. A., & Wagner, D. D. (2011). Histones induce rapid and profound thrombocytopenia in mice. *Blood*, *118*(13), 3708-3714. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332676>

- Fukuda, T., Miyake, H., Enatsu, N., Matsushita, K., & Fujisawa, M. (2016). Seminal level of clusterin in infertile men as a significant biomarker reflecting spermatogenesis. *Andrologia*, 48(10), 1188-1194. <https://doi.org/10.1111/and.12558>
- Gao, H., Yin, J., Shi, Y., Hu, H., Li, X., Xue, M., Cheng, W., Wang, Y., Li, X., Li, Y., Wang, Y., & Yan, S. (2017). Targeted P2X7R shRNA delivery attenuates sympathetic nerve sprouting and ameliorates cardiac dysfunction in rats with myocardial infarction. *Cardiovascular Therapeutics*, 35(2), e12245. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12245>
- Gao, M., Monian, P., Quadri, N., Ramasamy, R., & Jiang, X. (2015). Glutaminolysis and Transferrin Regulate Ferroptosis. *Molecular Cell*, 59(2), 298-308. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.011>
- Garlanda, C., Bottazzi, B., Bastone, A., & Mantovani, A. (2005). Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annual Review of Immunology*, 23, 337-366. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115756>
- Gelissen, I. C., Hochgrebe, T., Wilson, M. R., Easterbrook-Smith, S. B., Jessup, W., Dean, R. T., & Brown, A. J. (1998). Apolipoprotein J (clusterin) induces cholesterol export from macrophage-foam cells : A potential anti-atherogenic function? *Biochemical Journal*, 331(Pt 1), 231-237.
- Gershov, D., Kim, S., Brot, N., & Elkon, K. B. (2000). C-Reactive Protein Binds to Apoptotic Cells, Protects the Cells from Assembly of the Terminal Complement Components, and Sustains an Antiinflammatory Innate Immune Response: Implications for Systemic Autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*, 192(9), 1353-1364. <https://doi.org/10.1084/jem.192.9.1353>
- Ghiso, J., Matsubara, E., Koudinov, A., Choi-Miura, N. H., Tomita, M., Wisniewski, T., & Frangione, B. (1993). The cerebrospinal-fluid soluble form of Alzheimer's amyloid beta is complexed to SP-40,40 (apolipoprotein J), an inhibitor of the complement membrane-attack complex. *Biochemical Journal*, 293(Pt 1), 27-30.
- Gho, B. C. G., Schoemaker, R. G., van den Doel, M. A., Duncker, D. J., & Verdouw, P. D. (1996). Myocardial Protection by Brief Ischemia in Noncardiac Tissue. *Circulation*, 94(9), 2193-2200. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.9.2193>
- Ginks, W. R., Sybers, H. D., Maroko, P. R., Covell, J. W., Sobel, B. E., & Ross, J. (1972). Coronary Artery Reperfusion. *Journal of Clinical Investigation*, 51(10), 2717-2723.
- Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017 : A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. (2018). *Lancet (London, England)*, 392(10159), 1736-1788. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32203-7)
- Goldstein, R. S., Gallowitsch-Puerta, M., Yang, L., Rosas-Ballina, M., Huston, J. M., Czura, C. J., Lee, D. C., Ward, M. F., Bruchfeld, A. N., Wang, H., Lesser, M. L., Church, A. L., Litroff, A. H., Sama, A. E., & Tracey, K. J. (2006). ELEVATED HIGH-MOBILITY GROUP BOX 1 LEVELS IN PATIENTS WITH CEREBRAL AND MYOCARDIAL ISCHEMIA. *Shock*, 25(6), 571–574. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000209540.99176.72>

- Gomez, L., Paillard, M., Thibault, H., Derumeaux, G., & Ovize, M. (2008). Inhibition of GSK3 β by Postconditioning Is Required to Prevent Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore During Reperfusion. *Circulation*, *117*(21), 2761-2768. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.755066>
- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature Reviews Immunology*, *20*(2), 95-112. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0215-7>
- Goodwin, G. H., Sanders, C., & Johns, E. W. (1973). A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *European Journal of Biochemistry*, *38*(1), 14-19. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb03026.x>
- Gottlieb, R. A., Burleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M., & Engler, R. L. (1994). Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation*, *94*(4), 1621-1628.
- Griffiths, G. S., Galileo, D. S., Aravindan, R. G., & Martin-DeLeon, P. A. (2009). Clusterin Facilitates Exchange of Glycosyl Phosphatidylinositol-Linked SPAM1 Between Reproductive Luminal Fluids and Mouse and Human Sperm Membranes. *Biology of Reproduction*, *81*(3), 562-570. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.075739>
- Guerra Martinez, C. (2019). P2X7 receptor in cardiovascular disease : The heart side. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *46*(6), 513-526. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13079>
- Gunata, M., & Parlakpınar, H. (2021). A review of myocardial ischaemia/reperfusion injury : Pathophysiology, experimental models, biomarkers, genetics and pharmacological treatment. *Cell Biochemistry and Function*, *39*(2), 190-217. <https://doi.org/10.1002/cbf.3587>
- Guo, J., Guan, Q., Liu, X., Wang, H., Gleave, M. E., Nguan, C. Y. C., & Du, C. (2016). Relationship of clusterin with renal inflammation and fibrosis after the recovery phase of ischemia-reperfusion injury. *BMC Nephrology*, *17*(1), 133. <https://doi.org/10.1186/s12882-016-0348-x>
- Guo, W., Ma, X., Xue, C., Luo, J., Zhu, X., Xiang, J., Lu, B., & Li, H. (2014). Serum clusterin as a tumor marker and prognostic factor for patients with esophageal cancer. *Disease Markers*, *2014*, 168960. <https://doi.org/10.1155/2014/168960>
- Gustafsson, Å. B., & Gottlieb, R. A. (2009). Autophagy in Ischemic Heart Disease. *Circulation research*, *104*(2), 150-158. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.187427>
- Gwechenberger, M., Mendoza, L. H., Youker, K. A., Frangogiannis, N. G., Smith, C. W., Michael, L. H., & Entman, M. L. (1999). Cardiac Myocytes Produce Interleukin-6 in Culture and in Viable Border Zone of Reperfused Infarctions. *Circulation*, *99*(4), 546-551. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.99.4.546>
- Hahn, J.-Y., Song, Y. B., Kim, E. K., Yu, C. W., Bae, J.-W., Chung, W.-Y., Choi, S.-H., Choi, J.-H., Bae, J.-H., An, K. J., Park, J.-S., Oh, J. H., Kim, S.-W., Hwang, J.-Y., Ryu, J. K., Park, H. S., Lim, D.-S., & Gwon, H.-C. (2013). Ischemic Postconditioning During Primary Percutaneous Coronary Intervention : The Effects of Postconditioning on Myocardial Reperfusion in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (POST)

Randomized Trial. *Circulation*, 128(17), 1889-1896.
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001690>

Halade, G. V. (2013). *Targeting Resolution of Inflammation Following Myocardial Infarction*. 3.

Hall, G., Hasday, J. D., & Rogers, T. B. (2006). Regulating the regulator : NF-kappaB signaling in heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 41(4), 580-591.
<https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2006.07.006>

Hanlon, P. R., Fu, P., Wright, G. L., Steenbergen, C., Arcasoy, M. O., & Murphy, E. (2005). Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury : Role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *The FASEB Journal*, 19(10), 1323-1325. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3545fje>

Harel-Adar, T., Mordechai, T. B., Amsalem, Y., Feinberg, M. S., Leor, J., & Cohen, S. (2011). Modulation of cardiac macrophages by phosphatidylserine-presenting liposomes improves infarct repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(5), 1827-1832. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015623108>

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M. L., Pahwa, J. S., Moskvina, V., Dowzell, K., Williams, A., Jones, N., Thomas, C., Stretton, A., Morgan, A. R., Lovestone, S., Powell, J., Proitsi, P., Lupton, M. K., Brayne, C., ... Williams, J. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 41(10), 1088-1093. <https://doi.org/10.1038/ng.440>

Hartman, M. H. T., Vreeswijk-Baudoin, I., Groot, H. E., van de Kolk, K. W. A., de Boer, R. A., Mateo Leach, I., Vliegthart, R., Sillje, H. H. W., & van der Harst, P. (2016). Inhibition of Interleukin-6 Receptor in a Murine Model of Myocardial Ischemia-Reperfusion. *PLoS ONE*, 11(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167195>

Hartmann, K., Rauch, J., Urban, J., Parczyk, K., Diel, P., Pilarsky, C., Appel, D., Haase, W., Mann, K., & Weller, A. (1991). Molecular cloning of gp 80, a glycoprotein complex secreted by kidney cells in vitro and in vivo. A link to the reproductive system and to the complement cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 266(15), 9924-9931.

Hassan, M. K., Watari, H., Christenson, L., Bettuzzi, S., & Sakuragi, N. (2011). Intracellular clusterin negatively regulates ovarian chemoresistance : Compromised expression sensitizes ovarian cancer cells to paclitaxel. *Tumor Biology*, 32(5), 1031. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0207-0>

Hausenloy, D. J., Kharbanda, R. K., Møller, U. K., Ramlall, M., Aarøe, J., Butler, R., Bulluck, H., Clayton, T., Dana, A., Dodd, M., Engstrom, T., Evans, R., Lassen, J. F., Christensen, E. F., Garcia-Ruiz, J. M., Gorog, D. A., Hjort, J., Houghton, R. F., Ibanez, B., ... CONDI-2/ERIC-PPCI Investigators. (2019). Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI) : A single-blind randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 394(10207), 1415-1424. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32039-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32039-2)

Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2009). Preconditioning and postconditioning : Underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis*, 204(2), 334-341. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.10.029>

- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: A neglected therapeutic target. *The Journal of Clinical Investigation*, *123*(1), 92-100. <https://doi.org/10.1172/JCI62874>
- Haworth, R. A., & Hunter, D. R. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria: II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *195*(2), 460-467. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90372-2](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90372-2)
- Heeschen, C., Hamm, C. W., Bruemmer, J., & Simoons, M. L. (2000). Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: A comparative analysis. CAPTURE Investigators. Chimeric c7E3 AntiPlatelet Therapy in Unstable angina REfractory to standard treatment trial. *Journal of the American College of Cardiology*, *35*(6), 1535-1542. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(00\)00581-7](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(00)00581-7)
- Helseth, R., Solheim, S., Arnesen, H., Seljeflot, I., & Opstad, T. B. (2016). The Time Course of Markers of Neutrophil Extracellular Traps in Patients Undergoing Revascularisation for Acute Myocardial Infarction or Stable Angina Pectoris. *Mediators of Inflammation*, *2016*, 2182358. <https://doi.org/10.1155/2016/2182358>
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, *407*(6805), 6805. <https://doi.org/10.1038/35037710>
- Heusch, G. (2017). Critical Issues for the Translation of Cardioprotection. *Circulation Research*, *120*(9), 1477-1486. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.310820>
- Heusch, G. (2020). Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective. *Nature Reviews. Cardiology*, *17*(12), 773-789. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0403-y>
- Heusch, G., & Gersh, B. J. (2017). The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: A continual challenge. *European Heart Journal*, *38*(11), 774-784. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw224>
- Heusch Gerd. (2015). Molecular Basis of Cardioprotection. *Circulation Research*, *116*(4), 674-699. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305348>
- Heyndrickx, G. R., Millard, R. W., McRitchie, R. J., Maroko, P. R., & Vatner, S. F. (1975). Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *Journal of Clinical Investigation*, *56*(4), 978-985.
- Holdenrieder, S., Stieber, P., Bodenmüller, H., Busch, M., Von Pawel, J., Schalhorn, A., Nagel, D., & Seidel, D. (2001). Circulating Nucleosomes in Serum. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *945*(1), 93-102. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03869.x>
- Hollander, Z., Lazárová, M., Lam, K. K. Y., Ignaszewski, A., Oudit, G. Y., Dyck, J. R. B., Schreiner, G., Pauwels, J., Chen, V., Cohen Freue, G. V., Ng, R. T., Wilson-McManus, J. E., Balshaw, R., Tebbutt, S. J., McMaster, R. W., Keown, P. A., McManus, B. M., & Excellence, for the N. C. P. P. of O. F. (PROOF) C. of. (2014). Proteomic biomarkers of recovered heart function. *European Journal of Heart Failure*, *16*(5), 551-559. <https://doi.org/10.1002/ejhf.65>
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.-L., Schneider, P., Seed, B., & Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-

independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*, 1(6), 6. <https://doi.org/10.1038/82732>

Hout, G. P. van, Arslan, F., Pasterkamp, G., & Hoefler, I. E. (2016). Targeting danger-associated molecular patterns after myocardial infarction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 20(2), 223-239. <https://doi.org/10.1517/14728222.2016.1088005>

Hu, G., Zhang, Y., Jiang, H., & Hu, X. (2013). Exendin-4 attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein expression. *Cardiology Journal*, 20(6), 600-604. <https://doi.org/10.5603/CJ.2013.0159>

Huang, H., Chen, H.-W., Evankovich, J., Yan, W., Rosborough, B. R., Nace, G. W., Ding, Q., Loughran, P., Beer-Stolz, D., Billiar, T. R., Esmon, C. T., & Tsung, A. (2013). Histones activate the NLRP3 Inflammasome in Kupffer Cells during Sterile Inflammatory Liver Injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(5), 2665-2679. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202733>

Huang, H., Evankovich, J., Yan, W., Nace, G., Zhang, L., Ross, M., Liao, X., Billiar, T., Xu, J., Esmon, C. T., & Tsung, A. (2011). Endogenous Histones Function as Alarmins in Sterile Inflammatory Liver Injury Through Toll-like Receptor 9 in Mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 54(3), 999-1008. <https://doi.org/10.1002/hep.24501>

Huang, Z., Cheng, C., Jiang, L., Yu, Z., Cao, F., Zhong, J., Guo, Z., & Sun, X. (2016). Intraventricular apolipoprotein ApoJ infusion acts protectively in Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurochemistry*, 136(5), 1017-1025. <https://doi.org/10.1111/jnc.13491>

Hulsmans, M., Clauss, S., Xiao, L., Aguirre, A. D., King, K. R., Hanley, A., Hucker, W. J., Wülfers, E. M., Seemann, G., Courties, G., Iwamoto, Y., Sun, Y., Savol, A. J., Sager, H. B., Lavine, K. J., Fishbein, G. A., Capen, D. E., Da Silva, N., Miquerol, L., ... Nahrendorf, M. (2017). Macrophages Facilitate Electrical Conduction in the Heart. *Cell*, 169(3), 510-522.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.050>

Humphreys, D., Hochgrebe, T. T., Easterbrook-Smith, S. B., Tenniswood, M. P., & Wilson, M. R. (1997). Effects of clusterin overexpression on TNFalpha- and TGFbeta-mediated death of L929 cells. *Biochemistry*, 36(49), 15233-15243. <https://doi.org/10.1021/bi9703507>

Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B., & Wilson, M. R. (1999). Clusterin Has Chaperone-like Activity Similar to That of Small Heat Shock Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 6875-6881. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.6875>

Iadecola, C., & Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nature medicine*, 17(7), 796-808. <https://doi.org/10.1038/nm.2399>

Iba, T., Hashiguchi, N., Nagaoka, I., Tabe, Y., Kadota, K., & Sato, K. (2015). Heparins attenuated histone-mediated cytotoxicity in vitro and improved the survival in a rat model of histone-induced organ dysfunction. *Intensive Care Medicine Experimental*, 3, 36. <https://doi.org/10.1186/s40635-015-0072-z>

Ibáñez, B., Heusch, G., Ovize, M., & Van de Werf, F. (2015). Evolving Therapies for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(14), 1454-1471. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.02.032>

- Imhof, A., Charnay, Y., Vallet, P. G., Aronow, B., Kovari, E., French, L. E., Bouras, C., & Giannakopoulos, P. (2006). Sustained astrocytic clusterin expression improves remodeling after brain ischemia. *Neurobiology of Disease*, 22(2), 274-283. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.11.009>
- Introna, M., Alles, V. V., Castellano, M., Picardi, G., Gioia, L. D., Bottazzi, B., Peri, G., Breviario, F., Salmona, M., Gregorio, L. D., Dragani, T. A., Srinivasan, N., Blundell, T. L., Hamilton, T. A., & Mantovani, A. (1996). Cloning of Mouse ptx3, a New Member of the Pentraxin Gene Family Expressed at Extrahepatic Sites. *Blood*, 87(5), 1862-1872. <https://doi.org/10.1182/blood.V87.5.1862.1862>
- Ishikawa, Y., Akasaka, Y., Ishii, T., Komiyama, K., Masuda, S., Asuwa, N., Choi-Miura, N.-H., & Tomita, M. (1998). Distribution and Synthesis of Apolipoprotein J in the Atherosclerotic Aorta. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.18.4.665>
- Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5(10), 987-995. <https://doi.org/10.1038/ni1112>
- Iyer, S. S., He, Q., Janczy, J. R., Elliott, E. I., Zhong, Z., Olivier, A. K., Sadler, J. J., Knepper-Adrian, V., Han, R., Qiao, L., Eisenbarth, S. C., Nauseef, W. M., Cassel, S. L., & Sutterwala, F. S. (2013). Mitochondrial cardiolipin is required for Nlrp3 inflammasome activation. *Immunity*, 39(2), 311-323. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.001>
- Jamilloux, Y., Sève, P., & Henry, T. (2014). Les inflammasomes et les maladies humaines. *La Revue de Médecine Interne*, 35(11), 730-741. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2014.04.017>
- Jenne, D. E., Lowin, B., Peitsch, M. C., Böttcher, A., Schmitz, G., & Tschopp, J. (1991). Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high density lipoprotein complex with apolipoprotein A-I in human plasma. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(17), 11030-11036.
- Jenne, D. E., & Tschopp, J. (1989). Molecular structure and functional characterization of a human complement cytotoxicity inhibitor found in blood and seminal plasma : Identity to sulfated glycoprotein 2, a constituent of rat testis fluid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(18), 7123-7127.
- Jones, S. E., & Jomary, C. (2002). Clusterin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34(5), 427-431. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(01\)00155-8](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(01)00155-8)
- Jong, W. M. C., ten Cate, H., Linnenbank, A. C., de Boer, O. J., Reitsma, P. H., de Winter, R. J., & Zuurbier, C. J. (2016). Reduced acute myocardial ischemia-reperfusion injury in IL-6-deficient mice employing a closed-chest model. *Inflammation Research*, 65, 489-499. <https://doi.org/10.1007/s00011-016-0931-4>
- July, L. V., Beraldi, E., So, A., Fazli, L., Evans, K., English, J. C., & Gleave, M. E. (2004). Nucleotide-based therapies targeting clusterin chemosensitize human lung adenocarcinoma cells both in vitro and in vivo. *Molecular Cancer Therapeutics*, 3(3), 223-232.
- Jun, H.-O., Kim, D., Lee, S.-W., Lee, H. S., Seo, J. H., Kim, J. H., Kim, J. H., Yu, Y. S., Min, B. H., & Kim, K.-W. (2011). Clusterin protects H9c2 cardiomyocytes from oxidative stress-

induced apoptosis via Akt/GSK-3 β signaling pathway. *Experimental & Molecular Medicine*, 43(1), 53-61. <https://doi.org/10.3858/emm.2011.43.1.006>

Jung, K., Kim, P., Leuschner, F., Gorbatov, R., Kim, J. K., Ueno, T., Nahrendorf, M., & Yun, S. H. (2013). Endoscopic Time-Lapse Imaging of Immune Cells in Infarcted Mouse Hearts. *Circulation research*, 112(6), 10.1161/CIRCRESAHA.111.300484. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.300484>

Kaczorowski, D. J., Scott, M. J., Pibris, J. P., Afrazi, A., Nakao, A., Edmonds, R. D., Kim, S., Kwak, J. H., Liu, Y., Fan, J., & Billiar, T. R. (2012). Mammalian DNA Is an Endogenous Danger Signal That Stimulates Local Synthesis and Release of Complement Factor B. *Molecular Medicine*, 18(1), 851-860. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00011>

Kalbitz, M., Grailer, J. J., Fattahi, F., Jajou, L., Herron, T. J., Campbell, K. F., Zetoune, F. S., Bosmann, M., Sarma, J. V., Huber-Lang, M., Gebhard, F., Loaiza, R., Valdivia, H. H., Jalife, J., Russell, M. W., & Ward, P. A. (2015). Role of extracellular histones in the cardiomyopathy of sepsis. *The FASEB Journal*, 29(5), 2185-2193. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268730>

Kamiński, K. A., Kożuch, M., Bonda, T. A., Stepaniuk, M. M., Waszkiewicz, E., Chyczewski, L., Musiał, W. J., & Winnicka, M. M. (2009). Effect of interleukin 6 deficiency on the expression of Bcl-2 and Bax in the murine heart. *Pharmacological Reports*, 61(3), 504-513. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(09\)70093-3](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(09)70093-3)

Kaplan, M. J., & Radic, M. (2012). Neutrophil extracellular traps (NETs): Double-edged swords of innate immunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(6), 2689-2695. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201719>

Kapron, J. T., Hilliard, G. M., Lakins, J. N., Tenniswood, M. P., West, K. A., Carr, S. A., & Crabb, J. W. (1997). Identification and characterization of glycosylation sites in human serum clusterin. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 6(10), 2120-2133.

Kawaguchi, M., Takahashi, M., Hata, T., Kashima, Y., Usui, F., Morimoto, H., Izawa, A., Takahashi, Y., Masumoto, J., Koyama, J., Hongo, M., Noda, T., Nakayama, J., Sagara, J., Taniguchi, S., & Ikeda, U. (2011). Inflammasome Activation of Cardiac Fibroblasts Is Essential for Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation*, 123(6), 594-604. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982777>

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>

Khan, M. M., Gandhi, C., Chauhan, N., Stevens, J. W., Motto, D. G., Lentz, S. R., & Chauhan, A. K. (2012). Alternatively-spliced extra domain A of fibronectin promotes acute inflammation and brain injury following cerebral ischemia in mice. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 43(5), 1376-1382. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.635516>

Khurana, R., Gillespie, J. R., Talapatra, A., Minert, L. J., Ionescu-Zanetti, C., Millett, I., & Fink, A. L. (2001). Partially Folded Intermediates as Critical Precursors of Light Chain Amyloid Fibrils and Amorphous Aggregates. *Biochemistry*, 40(12), 3525-3535. <https://doi.org/10.1021/bi001782b>

- Kim, E. K., Hahn, J.-Y., Song, Y. B., Lee, S.-C., Choi, J.-H., Choi, S.-H., Lee, S. H., Choe, Y. H., & Gwon, H.-C. (2015). Effect of ischemic postconditioning on myocardial salvage in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction : Cardiac magnetic resonance substudy of the POST randomized trial. *The International Journal of Cardiovascular Imaging*, *31*(3), 629-637. <https://doi.org/10.1007/s10554-015-0589-y>
- Kim, N., & Choi, W. S. (2011). Proapoptotic role of nuclear clusterin in brain. *Anatomy & Cell Biology*, *44*(3), 169-175. <https://doi.org/10.5115/acb.2011.44.3.169>
- Kim, S.-C., Ghanem, A., Stapel, H., Tiemann, K., Knuefermann, P., Hoeft, A., Meyer, R., Grohé, C., Knowlton, A. A., & Baumgarten, G. (2007). Toll-like receptor 4 deficiency : Smaller infarcts, but no gain in function. *BMC Physiology*, *7*, 5. <https://doi.org/10.1186/1472-6793-7-5>
- Kim, S.-C., Stice, J. P., Chen, L., Jung, J. S., Gupta, S., Wang, Y., Baumgarten, G., Trial, J., & Knowlton, A. A. (2009). Extracellular heat shock protein 60, cardiac myocytes, and apoptosis. *Circulation Research*, *105*(12), 1186-1195. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.209643>
- Kim, Y. S., Kim, J. S., Kwon, J. S., Jeong, M. H., Cho, J. G., Park, J. C., Kang, J. C., & Ahn, Y. (2010). BAY 11-7082, a nuclear factor- κ B inhibitor, reduces inflammation and apoptosis in a rat cardiac ischemia-reperfusion injury model. *International Heart Journal*, *51*(5), 348-353. <https://doi.org/10.1536/ihj.51.348>
- Kimes, B., & Brandt, B. (1976). Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Experimental Cell Research*, *98*(2), 367-381. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(76\)90447-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90447-X)
- King, K. R., Aguirre, A. D., Ye, Y.-X., Sun, Y., Roh, J. D., Ng, R. P., Kohler, R. H., Arlauckas, S. P., Iwamoto, Y., Savol, A., Sadreyev, R. I., Kelly, M., Fitzgibbons, T. P., Fitzgerald, K. A., Mitchison, T., Libby, P., Nahrendorf, M., & Weissleder, R. (2017). IRF3 and Type I Interferons Fuel a Fatal Response to Myocardial Infarction. *Nature medicine*, *23*(12), 1481-1487. <https://doi.org/10.1038/nm.4428>
- Kishore, R., Tkebuchava, T., Sasi, S. P., Silver, M., Gilbert, H.-Y., Yoon, Y.-S., Park, H.-Y., Thorne, T., Losordo, D. W., & Goukassian, D. A. (2011). Tumor necrosis factor- α signaling via TNFR1/p55 is deleterious whereas TNFR2/p75 signaling is protective in adult infarct myocardium. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *691*, 433-448. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6612-4_45
- Kitahara, T., Takeishi, Y., Harada, M., Niizeki, T., Suzuki, S., Sasaki, T., Ishino, M., Bilim, O., Nakajima, O., & Kubota, I. (2008). High-mobility group box 1 restores cardiac function after myocardial infarction in transgenic mice. *Cardiovascular Research*, *80*(1), 40-46. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn163>
- Kleinbongard, P., & Heusch, G. (2015). Extracellular signalling molecules in the ischaemic/reperfused heart – druggable and translatable for cardioprotection? *British Journal of Pharmacology*, *172*(8), 2010-2025. <https://doi.org/10.1111/bph.12902>
- Kleveland, O., Kunszt, G., Bratlie, M., Ueland, T., Broch, K., Holte, E., Michelsen, A. E., Bendz, B., Amundsen, B. H., Espevik, T., Aakhus, S., Damås, J. K., Aukrust, P., Wiseth, R., & Gullestad, L. (2016). Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial

- infarction : A double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *European Heart Journal*, 37(30), 2406-2413. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw171>
- Kluft, C. (2004). Identifying patients at risk of coronary vascular disease : The potential role of inflammatory markers. *European Heart Journal Supplements*, 6, C21-C27. <https://doi.org/10.1016/j.ehjsup.2004.04.006>
- Koller, L., Richter, B., Winter, M.-P., Sulzgruber, P., Potolidis, C., Liebhart, F., Mörtl, D., Berger, R., Goliash, G., Lang, I., Wojta, J., Hülsmann, M., & Niessner, A. (2017). Clusterin/apolipoprotein J is independently associated with survival in patients with chronic heart failure. *Journal of Clinical Lipidology*, 11(1), 178-184. <https://doi.org/10.1016/j.jacl.2016.11.009>
- Koltai, T. (2014). Clusterin : A key player in cancer chemoresistance and its inhibition. *Oncotargets and therapy*, 7, 447-456. <https://doi.org/10.2147/OTT.S58622>
- Kounnas, M. Z., Loukinova, E. B., Stefansson, S., Harmony, J. A., Brewer, B. H., Strickland, D. K., & Argraves, W. S. (1995). Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(22), 13070-13075. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.13070>
- Kouretas, P. C., Kim, Y. D., Cahill, P. A., Myers, A. K., To, L. N., Wang, Y. N., Sitzmann, J. V., & Hannan, R. L. (1999). Nonanticoagulant heparin prevents coronary endothelial dysfunction after brief ischemia-reperfusion injury in the dog. *Circulation*, 99(8), 1062-1068. <https://doi.org/10.1161/01.cir.99.8.1062>
- Kouretas, P. C., Myers, A. K., Kim, Y. D., Cahill, P. A., Myers, J. L., Wang, Y. N., Sitzmann, J. V., Wallace, R. B., & Hannan, R. L. (1998). Heparin and nonanticoagulant heparin preserve regional myocardial contractility after ischemia-reperfusion injury : Role of nitric oxide. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 115(2), 440-448; discussion 448-449. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(98\)70288-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(98)70288-0)
- Krieg, A. M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*, 20, 709-760. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842>
- Krijnen, P. A. J., Cillessen, S. A. G. M., Manoe, R., Muller, A., Visser, C. A., Meijer, C. J. L. M., Musters, R. J. P., Hack, C. E., Aarden, L. A., & Niessen, H. W. M. (2005). Clusterin : A protective mediator for ischemic cardiomyocytes? *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 289(5), H2193-H2202. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00355.2005>
- Krijnen, P. A. J., Meischl, C., Nijmeijer, R., Visser, C. A., Hack, C. E., & Niessen, H. W. M. (2006). Inhibition of sPLA2-IIA, C-reactive protein or complement : New therapy for patients with acute myocardial infarction? *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets*, 6(2), 113-123. <https://doi.org/10.2174/187152906777441830>
- Kroemer, G., Galluzzi, L., & Brenner, C. (2007). Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99-163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Krug, A., De Rochemont, W. D. M., & Korb, G. (1966). Blood Supply of the Myocardium after Temporary Coronary Occlusion. *Circulation Research*, 19(1), 57-62. <https://doi.org/10.1161/01.RES.19.1.57>

- Ku, S. H., Hong, J., Moon, H.-H., Jeong, J. H., Mok, H., Park, S., Choi, D., & Kim, S. H. (2015). Deoxycholic acid-modified polyethylenimine based nanocarriers for RAGE siRNA therapy in acute myocardial infarction. *Archives of Pharmacal Research*, 38(7), 1317-1324. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0527-x>
- Kurahashi, T., Muramaki, M., Yamanaka, K., Hara, I., & Miyake, H. (2005). Expression of the secreted form of clusterin protein in renal cell carcinoma as a predictor of disease extension. *BJU International*, 96(6), 895-899. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2005.05733.x>
- Kurashima, Y., Amiya, T., Nochi, T., Fujisawa, K., Haraguchi, T., Iba, H., Tsutsui, H., Sato, S., Nakajima, S., Iijima, H., Kubo, M., Kunisawa, J., & Kiyono, H. (2012). Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nature Communications*, 3, 1034. <https://doi.org/10.1038/ncomms2023>
- Kurrelmeyer, K. M., Michael, L. H., Baumgarten, G., Taffet, G. E., Peschon, J. J., Sivasubramanian, N., Entman, M. L., & Mann, D. L. (2000). Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(10), 5456-5461.
- Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S., & Grimm, M. (2015). H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et biophysica acta*, 1853(2), 276-284. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.11.015>
- Kuznetsova, T., & Knez, J. (2017). Peripheral Blood Mitochondrial DNA and Myocardial Function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 982, 347-358. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55330-6_19
- LaDu, M. J., Gilligan, S. M., Lukens, J. R., Cabana, V. G., Reardon, C. A., Van Eldik, L. J., & Holtzman, D. M. (1998). Nascent astrocyte particles differ from lipoproteins in CSF. *Journal of Neurochemistry*, 70(5), 2070-2081. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70052070.x>
- Lagrand, W. K., Niessen, H. W., Wolbink, G. J., Jaspars, L. H., Visser, C. A., Verheugt, F. W., Meijer, C. J., & Hack, C. E. (1997). C-reactive protein colocalizes with complement in human hearts during acute myocardial infarction. *Circulation*, 95(1), 97-103. <https://doi.org/10.1161/01.cir.95.1.97>
- Lam, F. W., Cruz, M. A., Leung, H.-C. E., Parikh, K. S., Smith, C. W., & Rumbaut, R. E. (2013). Histone induced platelet aggregation is inhibited by normal albumin. *Thrombosis Research*, 132(1), 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2013.04.018>
- Lamkanfi, M., & Dixit, V. M. (2012). Inflammasomes and their roles in health and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 137-161. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155745>
- Laping, N. J., Morgan, T. E., Nichols, N. R., Rozovsky, I., Young-Chan, C. S., Zarow, C., & Finch, C. E. (1994). Transforming growth factor-beta 1 induces neuronal and astrocyte genes : Tubulin alpha 1, glial fibrillary acidic protein and clusterin. *Neuroscience*, 58(3), 563-572. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90081-7](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90081-7)

- Latini, R., Maggioni, A. P., Peri, G., Gonzini, L., Lucci, D., Mocarelli, P., Vago, L., Pasqualini, F., Signorini, S., Soldateschi, D., Tarli, L., Schweiger, C., Fresco, C., Cecere, R., Tognoni, G., & Mantovani, A. (2004). Prognostic Significance of the Long Pentraxin PTX3 in Acute Myocardial Infarction. *Circulation*. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000145167.30987.2E>
- Lecour, S., Suleman, N., Deuchar, G. A., Somers, S., Lacerda, L., Huisamen, B., & Opie, L. H. (2005). Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation*, *112*(25), 3911-3918. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.581058>
- Lee, C., Atanelov, L., Modrek, B., & Xing, Y. (2003). ASAP : The Alternative Splicing Annotation Project. *Nucleic Acids Research*, *31*(1), 101-105.
- Lee, W. W., Marinelli, B., van der Laan, A. M., Sena, B. F., Gorbатов, R., Leuschner, F., Dutta, P., Iwamoto, Y., Ueno, T., Begieneman, M. P. V., Niessen, H. W. M., Piek, J. J., Vinegoni, C., Pittet, M. J., Swirski, F. K., Tawakol, A., Di Carli, M., Weissleder, R., & Nahrendorf, M. (2012). PET/MRI of inflammation in myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, *59*(2), 153-163. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.08.066>
- Leeb, C., Eresheim, C., & Nimpf, J. (2014). Clusterin Is a Ligand for Apolipoprotein E Receptor 2 (ApoER2) and Very Low Density Lipoprotein Receptor (VLDLR) and Signals via the Reelin-signaling Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *289*(7), 4161-4172. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.529271>
- Lefer, D. J., Shandelya, S. M., Serrano, C. V., Becker, L. C., Kuppusamy, P., & Zweier, J. L. (1993). Cardioprotective actions of a monoclonal antibody against CD-18 in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, *88*(4 Pt 1), 1779-1787. <https://doi.org/10.1161/01.cir.88.4.1779>
- Léger, J. G., And, R. L. G., & Tenniswood, M. P. R. (1988). Treatment with antiandrogens induces an androgen-repressed gene in the rat ventral prostate. *The Prostate*, *13*(2), 131-142. <https://doi.org/10.1002/pros.2990130205>
- Léger, J. G., Montpetit, M. L., & Tenniswood, M. P. (1987). Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *147*(1), 196-203. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(87\)80106-7](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(87)80106-7)
- Leskov, K. S., Araki, S., Lavik, J.-P., Gomez, J. A., Gama, V., Gonos, E. S., Trougakos, I. P., Matsuyama, S., & Boothman, D. A. (2011). CRM1 protein-mediated regulation of nuclear clusterin (nCLU), an ionizing radiation-stimulated, Bax-dependent pro-death factor. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(46), 40083-40090. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252957>
- Leskov, K. S., Klokov, D. Y., Li, J., Kinsella, T. J., & Boothman, D. A. (2003). Synthesis and Functional Analyses of Nuclear Clusterin, a Cell Death Protein*. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(13), 11590-11600. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209233200>
- Leuschner, F., Dutta, P., Gorbатов, R., Novobrantseva, T. I., Sullivan, J., Courties, G., Lee, K. M., Kim, J. I., Markmann, J. F., Marinelli, B., Panizzi, P., Lee, W. W., Iwamoto, Y., Milstein, S., Epstein-Barash, H., Cantley, W., Wong, J., Cortez-Retamozo, V., Newton, A., ...

- Nahrendorf, M. (2011). Therapeutic siRNA silencing in inflammatory monocytes. *Nature biotechnology*, 29(11), 1005-1010. <https://doi.org/10.1038/nbt.1989>
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, 132(1), 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- Li, N., Zoubeidi, A., Beraldi, E., & Gleave, M. E. (2013). GRP78 regulates clusterin stability, retrotranslocation and mitochondrial localization under ER stress in prostate cancer. *Oncogene*, 32(15), 1933-1942. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.212>
- Li, Y., Sagar, M. B., Wassler, M., Shelat, H., & Geng, Y.-J. (2007). Apolipoprotein-J prevention of fetal cardiac myoblast apoptosis induced by ethanol. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 357(1), 157-161. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.109>
- Li, Y., Si, R., Feng, Y., Chen, H. H., Zou, L., Wang, E., Zhang, M., Warren, H. S., Sosnovik, D. E., & Chao, W. (2011). Myocardial Ischemia Activates an Injurious Innate Immune Signaling via Cardiac Heat Shock Protein 60 and Toll-like Receptor 4. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31308-31319. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.246124>
- Li, Y., Song, Y.-Q., Zhang, Y., Liu, T., & Qin, Q. (2021a). Over-expression of Apolipoprotein J Inhibits Cholesterol Crystal-Induced Inflammatory Responses via Suppressing NLRP3 Inflammasome Activation in THP-1 Macrophages. *Folia Biologica*, 67(5-6), 183-190.
- Li, Y., Song, Y.-Q., Zhang, Y., Liu, T., & Qin, Q. (2021b). Over-expression of Apolipoprotein J Inhibits Cholesterol Crystal-Induced Inflammatory Responses via Suppressing NLRP3 Inflammasome Activation in THP-1 Macrophages. *Folia Biologica*, 67(5-6), 183-190.
- Liangos, O., Domhan, S., Schwager, C., Zeier, M., Huber, P. E., Addabbo, F., Goligorsky, M. S., Hlatky, L., Jaber, B. L., & Abdollahi, A. (2010). Whole Blood Transcriptomics in Cardiac Surgery Identifies a Gene Regulatory Network Connecting Ischemia Reperfusion with Systemic Inflammation. *PLoS ONE*, 5(10), e13658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013658>
- Liao, Y.-F., Gotwals, P. J., Koteliansky, V. E., Sheppard, D., & Van De Water, L. (2002). The EIIIA Segment of Fibronectin Is a Ligand for Integrins $\alpha 9\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ Providing a Novel Mechanism for Regulating Cell Adhesion by Alternative Splicing*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 14467-14474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201100200>
- Limalanathan, S., Andersen, G. Ø., Kløw, N., Abdelnoor, M., Hoffmann, P., & Eritsland, J. (2014). Effect of Ischemic Postconditioning on Infarct Size in Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction Treated by Primary PCI Results of the POSTEMI (POStconditioning in ST-Elevation Myocardial Infarction) Randomized Trial. *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 3(2). <https://doi.org/10.1161/JAHA.113.000679>
- Lindmark, E., Diderholm, E., Wallentin, L., & Siegbahn, A. (2001). Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease : Effects of an early invasive or noninvasive strategy. *JAMA*, 286(17), 2107-2113. <https://doi.org/10.1001/jama.286.17.2107>

- Linkermann, A., & Green, D. R. (2014). Necroptosis. *The New England journal of medicine*, 370(5), 455-465. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1310050>
- Liu, F.-Y., Fan, D., Yang, Z., Tang, N., Guo, Z., Ma, S.-Q., Ma, Z.-G., Wu, H.-M., Deng, W., & Tang, Q.-Z. (2019). TLR9 is essential for HMGB1-mediated post-myocardial infarction tissue repair through affecting apoptosis, cardiac healing, and angiogenesis. *Cell Death & Disease*, 10(7), 480. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1718-7>
- Liu, G., Zhang, H., Hao, F., Hao, J., Pan, L., Zhao, Q., & Wo, J. (2018). Clusterin Reduces Cold Ischemia-Reperfusion Injury in Heart Transplantation Through Regulation of NF- κ B Signaling and Bax/Bcl-xL Expression. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(3), 1003-1012. <https://doi.org/10.1159/000487295>
- Liu, X., Meng, L., Li, J., Meng, J., Teng, X., Gu, H., Hu, S., & Wei, Y. (2015). Secretory clusterin is upregulated in rats with pulmonary arterial hypertension induced by systemic-to-pulmonary shunts and exerts important roles in pulmonary artery smooth muscle cells. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 213(2), 505-518. <https://doi.org/10.1111/apha.12352>
- Lu, C., Ren, D., Wang, X., Ha, T., Liu, L., Lee, E. J., Hu, J., Kalbfleisch, J., Gao, X., Kao, R., Williams, D., & Li, C. (2014). Toll-like receptor 3 plays a role in myocardial infarction and ischemia/reperfusion injury. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(1), 10.1016/j.bbadis.2013.10.006. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.10.006>
- Lubbers, N. L., Polakowski, J. S., Wegner, C. D., Burke, S. E., Diaz, G. J., Daniell, K. M., & Cox, B. F. (2002). Oral bimecromol elevates heat shock protein 70 and reduces myocardial infarct size in rats. *European Journal of Pharmacology*, 435(1), 79-83. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01552-7](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01552-7)
- Lugrin, J., Parapanov, R., Rosenblatt-Velin, N., Rignault-Clerc, S., Feihl, F., Waeber, B., Müller, O., Vergely, C., Zeller, M., Tardivel, A., Schneider, P., Pacher, P., & Liaudet, L. (2015). Interleukin-1 alpha is a crucial danger signal triggering acute myocardial inflammation during myocardial infarction. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 194(2), 499-503. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401948>
- Lyu, N., Wang, Y., Wang, J., Zhang, Z., & Kong, W. (2018). Study on early diagnosis of epithelial ovarian cancer by analysis of plasma septin-9 and clusterin level. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(Supplement), S444-S449. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.181178>
- Ma, J., Gao, W., & Gao, J. (2019). SCLU as prognostic biomarker and therapeutic target in osteosarcoma. *Bioengineered*, 10(1), 229-239. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1621136>
- Ma, Y., Yabluchanskiy, A., Iyer, R. P., Cannon, P. L., Flynn, E. R., Jung, M., Henry, J., Cates, C. A., Deleon-Pennell, K. Y., & Lindsey, M. L. (2016). Temporal neutrophil polarization following myocardial infarction. *Cardiovascular Research*, 110(1), 51-61. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw024>
- Mackness, B., Hunt, R., Durrington, P. N., & Mackness, M. I. (1997). Increased immunolocalization of paraoxonase, clusterin, and apolipoprotein A-I in the human artery wall with the progression of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 17(7), 1233-1238. <https://doi.org/10.1161/01.atv.17.7.1233>

- Maddox, J. F., Hachicha, M., Takano, T., Petasis, N. A., Fokin, V. V., & Serhan, C. N. (1997). Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(11), 6972-6978. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.11.6972>
- Maekawa, N., Wada, H., Kanda, T., Niwa, T., Yamada, Y., Saito, K., Fujiwara, H., Sekikawa, K., & Seishima, M. (2002). Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor-alpha. *Journal of the American College of Cardiology*, 39(7), 1229-1235. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(02\)01738-2](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(02)01738-2)
- Maimaitiaili, A., Li, J., Aibibula, A., & Abudureheman, M. (2018). Inhibition of nuclear factor kappa B pathway protects myocardial ischemia/reperfusion injury in rats under treatment with abnormal savda munziq. *American Journal of Translational Research*, 10(1), 77-85.
- Mann, D. L. (2011). THE EMERGING ROLE OF INNATE IMMUNITY IN THE HEART AND VASCULAR SYSTEM: FOR WHOM THE CELL TOLLS. *Circulation research*, 108(9), 1133-1145. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.226936>
- Mann, D. L. (2015). INNATE IMMUNITY AND THE FAILING HEART : THE CYTOKINE HYPOTHESIS REVISITED. *Circulation research*, 116(7), 1254-1268. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.302317>
- Manning, A. S., & Hearse, D. J. (1984). Reperfusion-induced arrhythmias : Mechanisms and prevention. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 16(6), 497-518. [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(84\)80638-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(84)80638-0)
- Marchetti, C., Toldo, S., Chojnacki, J., Mezzaroma, E., Liu, K., Salloum, F. N., Nordio, A., Carbone, S., Mauro, A. G., Das, A., Zalavadia, A. A., Halquist, M. S., Federici, M., Van Tassell, B. W., Zhang, S., & Abbate, A. (2015). Pharmacologic inhibition of the NLRP3 inflammasome preserves cardiac function after ischemic and non-ischemic injury in the mouse. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 66(1), 1-8. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000247>
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M., & Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440(7081), 7081. <https://doi.org/10.1038/nature04515>
- Mastrocola, R., Collino, M., Penna, C., Nigro, D., Chiazza, F., Fracasso, V., Tullio, F., Alloatti, G., Pagliaro, P., & Aragno, M. (2016). Maladaptive Modulations of NLRP3 Inflammasome and Cardioprotective Pathways Are Involved in Diet-Induced Exacerbation of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 3480637. <https://doi.org/10.1155/2016/3480637>
- Mastrocola, R., Penna, C., Tullio, F., Femminò, S., Nigro, D., Chiazza, F., Serpe, L., Collotta, D., Alloatti, G., Cocco, M., Bertinaria, M., Pagliaro, P., Aragno, M., & Collino, M. (2016). Pharmacological Inhibition of NLRP3 Inflammasome Attenuates Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Activation of RISK and Mitochondrial Pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 5271251. <https://doi.org/10.1155/2016/5271251>
- Matsumura, H., Shimizu, Y., Ohsawa, Y., Kawahara, A., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2000). Necrotic Death Pathway in FAS Receptor Signaling. *The Journal of Cell Biology*, 151(6), 1247-1256.

- Matukumalli, S. R., Tangirala, R., & Rao, C. M. (2017). Clusterin : Full-length protein and one of its chains show opposing effects on cellular lipid accumulation. *Scientific Reports*, 7(1), 41235. <https://doi.org/10.1038/srep41235>
- Maugeri, N., Rovere-Querini, P., Slavich, M., Coppi, G., Doni, A., Bottazzi, B., Garlanda, C., Cianflone, D., Maseri, A., Mantovani, A., & Manfredi, A. A. (2011). Early and Transient Release of Leukocyte Pentraxin 3 during Acute Myocardial Infarction. *The Journal of Immunology*, 187(2), 970-979. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100261>
- Mauro, A. G., Bonaventura, A., Mezzaroma, E., Quader, M., & Toldo, S. (2019). NLRP3 Inflammasome in Acute Myocardial Infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 74(3), 175–187. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000717>
- May, P. C., Johnson, S. A., Poirier, J., Lampert-Etchells, M., & Finch, C. E. (1989). Altered gene expression in Alzheimer's disease brain tissue. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 16(4 Suppl), 473-476. <https://doi.org/10.1017/s0317167100029796>
- May, P. C., Lampert-Etchells, M., Johnson, S. A., Poirier, J., Masters, J. N., & Finch, C. E. (1990). Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in Alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron*, 5(6), 831-839. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90342-d](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90342-d)
- May, P. C., Robison, P., Fuson, K., Smalstig, B., Stephenson, D., & Clemens, J. A. (1992). Sulfated glycoprotein-2 expression increases in rodent brain after transient global ischemia. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 15(1-2), 33-39. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(92\)90148-5](https://doi.org/10.1016/0169-328x(92)90148-5)
- McLaughlin, L., Zhu, G., Mistry, M., Ley-Ebert, C., Stuart, W. D., Florio, C. J., Groen, P. A., Witt, S. A., Kimball, T. R., Witte, D. P., Harmony, J. A. K., & Aronow, B. J. (2000). Apolipoprotein J/clusterin limits the severity of murine autoimmune myocarditis. *Journal of Clinical Investigation*, 106(9), 1105-1113.
- Meara, C. H. O., Coupland, L. A., Kordbacheh, F., Quah, B. J. C., Chang, C.-W., Simon Davis, D. A., Bezos, A., Browne, A. M., Freeman, C., Hammill, D. J., Chopra, P., Pipa, G., Madge, P. D., Gallant, E., Segovis, C., Dulhunty, A. F., Arnolda, L. F., Mitchell, I., Khachigian, L. M., ... Parish, C. R. (2020). Neutralizing the pathological effects of extracellular histones with small polyanions. *Nature Communications*, 11(1), 6408. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20231-y>
- Medkour, F., Pellerin, D., Fournier, C., & Assayag, P. (s. d.). *Traitements à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde*. 9.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640), 394-397. <https://doi.org/10.1038/41131>
- Mersmann, J., Habeck, K., Latsch, K., Zimmermann, R., Jacoby, C., Fischer, J. W., Hartmann, C., Schrader, J., Kirschning, C. J., & Zacharowski, K. (2011). Left ventricular dilation in toll-like receptor 2 deficient mice after myocardial ischemia/reperfusion through defective scar formation. *Basic Research in Cardiology*, 106(1), 89-98. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0127-y>

- Mezzaroma, E., Toldo, S., Farkas, D., Seropian, I. M., Van Tassel, B. W., Salloum, F. N., Kannan, H. R., Menna, A. C., Voelkel, N. F., & Abbate, A. (2011). The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(49), 19725-19730. <https://doi.org/10.1073/pnas.1108586108>
- MICHEL, D., CHATELAIN, G., NORTH, S., & BRUN, G. (1997). Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochemical Journal*, *328*(1), 45-50. <https://doi.org/10.1042/bj3280045>
- Mihlan, M., Blom, A. M., Kupreishvili, K., Lauer, N., Stelzner, K., Bergström, F., Niessen, H. W. M., & Zipfel, P. F. (2011). Monomeric C-reactive protein modulates classic complement activation on necrotic cells. *The FASEB Journal*, *25*(12), 4198-4210. <https://doi.org/10.1096/fj.11-186460>
- Miller, D. J., & Fort, P. E. (2018). Heat Shock Proteins Regulatory Role in Neurodevelopment. *Frontiers in Neuroscience*, *12*, 821. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00821>
- Miners, J. S., Clarke, P., & Love, S. (2017). Clusterin levels are increased in Alzheimer's disease and influence the regional distribution of A β . *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, *27*(3), 305-313. <https://doi.org/10.1111/bpa.12392>
- Mishra, P. K., Adameova, A., Hill, J. A., Baines, C. P., Kang, P. M., Downey, J. M., Narula, J., Takahashi, M., Abbate, A., Pirstine, H. C., Kar, S., Su, S., Higa, J. K., Kawasaki, N. K., & Matsui, T. (2019). Guidelines for evaluating myocardial cell death. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *317*(5), H891-H922. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00259.2019>
- Miyake, H., Yamanaka, K., Muramaki, M., Kurahashi, T., Gleave, M., & Hara, I. (2005). Enhanced expression of the secreted form of clusterin following neoadjuvant hormonal therapy as a prognostic predictor in patients undergoing radical prostatectomy for prostate cancer. *Oncology Reports*, *14*(5), 1371-1375.
- Miyao, Y., Yasue, H., Ogawa, H., Misumi, I., Masuda, T., Sakamoto, T., & Morita, E. (1993). Elevated plasma interleukin-6 levels in patients with acute myocardial infarction. *American Heart Journal*, *126*(6), 1299-1304. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(93\)90526-f](https://doi.org/10.1016/0002-8703(93)90526-f)
- Moe, G. W., Marin-Garcia, J., Konig, A., Goldenthal, M., Lu, X., & Feng, Q. (2004). In vivo TNF-alpha inhibition ameliorates cardiac mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and apoptosis in experimental heart failure. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *287*(4), H1813-1820. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00036.2004>
- Monden, Y., Kubota, T., Inoue, T., Tsutsumi, T., Kawano, S., Ide, T., Tsutsui, H., & Sunagawa, K. (2007). Tumor necrosis factor-alpha is toxic via receptor 1 and protective via receptor 2 in a murine model of myocardial infarction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *293*(1), H743-753. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00166.2007>
- Moretti, R. M., Montagnani Marelli, M., Mai, S., Cariboni, A., Scaltriti, M., Bettuzzi, S., & Limonta, P. (2007). Clusterin isoforms differentially affect growth and motility of prostate cells : Possible implications in prostate tumorigenesis. *Cancer Research*, *67*(21), 10325-10333. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0516>

- Morton, A. C., Rothman, A. M. K., Greenwood, J. P., Gunn, J., Chase, A., Clarke, B., Hall, A. S., Fox, K., Foley, C., Banya, W., Wang, D., Flather, M. D., & Crossman, D. C. (2015). The effect of interleukin-1 receptor antagonist therapy on markers of inflammation in non-ST elevation acute coronary syndromes : The MRC-ILA Heart Study. *European Heart Journal*, 36(6), 377-384. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu272>
- Moss, N. C., Stansfield, W. E., Willis, M. S., Tang, R.-H., & Selzman, C. H. (2007). IKK β inhibition attenuates myocardial injury and dysfunction following acute ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 293(4), H2248-H2253. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00776.2007>
- Mu, L., Yang, F., Guo, D., Li, P., & Zhang, M. (2020). Overexpression of secretory clusterin (sCLU) induces chemotherapy resistance in human gastric cancer cells by targeting miR-195-5p. *Bioengineered*, 11(1), 472-483. <https://doi.org/10.1080/21655979.2020.1747825>
- Mukherjee, P., & Jain, M. (2019). Effect of Ischemic Postconditioning during Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients with ST-segment Elevation Myocardial Infarction : A Single-center Cross-sectional Study. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 22(4), 347-352. https://doi.org/10.4103/aca.ACA_126_18
- Muller, B., Peri, G., Doni, A., Torri, V., Landmann, R., Bottazzi, B., & Mantovani, A. (2001). Circulating levels of the long pentraxin PTX3 correlate with severity of infection in critically ill patients. *Critical Care Medicine*, 29(7), 1404-1407. <https://doi.org/10.1097/00003246-200107000-00017>
- Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M., & Wang, P. (2021). Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*, 26(3-4), 152-162. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01663-3>
- Murphy, B. F., Kirszbaum, L., Walker, I. D., & d'Apice, A. J. (1988). SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *Journal of Clinical Investigation*, 81(6), 1858-1864.
- Murphy, B. F., Saunders, J. R., O'Bryan, M. K., Kirszbaum, L., Walker, I. D., & d'Apice, A. J. (1989). SP-40,40 is an inhibitor of C5b-6-initiated haemolysis. *International Immunology*, 1(5), 551-554. <https://doi.org/10.1093/intimm/1.5.551>
- Murry, C. E., Jennings, R. B., & Reimer, K. A. (1986). Preconditioning with ischemia : A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5), 1124-1136. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.74.5.1124>
- Mustafi, S., Sant, D. W., Liu, Z.-J., & Wang, G. (2017). Ascorbate induces apoptosis in melanoma cells by suppressing Clusterin expression. *Scientific Reports*, 7(1), 3671. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03893-5>
- Nafee, A. M., Pasha, H. F., Abd El Aal, S. M., & Mostafa, N. A. (2012). Clinical significance of serum clusterin as a biomarker for evaluating diagnosis and metastasis potential of viral-related hepatocellular carcinoma. *Clinical Biochemistry*, 45(13-14), 1070-1074. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.04.024>
- Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2007). The healing myocardium sequentially

- mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(12), 3037-3047. <https://doi.org/10.1084/jem.20070885>
- Nakahara, M., Ito, T., Kawahara, K., Yamamoto, M., Nagasato, T., Shrestha, B., Yamada, S., Miyauchi, T., Higuchi, K., Takenaka, T., Yasuda, T., Matsunaga, A., Kakihana, Y., Hashiguchi, T., Kanmura, Y., & Maruyama, I. (2013). Recombinant thrombomodulin protects mice against histone-induced lethal thromboembolism. *PloS One*, 8(9), e75961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075961>
- Nebuloni, M., Pasqualini, F., Zerbi, P., Lauri, E., Mantovani, A., Vago, L., & Garlanda, C. (2011). PTX3 expression in the heart tissues of patients with myocardial infarction and infectious myocarditis. *Cardiovascular Pathology*, 20(1), e27-e35. <https://doi.org/10.1016/j.carpath.2010.02.005>
- Newton, K., & Dixit, V. M. (2012). Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3), a006049. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006049>
- Nguan, C. Y. C., Guan, Q., Gleave, M. E., & Du, C. (2014). Promotion of cell proliferation by clusterin in the renal tissue repair phase after ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 306(7), F724-733. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00410.2013>
- Nicotera, P., Leist, M., & Ferrando-May, E. (1998). Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters*, 102-103, 139-142. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00298-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00298-7)
- Nieminen, A.-L. (2003). Apoptosis and necrosis in health and disease : Role of mitochondria. In *International Review of Cytology* (Vol. 224, p. 29-55). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)24002-0](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)24002-0)
- Nijmeijer, R., Krijnen, P. a. J., Assink, J., Klaarenbeek, M. a. R., Lagrand, W. K., Veerhuis, R., Visser, C. A., Meijer, C. J. L. M., Niessen, H. W. M., & Hack, C. E. (2004). C-reactive protein and complement depositions in human infarcted myocardium are more extensive in patients with reinfarction or upon treatment with reperfusion. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(12), 803-810. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2004.01425.x>
- Nijmeijer, R., Lagrand, W. K., Baidoshvili, A., Lubbers, Y. T. P., Hermens, W. T., Meijer, C. J. L. M., Visser, C. A., Hack, C. E., & Niessen, H. W. M. (2002). Secretory type II phospholipase A2 binds to ischemic myocardium during myocardial infarction in humans. *Cardiovascular Research*, 53(1), 138-146. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(01\)00480-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(01)00480-1)
- Nishimura, M., & Naito, S. (2005). Tissue-Specific mRNA Expression Profiles of Human Toll-Like Receptors and Related Genes. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(5), 886-892. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.886>
- Niu, L., Zang, J., Cai, L., Li, C., & Cao, H. (2007). [Relationship of clusterin expression with Bax and p53 expression in non-small cell lung cancer]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi = Chinese Journal of Lung Cancer*, 10(4), 284-287. <https://doi.org/10.3779/j.issn.1009-3419.2007.04.05>
- Nizard, P., Tetley, S., Dréan, Y. L., Watrin, T., Goff, P. L., Wilson, M. R., & Michel, D. (2007). Stress-Induced Retrotranslocation of Clusterin/ApoJ into the Cytosol. *Traffic*, 8(5), 554-565. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00549.x>

- Noll, F., Behnke, J., Leiting, S., Troidl, K., Alves, G. T., Müller-Redetzky, H., Preissner, K. T., & Fischer, S. (2017). Self-extracellular RNA acts in synergy with exogenous danger signals to promote inflammation. *PLoS ONE*, *12*(12), e0190002. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190002>
- Novotny, J., Oberdieck, P., Titova, A., Pelisek, J., Chandraratne, S., Nicol, P., Hapfelmeier, A., Joner, M., Maegdefessel, L., Poppert, H., Pircher, J., Massberg, S., Friedrich, B., Zimmer, C., Schulz, C., & Boeckh-Behrens, T. (2020). Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction. *Neurology*, *94*(22), e2346-e2360. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000009532>
- O'Bryan, M. K., Baker, H. W., Saunders, J. R., Kirszbaum, L., Walker, I. D., Hudson, P., Liu, D. Y., Glew, M. D., d'Apice, A. J., & Murphy, B. F. (1990). Human seminal clusterin (SP-40,40). Isolation and characterization. *Journal of Clinical Investigation*, *85*(5), 1477-1486.
- Okamura, Y., Watari, M., Jerud, E. S., Young, D. W., Ishizaka, S. T., Rose, J., Chow, J. C., & Strauss, J. F. (2001). The Extra Domain A of Fibronectin Activates Toll-like Receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(13), 10229-10233. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100099200>
- Ong, S.-B., Hernández-Reséndiz, S., Crespo-Avilan, G. E., Mukhametshina, R. T., Kwek, X.-Y., Cabrera-Fuentes, H. A., & Hausenloy, D. J. (2018). Inflammation following acute myocardial infarction : Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, *186*, 73-87. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.01.001>
- Ooie, T., Takahashi, N., Saikawa, T., Nawata, T., Arikawa, M., Yamanaka, K., Hara, M., Shimada, T., & Sakata, T. (2001). Single Oral Dose of Geranylgeranylacetone Induces Heat-Shock Protein 72 and Renders Protection Against Ischemia/Reperfusion Injury in Rat Heart. *Circulation*, *104*(15), 1837-1843. <https://doi.org/10.1161/hc3901.095771>
- Ovize, M., Baxter, G. F., Di Lisa, F., Ferdinandy, P., Garcia-Dorado, D., Hausenloy, D. J., Heusch, G., Vinten-Johansen, J., Yellon, D. M., & Schulz, R. (2010). Postconditioning and protection from reperfusion injury : Where do we stand? * Position Paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research*, *87*(3), 406-423. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq129>
- Oyama Jun-ichi, Blais Charles, Liu Xiaoli, Pu Mingying, Kobzik Lester, Kelly Ralph A., & Bourcier Todd. (2004). Reduced Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury in Toll-Like Receptor 4-Deficient Mice. *Circulation*, *109*(6), 784-789. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000112575.66565.84>
- Parapanov, R., Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Feihl, F., Waeber, B., Milano, G., Vergely, C., Li, N., Pacher, P., & Liaudet, L. (2015). Toll-like receptor 5 deficiency exacerbates cardiac injury and inflammation induced by myocardial ischaemia-reperfusion in the mouse. *Clinical Science*, *129*(2), 187-198. <https://doi.org/10.1042/CS20140444>
- Paraskevas, K. I., & Mikhailidis, D. P. (2008). C-reactive protein (CRP) : More than just an innocent bystander? *Current Medical Research and Opinion*, *24*(1), 75-78. <https://doi.org/10.1185/030079908x253654>
- Park, J. S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.-Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., & Abraham, E. (2004). Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group

box 1 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 7370-7377. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306793200>

Pearson, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W., Anderson, J. L., Cannon, R. O., Criqui, M., Fadl, Y. Y., Fortmann, S. P., Hong, Y., Myers, G. L., Rifai, N., Smith, S. C., Taubert, K., Tracy, R. P., Vinicor, F., Centers for Disease Control and Prevention, & American Heart Association. (2003). Markers of inflammation and cardiovascular disease : Application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation*, 107(3), 499-511. <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000052939.59093.45>

Pemberton, A. D., Brown, J. K., & Inglis, N. F. (2010). Proteomic identification of interactions between histones and plasma proteins : Implications for cytoprotection. *PROTEOMICS*, 10(7), 1484-1493. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900818>

Pepys, M. B., & Hirschfield, G. M. (2003). C-reactive protein : A critical update. *Journal of Clinical Investigation*, 111(12), 1805-1812. <https://doi.org/10.1172/JCI200318921>

Peri, G., Introna, M., Corradi, D., Iacuitti, G., Signorini, S., Avanzini, F., Pizzetti, F., Maggioni, A. P., Moccetti, T., Metra, M., Cas, L. D., Ghezzi, P., Sipe, J. D., Re, G., Olivetti, G., Mantovani, A., & Latini, R. (2000). PTX3, A Prototypical Long Pentraxin, Is an Early Indicator of Acute Myocardial Infarction in Humans. *Circulation*, 102(6), 636-641. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.6.636>

Pevni, D., Frolkis, I., Shapira, I., Schwartz, D., Yuhas, Y., Schwartz, I. F., Chernichovski, T., & Uretzky, G. (2005). Heparin added to cardioplegic solution inhibits tumor necrosis factor-alpha production and attenuates myocardial ischemic-reperfusion injury. *Chest*, 128(3), 1805-1811. <https://doi.org/10.1378/chest.128.3.1805>

Pinto, A. R., Paolicelli, R., Salimova, E., Gospocic, J., Slonimsky, E., Bilbao-Cortes, D., Godwin, J. W., & Rosenthal, N. A. (2012). An Abundant Tissue Macrophage Population in the Adult Murine Heart with a Distinct Alternatively-Activated Macrophage Profile. *PLoS ONE*, 7(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036814>

Pisetsky, D. S. (2013). The effectors of innate immunity : DAMPs, DAMEs, or DIMEs? *Arthritis Research & Therapy*, 15(5), 123. <https://doi.org/10.1186/ar4363>

Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism : Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603-619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>

Platnich, J. M., & Muruve, D. A. (2019). NOD-like receptors and inflammasomes : A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 670, 4-14. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.02.008>

Poon, S., Easterbrook-Smith, S. B., Rybchyn, M. S., Carver, J. A., & Wilson, M. R. (2000). Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry*, 39(51), 15953-15960. <https://doi.org/10.1021/bi002189x>

Poon, S., Rybchyn, M. S., Easterbrook-Smith, S. B., Carver, J. A., Pankhurst, G. J., & Wilson, M. R. (2002). Mildly Acidic pH Activates the Extracellular Molecular Chaperone Clusterin*.

Journal of Biological Chemistry, 277(42), 39532-39540.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M204855200>

Poulakou, M. V., Paraskevas, K. I., Wilson, M. R., Iliopoulos, D. C., Tsigris, C., Mikhailidis, D. P., & Perrea, D. (2008). Apolipoprotein J and leptin levels in patients with coronary heart disease. *In Vivo (Athens, Greece)*, 22(4), 537-542.

Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction : From Inflammation to Fibrosis. *Circulation Research*, 119(1), 91-112.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>

Preissner, K. T., & Herwald, H. (2017). Extracellular nucleic acids in immunity and cardiovascular responses : Between alert and disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 117(07), 1272-1282. <https://doi.org/10.1160/TH-16-11-0858>

Preusse, C. J., Gebhard, M. M., & Bretschneider, H. J. (1982). Interstitial pH value in the myocardium as indicator of ischemic stress of cardioplegically arrested hearts. *Basic Research in Cardiology*, 77(4), 372-387. <https://doi.org/10.1007/BF02005338>

Prochnow, H., Gollan, R., Rohne, P., Hassemer, M., Koch-Brandt, C., & Baiersdörfer, M. (2013). Non-Secreted Clusterin Isoforms Are Translated in Rare Amounts from Distinct Human mRNA Variants and Do Not Affect Bax-Mediated Apoptosis or the NF-κB Signaling Pathway. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075303>

Przyklenk, K., Bauer, B., Ovize, M., Kloner, R. A., & Whittaker, P. (1993). Regional ischemic « preconditioning » protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation*, 87(3), 893-899. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.87.3.893>

Pucci, S., Mazzarelli, P., Paola, M., Sesti, F., Fabiola, S., Boothman, D. A., David, B. A., Spagnoli, L. G., & Luigi, S. G. (2009). Interleukin-6 affects cell death escaping mechanisms acting on Bax-Ku70-Clusterin interactions in human colon cancer progression. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(3), 473-481. <https://doi.org/10.4161/cc.8.3.7652>

Pye, J., Ardeshirpour, F., McCain, A., Bellinger, D. A., Merricks, E., Adams, J., Elliott, P. J., Pien, C., Fischer, T. H., Baldwin, A. S., & Nichols, T. C. (2003). Proteasome inhibition ablates activation of NF-κB in myocardial reperfusion and reduces reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 284(3), H919-H926.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00851.2002>

Qin, C., Gu, J., Liu, R., Xu, F., Qian, H., He, Q., & Meng, W. (2017). Release of mitochondrial DNA correlates with peak inflammatory cytokines in patients with acute myocardial infarction. *Anatolian Journal of Cardiology*, 17(3), 224-228.
<https://doi.org/10.14744/AnatolJCardiol.2016.7209>

Qin, C.-Y., Zhang, H.-W., Gu, J., Xu, F., Liang, H.-M., Fan, K.-J., Shen, J.-Y., Xiao, Z.-H., Zhang, E.-Y., & Hu, J. (2017). Mitochondrial DNA-induced inflammatory damage contributes to myocardial ischemia reperfusion injury in rats : Cardioprotective role of epigallocatechin. *Molecular Medicine Reports*, 16(5), 7569-7576. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7515>

Qureshi, A., Gurbuz, Y., & Niazi, J. H. (2012). Biosensors for cardiac biomarkers detection : A review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 171-172, 62-76.
<https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.05.077>

- Radic, M., Marion, T., & Monestier, M. (2004). Nucleosomes are exposed at the cell surface in apoptosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(11), 6692-6700. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6692>
- Reddy, K. B., Jin, G., Karode, M. C., Harmony, J. A. K., & Howe, P. H. (1996). Transforming Growth Factor β (TGF β)-Induced Nuclear Localization of Apolipoprotein J/Clusterin in Epithelial Cells [†]. *Biochemistry*, 35(19), 6157-6163. <https://doi.org/10.1021/bi952981b>
- Redondo, M., Villar, E., Torres-Muñoz, J., Tellez, T., Morell, M., & Petito, C. K. (2000). Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *The American Journal of Pathology*, 157(2), 393-399. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64552-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64552-X)
- Reimer, K. A., & Jennings, R. B. (1979). The « wavefront phenomenon » of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 40(6), 633-644.
- Reyes-Retana, J. A., & Duque-Ossa, L. C. (2021). Acute Myocardial Infarction Biosensor : A Review From Bottom Up. *Current Problems in Cardiology*, 46(3), 100739. <https://doi.org/10.1016/j.cpcardiol.2020.100739>
- Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S. D., Kastelein, J. J. P., Cornel, J. H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., ... Glynn, R. J. (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *New England Journal of Medicine*, 377(12), 1119-1131. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1707914>
- Ridker, P. M., Hennekens, C. H., Buring, J. E., & Rifai, N. (2000). C-Reactive Protein and Other Markers of Inflammation in the Prediction of Cardiovascular Disease in Women. *New England Journal of Medicine*, 342(12), 836-843. <https://doi.org/10.1056/NEJM200003233421202>
- Ridker, P. M., Rifai, N., Stampfer, M. J., & Hennekens, C. H. (2000). Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation*, 101(15), 1767-1772. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.15.1767>
- Riedemann, N. C., & Ward, P. A. (2003). Complement in Ischemia Reperfusion Injury. *The American Journal of Pathology*, 162(2), 363-367.
- Riehle, C., & Bauersachs, J. (2019). Key inflammatory mechanisms underlying heart failure. *Herz*, 44(2), 96-106. <https://doi.org/10.1007/s00059-019-4785-8>
- Riley, J. S., & Tait, S. W. (2020). Mitochondrial DNA in inflammation and immunity. *EMBO Reports*, 21(4), e49799. <https://doi.org/10.15252/embr.201949799>
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 18(12), 571-573. <https://doi.org/10.1007/bf02172188>
- Ritschel, V. N., Seljeflot, I., Arnesen, H., Halvorsen, S., Weiss, T., Eritsland, J., & Andersen, G. Ø. (2014). IL-6 signalling in patients with acute ST-elevation myocardial infarction. *Results in Immunology*, 4, 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.rinim.2013.11.002>

- Rizzi, F., & Bettuzzi, S. (2010). The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer*, *17*(1), R1-17. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0140>
- Rizzi, F., Caccamo, A. E., Belloni, L., & Bettuzzi, S. (2009). Clusterin is a short half-life, poly-ubiquitinated protein, which controls the fate of prostate cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, *219*(2), 314-323. <https://doi.org/10.1002/jcp.21671>
- Rizzi, F., Coletta, M., & Bettuzzi, S. (2009). Chapter 2 : Clusterin (CLU): From one gene and two transcripts to many proteins. *Advances in Cancer Research*, *104*, 9-23. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(09\)04002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(09)04002-0)
- Rohne, P., Prochnow, H., & Koch-Brandt, C. (2016). The CLU-files : Disentanglement of a mystery. *Biomolecular Concepts*, *7*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1515/bmc-2015-0026>
- Rohne, P., Prochnow, H., Wolf, S., Renner, B., & Koch-Brandt, C. (2014). The Chaperone Activity of Clusterin is Dependent on Glycosylation and Redox Environment. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *34*(5), 1626-1639. <https://doi.org/10.1159/000366365>
- Rolli, J., Rosenblatt-Velin, N., Li, J., Loukili, N., Levrard, S., Pacher, P., Waeber, B., Feihl, F., Ruchat, P., & Liaudet, L. (2010). Bacterial Flagellin Triggers Cardiac Innate Immune Responses and Acute Contractile Dysfunction. *PLoS ONE*, *5*(9), e12687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012687>
- Rosemblit, N., & Chen, C. L. (1994). Regulators for the rat clusterin gene : DNA methylation and cis-acting regulatory elements. *Journal of Molecular Endocrinology*, *13*(1), 69-76. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0130069>
- Rosenberg, M. E., Girton, R., Finkel, D., Chmielewski, D., Barrie III, A., Witte, D. P., Zhu, G., Bissler, J. J., Harmony, J. A. K., & Aronow, B. J. (2002). Apolipoprotein J/Clusterin Prevents a Progressive Glomerulopathy of Aging. *Molecular and Cellular Biology*, *22*(6), 1893-1902. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.6.1893-1902.2002>
- Ruparelia, N., Chai, J. T., Fisher, E. A., & Choudhury, R. P. (2017). Inflammatory processes in cardiovascular disease : A route to targeted therapies. *Nature reviews. Cardiology*, *14*(3), 133-144. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.185>
- Rus, H., Cudrici, C., & Niculescu, F. (2005). The role of the complement system in innate immunity. *Immunologic Research*, *33*(2), 103-112. <https://doi.org/10.1385/IR:33:2:103>
- Sakata, Y., Dong, J.-W., Vallejo, J. G., Huang, C.-H., Baker, J. S., Tracey, K. J., Tacheuchi, O., Akira, S., & Mann, D. L. (2007). Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *292*(1), H503-H509. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00642.2006>
- Salehi, M., Akbari, H., Heidari, M. H., Molouki, A., Murulitharan, K., Moeini, H., Novin, M. G., Aabed, F., Taheri, H., Fadaei, F., Mohsenzadeh, M., Jafari, M., Pirouzi, A., & Heidari, R. (2013). Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Molecular Reproduction and Development*, *80*(9), 718-724. <https://doi.org/10.1002/mrd.22202>
- Salio, M., Chimenti, S., De Angelis, N., Molla, F., Maina, V., Nebuloni, M., Pasqualini, F., Latini, R., Garlanda, C., & Mantovani, A. (2008). Cardioprotective Function of the Long

Pentraxin PTX3 in Acute Myocardial Infarction. *Circulation*, 117(8), 1055-1064. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.749234>

Salloum, F. N., Chau, V., Varma, A., Hoke, N. N., Toldo, S., Biondi-Zoccai, G. G. L., Crea, F., Vetovec, G. W., & Abbate, A. (2009). Anakinra in experimental acute myocardial infarction—Does dosage or duration of treatment matter? *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 23(2), 129-135. <https://doi.org/10.1007/s10557-008-6154-3>

Sandanger, Ø., Ranheim, T., Vinge, L. E., Bliksøen, M., Alfsnes, K., Finsen, A. V., Dahl, C. P., Askevold, E. T., Florholmen, G., Christensen, G., Fitzgerald, K. A., Lien, E., Valen, G., Espevik, T., Aukrust, P., & Yndestad, A. (2013). The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia–reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 99(1), 164-174. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt091>

Sarkar, S., Sinha, R., Chaudhury, A. R., Maduwage, K., Abeyagunawardena, A., Bose, N., Pradhan, S., Bresolin, N. L., Garcia, B. A., & McCulloch, M. (2021). Snake bite associated with acute kidney injury. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 36(12), 3829-3840. <https://doi.org/10.1007/s00467-020-04911-x>

Satoh, M., Shimoda, Y., Akatsu, T., Ishikawa, Y., Minami, Y., & Nakamura, M. (2006). Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction. *European Journal of Heart Failure*, 8(8), 810-815. <https://doi.org/10.1016/j.ejheart.2006.03.004>

Savchenko, A. S., Borissoff, J. I., Martinod, K., De Meyer, S. F., Gallant, M., Erpenbeck, L., Brill, A., Wang, Y., & Wagner, D. D. (2014). VWF-mediated leukocyte recruitment with chromatin decondensation by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood*, 123(1), 141-148. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-07-514992>

Scaffidi, P., Misteli, T., & Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894), 191-195. <https://doi.org/10.1038/nature00858>

Schaller, S., Paradis, S., Ngoh, G. A., Assaly, R., Buisson, B., Drouot, C., Ostuni, M. A., Lacapere, J.-J., Bassissi, F., Bordet, T., Berdeaux, A., Jones, S. P., Morin, D., & Pruss, R. M. (2010). TRO40303, a New Cardioprotective Compound, Inhibits Mitochondrial Permeability Transition. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 333(3), 696-706. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.167486>

Schaper, W., Gorge, G., Winkler, B., & Schaper, J. (1988). The collateral circulation of the heart. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 31(1), 57-77. [https://doi.org/10.1016/0033-0620\(88\)90011-4](https://doi.org/10.1016/0033-0620(88)90011-4)

Schiopu, A., & Cotoi, O. S. (2013). S100A8 and S100A9 : DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease. *Mediators of Inflammation*, 2013, 828354. <https://doi.org/10.1155/2013/828354>

Schmidt, A. M., Vianna, M., Gerlach, M., Brett, J., Ryan, J., Kao, J., Esposito, C., Hegarty, H., Hurley, W., & Clauss, M. (1992). Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial

cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 267(21), 14987-14997. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42137-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42137-0)

Schmidt, M. R., Smerup, M., Konstantinov, I. E., Shimizu, M., Li, J., Cheung, M., White, P. A., Kristiansen, S. B., Sorensen, K., Dzavik, V., Redington, A. N., & Kharbanda, R. K. (2007). Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a K_{ATP}-dependent mechanism: First demonstration of remote ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 292(4), H1883-H1890. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00617.2006>

Schömig, A., Mehilli, J., Antoniucci, D., Ndrepepa, G., Markwardt, C., Di Pede, F., Nekolla, S. G., Schlotterbeck, K., Schühlen, H., Pache, J., Seyfarth, M., Martinoff, S., Benzer, W., Schmitt, C., Dirschinger, J., Schwaiger, M., Kastrati, A., & Beyond 12 hours Reperfusion AlternatiVe Evaluation (BRAVE-2) Trial Investigators. (2005). Mechanical reperfusion in patients with acute myocardial infarction presenting more than 12 hours from symptom onset: A randomized controlled trial. *JAMA*, 293(23), 2865-2872. <https://doi.org/10.1001/jama.293.23.2865>

Schoneveld, A. H., Hoefler, I., Sluijter, J. P. G., Laman, J. D., de Kleijn, D. P. V., & Pasterkamp, G. (2008). Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness. *Atherosclerosis*, 197(1), 95-104. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2007.08.004>

Schwartz, L. M., & Lagranha, C. J. (2006). Ischemic postconditioning during reperfusion activates Akt and ERK without protecting against lethal myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 290(3), H1011-H1018. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00864.2005>

Schwochau, G. B., Nath, K. A., & Rosenberg, M. E. (1998). Clusterin protects against oxidative stress in vitro through aggregative and nonaggregative properties. *Kidney International*, 53(6), 1647-1653. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1998.00902.x>

Selkoe, D. J. (2004). Alzheimer Disease: Mechanistic Understanding Predicts Novel Therapies. *Annals of Internal Medicine*, 140(8), 627-638. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00047>

Sensibar, J. A., Sutkowski, D. M., Raffo, A., Buttyan, R., Griswold, M. D., Sylvester, S. R., Kozlowski, J. M., & Lee, C. (1995). Prevention of Cell Death Induced by Tumor Necrosis Factor α in LNCaP Cells by Overexpression of Sulfated Glycoprotein-2 (Clusterin). *Cancer Research*, 55(11), 2431-2437.

Shah, M., He, Z., Rauf, A., Beikoghli Kalkhoran, S., Heiestad, C. M., Stensløyken, K.-O., Parish, C. R., Soehnlein, O., Arjun, S., Davidson, S. M., & Yellon, D. (2022). Extracellular histones are a target in myocardial ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovascular Research*, 118(4), 1115-1125. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab139>

Shah, M., Yellon, D. M., & Davidson, S. M. (2020). The Role of Extracellular DNA and Histones in Ischaemia-Reperfusion Injury of the Myocardium. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 34(1), 123-131. <https://doi.org/10.1007/s10557-020-06946-6>

Shannan, B., Seifert, M., Leskov, K., Willis, J., Boothman, D., Tilgen, W., & Reichrath, J. (2006). Challenge and promise: Roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death & Differentiation*, 13(1), 1. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401779>

- Shimamoto Akira, Chong Albert J., Yada Masaki, Shomura Shin, Takayama Hiroo, Fleisig Ani J., Agnew Matthew L., Hampton Craig R., Rothnie Christine L., Spring Denise J., Pohlman Timothy H., Shimpo Hideto, & Verrier Edward D. (2006). Inhibition of Toll-like Receptor 4 With Eritoran Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Circulation*, *114*(1_supplement), I-270. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000901>
- Shin, S. H., Joo, H. W., Kim, M. K., Kim, J. C., & Sung, Y. K. (2012). Extracellular histones inhibit hair shaft elongation in cultured human hair follicles and promote regression of hair follicles in mice. *Experimental Dermatology*, *21*(12), 956-958. <https://doi.org/10.1111/exd.12033>
- Shinagawa, H., & Frantz, S. (2015). Cellular immunity and cardiac remodeling after myocardial infarction : Role of neutrophils, monocytes, and macrophages. *Current Heart Failure Reports*, *12*(3), 247-254. <https://doi.org/10.1007/s11897-015-0255-7>
- Shinde, A. V., & Frangogiannis, N. G. (2014). Fibroblasts in myocardial infarction : A role in inflammation and repair. *Journal of molecular and cellular cardiology*, *0*, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.11.015>
- Silk, E., Zhao, H., Weng, H., & Ma, D. (2017). The role of extracellular histone in organ injury. *Cell Death & Disease*, *8*(5), e2812. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.52>
- Silkensen, J. R., Hirsch, A. T., Lunzer, M. M., Chmielewski, D., Manivel, J. C., Muellerleile, M. R., & Rosenberg, M. E. (1998). Temporal induction of clusterin in the peri-infarct zone after experimental myocardial infarction in the rat. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *131*(1), 28-35. [https://doi.org/10.1016/S0022-2143\(98\)90074-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2143(98)90074-9)
- Silvestre-Roig, C., Braster, Q., Wichapong, K., Lee, E. Y., Teulon, J. M., Berrebeh, N., Winter, J., Adrover, J. M., Santos, G. S., Froese, A., Lemnitzer, P., Ortega-Gómez, A., Chevre, R., Marschner, J., Schumski, A., Winter, C., Perez-Olivares, L., Pan, C., Paulin, N., ... Soehnlein, O. (2019). Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature*, *569*(7755), 236-240. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1167-6>
- Silvis, M. J. M., Kaffka genaamd Dengler, S. E., Odille, C. A., Mishra, M., van der Kaaij, N. P., Doevendans, P. A., Sluijter, J. P. G., de Kleijn, D. P. V., de Jager, S. C. A., Bosch, L., & van Hout, G. P. J. (2020). Damage-Associated Molecular Patterns in Myocardial Infarction and Heart Transplantation : The Road to Translational Success. *Frontiers in Immunology*, *11*, 599511. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599511>
- Sims, J. E., & Smith, D. E. (2010). The IL-1 family : Regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*, *10*(2), 89-102. <https://doi.org/10.1038/nri2691>
- Sivaraman, V., Mudalgiri, N. R., Salvo, C., Kolvekar, S., Hayward, M., Yap, J., Keogh, B., Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2007). Postconditioning protects human atrial muscle through the activation of the RISK pathway. *Basic Research in Cardiology*, *102*(5), 453-459. <https://doi.org/10.1007/s00395-007-0664-1>
- Skyschally, A., Caster, P., Iliodromitis, E. K., Schulz, R., Kremastinos, D. T., & Heusch, G. (2009). Ischemic postconditioning : Experimental models and protocol algorithms. *Basic Research in Cardiology*, *104*(5), 469-483. <https://doi.org/10.1007/s00395-009-0040-4>

Skyschally, A., Schulz, R., & Heusch, G. (2010). Cyclosporine A at Reperfusion Reduces Infarct Size in Pigs. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 24(1), 85-87. <https://doi.org/10.1007/s10557-010-6219-y>

Soehnlein, O., & Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews. Immunology*, 10(6), 427-439. <https://doi.org/10.1038/nri2779>

Song, H., Zhou, H., Qu, Z., Hou, J., Chen, W., Cai, W., Cheng, Q., Chuang, D. Y., Chen, S., Li, S., Li, J., Cheng, J., Greenlief, C. M., Lu, Y., Simonyi, A., Sun, G. Y., Wu, C., Cui, J., & Gu, Z. (2019). From Analysis of Ischemic Mouse Brain Proteome to Identification of Human Serum Clusterin as a Potential Biomarker for Severity of Acute Ischemic Stroke. *Translational Stroke Research*, 10(5), 546-556. <https://doi.org/10.1007/s12975-018-0675-2>

Sosunov, E. A., Anyukhovskiy, E. P., Sosunov, A. A., Moshnikova, A., Wijesinghe, D., Engelman, D. M., Reshetnyak, Y. K., & Andreev, O. A. (2013). PH (low) insertion peptide (pHLIP) targets ischemic myocardium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(1), 82-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220038110>

Spinale, F. G., Schulte, B. A., & Crawford, F. A. (1989). Demonstration of early ischemic injury in porcine right ventricular myocardium. *The American Journal of Pathology*, 134(3), 693-704.

Squadrito, F., Altavilla, D., Squadrito, G., Saitta, A., Deodato, B., Arlotta, M., Minutoli, L., Quartarone, C., Ferlito, M., & Caputi, A. P. (2000). Tacrolimus Limits Polymorphonuclear Leucocyte Accumulation and Protects Against Myocardial Ischaemia– Reperfusion Injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(3), 429-440. <https://doi.org/10.1006/jmcc.1999.1089>

Squadrito, F., Deodato, B., Squadrito, G., Seminara, P., Passaniti, M., Venuti, F. S., Giacca, M., Minutoli, L., Adamo, E. B., Bellomo, M., Marini, R., Galeano, M., Marini, H., & Altavilla, D. (2003). Gene Transfer of I κ B α Limits Infarct Size in a Mouse Model of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Laboratory Investigation*, 83(8), 8. <https://doi.org/10.1097/01.LAB.0000082060.39079.A6>

Stansfield, W. E., Moss, N. C., Willis, M. S., Tang, R., & Selzman, C. H. (2007). Proteasome Inhibition Attenuates Infarct Size and Preserves Cardiac Function in a Murine Model of Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *The Annals of Thoracic Surgery*, 84(1), 120-125. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2007.02.049>

Sudakov, N. P., Apartsin, K. A., Lepekhova, S. A., Nikiforov, S. B., Katyshev, A. I., Lifshits, G. I., Vybivantseva, A. V., & Konstantinov, Y. M. (2017). The level of free circulating mitochondrial DNA in blood as predictor of death in case of acute coronary syndrome. *European Journal of Medical Research*, 22, 1. <https://doi.org/10.1186/s40001-016-0241-x>

Sun, B., Zhang, S., Zhang, D., Liu, Y., Li, Y., Rong, Z., Zhu, Y., & Jia, X. (2007). Clusterin is associated with spontaneous breast cancer in TA2 mice. *FEBS Letters*, 581(17), 3277-3282. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.06.021>

Sun, Q., Wang, K.-K., Pan, M., Zhou, J.-P., Qiu, X.-T., Wang, Z.-Y., Yang, Z., Chen, Y., Shen, H., Gu, Q.-L., Fang, L.-H., Zhang, G.-G., & Bai, Y.-P. (2018). A minimally invasive approach to induce myocardial infarction in mice without thoracotomy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(11), 5208-5219. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13708>

- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P.-Y. (2019). The NLRP3 inflammasome : Molecular activation and regulation to therapeutics. *Nature reviews. Immunology*, *19*(8), 477-489. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>
- Swertfeger, D. K., Witte, D. P., Stuart, W. D., Rockman, H. A., & Harmony, J. A. (1996). Apolipoprotein J/clusterin induction in myocarditis : A localized response gene to myocardial injury. *The American Journal of Pathology*, *148*(6), 1971-1983.
- Swirski, F. K., & Nahrendorf, M. (2013). Leukocyte behavior in atherosclerosis, myocardial infarction, and heart failure. *Science (New York, N.Y.)*, *339*(6116), 161-166. <https://doi.org/10.1126/science.1230719>
- Takagi, H., Matsui, Y., & Sadoshima, J. (2007). The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart. *Antioxidants & Redox Signaling*, *9*(9), 1373-1381. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1689>
- Takahashi, K., Fukushima, S., Yamahara, K., Yashiro, K., Shintani, Y., Coppens, S. R., Salem, H. K., Brouillette, S. W., Yacoub, M. H., & Suzuki, K. (2008). Modulated inflammation by injection of high-mobility group box 1 recovers post-infarction chronically failing heart. *Circulation*, *118*(14 Suppl), S106-114. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.757443>
- Tamarelle, S., Ghaboura, N., Treguer, F., Khachman, D., Croué, A., Henrion, D., Furber, A., & Prunier, F. (2009). Myocardial reperfusion injury management : Erythropoietin compared with postconditioning. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *297*(6), H2035-2043. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00472.2009>
- Tanaka, M., Brooks, S. E., Richard, V. J., FitzHarris, G. P., Stoler, R. C., Jennings, R. B., Arfors, K. E., & Reimer, K. A. (1993). Effect of anti-CD18 antibody on myocardial neutrophil accumulation and infarct size after ischemia and reperfusion in dogs. *Circulation*, *87*(2), 526-535. <https://doi.org/10.1161/01.cir.87.2.526>
- Tanonaka, K., Yoshida, H., Toga, W., Furuhashi, K., & Takeo, S. (2001). Myocardial heat shock proteins during the development of heart failure. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *283*(2), 520-525. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4801>
- Tatematsu, M., Funami, K., Seya, T., & Matsumoto, M. (2018). Extracellular RNA Sensing by Pattern Recognition Receptors. *Journal of Innate Immunity*, *10*(5-6), 398-406. <https://doi.org/10.1159/000494034>
- Tellez, T., Garcia-Aranda, M., & Redondo, M. (2016). The Role of Clusterin in Carcinogenesis and its Potential Utility as Therapeutic Target. *Current Medicinal Chemistry*, *23*(38), 4297-4308. <https://doi.org/10.2174/0929867323666161024150540>
- ter Horst, E. N., Hakimzadeh, N., van der Laan, A. M., Krijnen, P. A. J., Niessen, H. W. M., & Piek, J. J. (2015). Modulators of Macrophage Polarization Influence Healing of the Infarcted Myocardium. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 29583-29591. <https://doi.org/10.3390/ijms161226187>
- ter Horst, E. N., Krijnen, P. A. J., Hakimzadeh, N., Robbers, L. F. H. J., Hirsch, A., Nijveldt, R., Lommerse, I., Fontijn, R. D., Meijster, E., Delewi, R., van Royen, N., Zijlstra, F., van Rossum, A. C., van der Schoot, C. E., van der Pijl, T. C. T. M., Horrevoets, A. J., van

- der Laan, A. M., Niessen, H. W. M., & Piek, J. J. (2019). Elevated monocyte-specific type I interferon signalling correlates positively with cardiac healing in myocardial infarct patients but interferon alpha application deteriorates myocardial healing in rats. *Basic Research in Cardiology*, *114*(1), 1. <https://doi.org/10.1007/s00395-018-0709-7>
- Thomas-Salgar, S., & Millis, A. J. (1994). Clusterin expression in differentiating smooth muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *269*(27), 17879-17885.
- Thourani, V. H., Brar, S. S., Kennedy, T. P., Thornton, L. R., Watts, J. A., Ronson, R. S., Zhao, Z. Q., Sturrock, A. L., Hoidal, J. R., & Vinten-Johansen, J. (2000). Nonanticoagulant heparin inhibits NF-kappaB activation and attenuates myocardial reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *278*(6), H2084-2093. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2000.278.6.H2084>
- Thygesen, K., Alpert, J. S., Jaffe, A. S., Chaitman, B. R., Bax, J. J., Morrow, D. A., White, H. D., & The Executive Group on behalf of the Joint European Society of Cardiology (ESC)/American College of Cardiology (ACC)/American Heart Association (AHA)/World Heart Federation (WHF) Task Force for the Universal Definition of Myocardial Infarction. (2018). Fourth Universal Definition of Myocardial Infarction (2018). *Circulation*, *138*(20). <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000617>
- Tian, J., Guo, X., Liu, X.-M., Liu, L., Weng, Q.-F., Dong, S.-J., Knowlton, A. A., Yuan, W.-J., & Lin, L. (2013). Extracellular HSP60 induces inflammation through activating and up-regulating TLRs in cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, *98*(3), 391-401. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvt047>
- Tian, Y., Charles, E. J., Yan, Z., Wu, D., French, B. A., Kron, I. L., & Yang, Z. (2019). The myocardial infarct-exacerbating effect of cell-free DNA is mediated by HMGB1-RAGE-TLR9 pathway. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, *157*(6), 2256-2269.e3. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2018.09.043>
- Timmers, L., Pasterkamp, G., de Hoog, V. C., Arslan, F., Appelman, Y., & de Kleijn, D. P. V. (2012). The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovascular Research*, *94*(2), 276-283. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs018>
- Tissières, A., Mitchell, H. K., & Tracy, U. M. (1974). Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* : Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology*, *84*(3), 389-398. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(74\)90447-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(74)90447-1)
- Toldo, S., & Abbate, A. (2018). The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction. *Nature Reviews Cardiology*, *15*(4), 203-214. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.161>
- Toldo, S., Mauro, A. G., Cutter, Z., Van Tassel, B. W., Mezzaroma, E., Del Buono, M. G., Prestamburgo, A., Potere, N., & Abbate, A. (2019). The NLRP3 Inflammasome Inhibitor, OLT1177 (Dapansutrile), Reduces Infarct Size and Preserves Contractile Function After Ischemia Reperfusion Injury in the Mouse. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *73*(4), 215-222. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000658>
- Toss, H., Lindahl, B., Siegbahn, A., Wallentin, L., & Group, for the F. S. (1997). Prognostic Influence of Increased Fibrinogen and C-Reactive Protein Levels in Unstable Coronary Artery Disease. *Circulation*, *96*(12), 4204-4210. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.96.12.4204>

- Traxler, D., Spannbauer, A., Einzinger, P., Mester-Tonczar, J., Lukovic, D., Winkler, J., Zlabinger, K., Gugerell, A., Mandic, L., Gyöngyösi, M., & Pavo, N. (2020). Early Elevation of Systemic Plasma Clusterin after Reperfused Acute Myocardial Infarction in a Preclinical Porcine Model of Ischemic Heart Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(13), 4591. <https://doi.org/10.3390/ijms21134591>
- Trougakos, I. P., & Gonos, E. S. (2002). Clusterin/Apolipoprotein J in human aging and cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *34*(11), 1430-1448. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00041-9)
- Trougakos, I. P., Lourda, M., Antonelou, M. H., Kletsas, D., Gorgoulis, V. G., Papassideri, I. S., Zou, Y., Margaritis, L. H., Boothman, D. A., & Gonos, E. S. (2009). Intracellular Clusterin Inhibits Mitochondrial Apoptosis by Suppressing p53-Activating Stress Signals and Stabilizing the Cytosolic Ku70-Bax Protein Complex. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, *15*(1), 48-59. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1805>
- Trougakos, I. P., Poulakou, M., Stathatos, M., Chalikia, A., Melidonis, A., & Gonos, E. S. (2002). Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction. *Experimental Gerontology*, *37*(10-11), 1175-1187. [https://doi.org/10.1016/s0531-5565\(02\)00139-0](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(02)00139-0)
- Tschopp, J., Chonn, A., Hertig, S., & French, L. E. (1993). Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *The Journal of Immunology*, *151*(4), 2159-2165.
- Tsung, A., Tohme, S., & Billiar, T. R. (2014). High-mobility group box-1 in sterile inflammation. *Journal of Internal Medicine*, *276*(5), 425-443. <https://doi.org/10.1111/joim.12276>
- Tu, G., Zou, L., Liu, S., Wu, B., Lv, Q., Wang, S., Xue, Y., Zhang, C., Yi, Z., Zhang, X., Li, G., & Liang, S. (2016). Long noncoding NONRATT021972 siRNA normalized abnormal sympathetic activity mediated by the upregulation of P2X7 receptor in superior cervical ganglia after myocardial ischemia. *Purinergic Signalling*, *12*(3), 521-535. <https://doi.org/10.1007/s11302-016-9518-3>
- Turkieh, A., Fertin, M., Bouvet, M., Mulder, P., Drobecq, H., Lemesle, G., Lamblin, N., de Groote, P., Porouchani, S., Chwastyniak, M., Beseme, O., Amouyel, P., Mouquet, F., Balligand, J.-L., Richard, V., Bauters, C., & Pinet, F. (2018). Expression and Implication of Clusterin in Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *Circulation. Heart Failure*, *11*(6), e004838. <https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004838>
- Urban, J., Parczyk, K., Leutz, A., Kayne, M., & Kondor-Koch, C. (1987). Constitutive apical secretion of an 80-kD sulfated glycoprotein complex in the polarized epithelial Madin-Darby canine kidney cell line. *The Journal of Cell Biology*, *105*(6 Pt 1), 2735-2743. <https://doi.org/10.1083/jcb.105.6.2735>
- van Hout, G. P. J., Bosch, L., Ellenbroek, G. H. J. M., de Haan, J. J., van Solinge, W. W., Cooper, M. A., Arslan, F., de Jager, S. C. A., Robertson, A. A. B., Pasterkamp, G., & Hoefer, I. E. (2017). The selective NLRP3-inflammasome inhibitor MCC950 reduces infarct size and

preserves cardiac function in a pig model of myocardial infarction. *European Heart Journal*, 38(11), 828-836. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw247>

van Marion, D. M. S., Dorsch, L., Hoogstra-Berends, F., Kakuchaya, T., Bockeria, L., de Groot, N. M. S., & Brundel, B. J. J. M. (2020). Oral geranylgeranylacetone treatment increases heat shock protein expression in human atrial tissue. *Heart Rhythm*, 17(1), 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2019.07.010>

Varda-Bloom, N., Leor, J., Ohad, D. G., Hasin, Y., Amar, M., Fixler, R., Battler, A., Eldar, M., & Hasin, D. (2000). Cytotoxic T lymphocytes are activated following myocardial infarction and can recognize and kill healthy myocytes in vitro. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 32(12), 2141-2149. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2000.1261>

Vogel, B., Shinagawa, H., Hofmann, U., Ertl, G., & Frantz, S. (2015). Acute DNase1 treatment improves left ventricular remodeling after myocardial infarction by disruption of free chromatin. *Basic Research in Cardiology*, 110(2), 15. <https://doi.org/10.1007/s00395-015-0472-y>

Volz, H. C., Laohachewin, D., Seidel, C., Lasitschka, F., Keilbach, K., Wienbrandt, A. R., Andrassy, J., Bierhaus, A., Kaya, Z., Katus, H. A., & Andrassy, M. (2012). S100A8/A9 aggravates post-ischemic heart failure through activation of RAGE-dependent NF-κB signaling. *Basic Research in Cardiology*, 107(2), 250. <https://doi.org/10.1007/s00395-012-0250-z>

Wang, H., Bloom, O., Zhang, M., Vishnubhakat, J. M., Ombrellino, M., Che, J., Frazier, A., Yang, H., Ivanova, S., Borovikova, L., Manogue, K. R., Faist, E., Abraham, E., Andersson, J., Andersson, U., Molina, P. E., Abumrad, N. N., Sama, A., & Tracey, K. J. (1999). HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5425), 248-251. <https://doi.org/10.1126/science.285.5425.248>

Wang, L., Xie, L., Zhang, Q., Cai, X., Tang, Y., Wang, L., Hang, T., Liu, J., & Gong, J. (2015). Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in acute myocardial infarction patients. *Coronary Artery Disease*, 26(4), 296-300. <https://doi.org/10.1097/MCA.0000000000000231>

Wang, Q., Wu, J., Zeng, Y., Chen, K., Wang, C., Yang, S., Sun, N., Chen, H., Duan, K., & Zeng, G. (2020). Pyroptosis : A pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 510, 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.06.044>

Wang, Y., Abarbanell, A. M., Herrmann, J. L., Weil, B. R., Poynter, J., Manukyan, M. C., Crisostomo, P. R., & Meldrum, D. R. (2010). Toll-Like Receptor Signaling Pathways and the Evidence Linking Toll-Like Receptor Signaling to Cardiac Ischemia/Reperfusion Injury. *Shock*, 34(6), 548–557. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181e686f5>

Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., & Coonrod, S. A. (2009). Histone hypercitruination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *The Journal of Cell Biology*, 184(2), 205-213. <https://doi.org/10.1083/jcb.200806072>

Wehrli, P., Charnay, Y., Vallet, P., Zhu, G., Harmony, J., Aronow, B., Tschopp, J., Bouras, C., Viard-Leveugle, I., French, L. E., & Giannakopoulos, P. (2001). Inhibition of post-ischemic

- brain injury by clusterin overexpression. *Nature Medicine*, 7(9), 9. <https://doi.org/10.1038/nm0901-977>
- Weigt, S. S., Palchevskiy, V., & Belperio, J. A. (2017). Inflammasomes and IL-1 biology in the pathogenesis of allograft dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(6), 2022-2029. <https://doi.org/10.1172/JCI93537>
- Weirather, J., Hofmann, U. D. W., Beyersdorf, N., Ramos, G. C., Vogel, B., Frey, A., Ertl, G., Kerkau, T., & Frantz, S. (2014). Foxp3+ CD4+ T Cells Improve Healing After Myocardial Infarction by Modulating Monocyte/Macrophage Differentiation. *Circulation Research*, 115(1), 55-67. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303895>
- Weng, X., Zhao, H., Guan, Q., Shi, G., Feng, S., Gleave, M. E., Nguan, C. C., & Du, C. (2021). Clusterin regulates macrophage expansion, polarization and phagocytic activity in response to inflammation in the kidneys. *Immunology and Cell Biology*, 99(3), 274-287. <https://doi.org/10.1111/imcb.12405>
- Wilson, M. R., Satapathy, S., Jeong, S., & Fini, M. E. (2021). Clusterin, other extracellular chaperones, and eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 101032. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.101032>
- Wilson, M. R., & Zoubeidi, A. (2017). Clusterin as a therapeutic target. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 21(2), 201-213. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1267142>
- Won, J. C., Park, C.-Y., Oh, S. W., Lee, E. S., Youn, B.-S., & Kim, M.-S. (2014). Plasma clusterin (ApoJ) levels are associated with adiposity and systemic inflammation. *PloS One*, 9(7), e103351. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103351>
- Wong, P., Pineault, J., Lakins, J., Taillefer, D., Léger, J., Wang, C., & Tenniswood, M. (1993). Genomic organization and expression of the rat TRPM-2 (clusterin) gene, a gene implicated in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 268(7), 5021-5031. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53497-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53497-9)
- Wong, P., Taillefer, D., Lakins, J., Pineault, J., Chader, G., & Tenniswood, M. (1994). Molecular characterization of human TRPM-2/clusterin, a gene associated with sperm maturation, apoptosis and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*, 221(3), 917-925. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18807.x>
- Wyatt, A. R., Yerbury, J. J., Berghofer, P., Greguric, I., Katsifis, A., Dobson, C. M., & Wilson, M. R. (2011). Clusterin facilitates in vivo clearance of extracellular misfolded proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(23), 3919-3931. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0684-8>
- Xie, J., Méndez, J. D., Méndez-Valenzuela, V., & Aguilar-Hernández, M. M. (2013). Cellular signalling of the receptor for advanced glycation end products (RAGE). *Cellular Signalling*, 25(11), 2185-2197. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2013.06.013>
- Xie, L., Liu, S., Cheng, J., Wang, L., Liu, J., & Gong, J. (2017). Exogenous administration of mitochondrial DNA promotes ischemia reperfusion injury via TLR9-p38 MAPK pathway. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 89, 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.028>

- Xu, J., Zhang, X., Monestier, M., Esmon, N. L., & Esmon, C. T. (2011). Extracellular histones are mediators of death through TLR2 and TLR4 in mouse fatal liver injury. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(5), 2626-2631. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003930>
- Xu, J., Zhang, X., Pelayo, R., Monestier, M., Ammollo, C. T., Semeraro, F., Taylor, F. B., Esmon, N. L., Lupu, F., & Esmon, C. T. (2009). Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature Medicine*, 15(11), 1318-1321. <https://doi.org/10.1038/nm.2053>
- Yadav, S., Gupta, S., Selvaraj, C., Doharey, P. K., Verma, A., Singh, S. K., & Saxena, J. K. (2014). In silico and in vitro studies on the protein-protein interactions between *Brugia malayi* immunomodulatory protein calreticulin and human C1q. *PloS One*, 9(9), e106413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106413>
- Yan, X., Anzai, A., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, K., Endo, J., Yamamoto, T., Takeshima, A., Shinmura, K., Shen, W., Fukuda, K., & Sano, M. (2013). Temporal dynamics of cardiac immune cell accumulation following acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 62, 24-35. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.04.023>
- Yang, C. R., Yeh, S., Leskov, K., Odegaard, E., Hsu, H. L., Chang, C., Kinsella, T. J., Chen, D. J., & Boothman, D. A. (1999). Isolation of Ku70-binding proteins (KUBs). *Nucleic Acids Research*, 27(10), 2165-2174. <https://doi.org/10.1093/nar/27.10.2165>
- Yang, C.-R., Leskov, K., Hosley-Eberlein, K., Criswell, T., Pink, J. J., Kinsella, T. J., & Boothman, D. A. (2000). Nuclear clusterin/XIP8, an x-ray-induced Ku70-binding protein that signals cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(11), 5907-5912.
- Yang, X., Li, L., Liu, J., Lv, B., & Chen, F. (2016). Extracellular histones induce tissue factor expression in vascular endothelial cells via TLR and activation of NF- κ B and AP-1. *Thrombosis Research*, 137, 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2015.10.012>
- Yang, X.-M., Proctor, J. B., Cui, L., Krieg, T., Downey, J. M., & Cohen, M. V. (2004). Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(5), 1103-1110. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2004.05.060>
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial Reperfusion Injury. *The New England Journal of Medicine*, 15.
- Yerbury, J. J., Poon, S., Meehan, S., Thompson, B., Kumita, J. R., Dobson, C. M., & Wilson, M. R. (2007). The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21(10), 2312-2322. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7986com>
- Yerbury, J. J., Stewart, E. M., Wyatt, A. R., & Wilson, M. R. (2005). Quality control of protein folding in extracellular space. *EMBO Reports*, 6(12), 1131-1136. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400586>

- Yom, C. K., Woo, H.-Y., Min, S. Y., Kang, S. Y., & Kim, H. S. (2009). Clusterin Overexpression and Relapse-free Survival in Breast Cancer. *Anticancer Research*, 29(10), 3909-3912.
- Yu, Y.-R. A., O’Koren, E. G., Hotten, D. F., Kan, M. J., Kopin, D., Nelson, E. R., Que, L., & Gunn, M. D. (2016). A Protocol for the Comprehensive Flow Cytometric Analysis of Immune Cells in Normal and Inflamed Murine Non-Lymphoid Tissues. *PLoS ONE*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150606>
- Zalata, A., El-Samanoudy, A. Z., Shaalan, D., El-Baiomy, Y., Taymour, M., & Mostafa, T. (2012). Seminal clusterin gene expression associated with seminal variables in fertile and infertile men. *The Journal of Urology*, 188(4), 1260-1264. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.06.012>
- Zeerleder, S., Stephan, F., Emonts, M., de Kleijn, E. D., Esmon, C. T., Varadi, K., Hack, C. E., & Hazelzet, J. A. (2012). Circulating nucleosomes and severity of illness in children suffering from meningococcal sepsis treated with protein C. *Critical Care Medicine*, 40(12), 3224-3229. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318265695f>
- Zeerleder, S., Zwart, B., Wuillemin, W. A., Aarden, L. A., Groeneveld, A. B. J., Caliezi, C., van Nieuwenhuijze, A. E. M., van Mierlo, G. J., Eerenberg, A. J. M., Lämmle, B., & Hack, C. E. (2003). Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Critical Care Medicine*, 31(7), 1947-1951. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000074719.40109.95>
- Zellweger, T., Kiyama, S., Chi, K., Miyake, H., Adomat, H., Skov, K., & Gleave, M. e. (2003). Overexpression of the cytoprotective protein clusterin decreases radiosensitivity in the human LNCaP prostate tumour model. *BJU International*, 92(4), 463-469. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410X.2003.04349.x>
- Zhang, F., Kumano, M., Beraldi, E., Fazli, L., Du, C., Moore, S., Sorensen, P., Zoubeidi, A., & Gleave, M. E. (2014). Clusterin facilitates stress-induced lipidation of LC3 and autophagosome biogenesis to enhance cancer cell survival. *Nature Communications*, 5, 5775. <https://doi.org/10.1038/ncomms6775>
- Zhang, H., Kim, J. K., Edwards, C. A., Xu, Z., Taichman, R., & Wang, C.-Y. (2005). Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nature Cell Biology*, 7(9), 909-915. <https://doi.org/10.1038/ncb1291>
- Zhang, P., Cox, C. J., Alvarez, K. M., & Cunningham, M. W. (2009). Cutting Edge : Cardiac Myosin Activates Innate Immune Responses through Toll-like Receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(1), 27-31. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0800861>
- Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., & Hauser, C. J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 464(7285), 104-107. <https://doi.org/10.1038/nature08780>
- Zhang, Q., Zhou, W., Kundu, S., Jang, T. L., Yang, X., Pins, M., Smith, N., Jovanovic, B., Xin, D., Liang, L., Guo, Y., & Lee, C. (2006). The leader sequence triggers and enhances several functions of clusterin and is instrumental in the progression of human prostate cancer in vivo and in vitro. *BJU International*, 98(2), 452-460. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2006.06263.x>

- Zhang, X. Q., Tang, R., Li, L., Szucsik, A., Javan, H., Saegusa, N., Spitzer, K. W., & Selzman, C. H. (2013). Cardiomyocyte-specific p65 NF- κ B deletion protects the injured heart by preservation of calcium handling. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 305(7), H1089-H1097. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00067.2013>
- Zhang, Y., Zhao, Z., Guan, L., Mao, L., Li, S., Guan, X., Chen, M., Guo, L., Ding, L., Cong, C., Wen, T., & Zhao, J. (2014). N-Acetyl-Heparin Attenuates Acute Lung Injury Caused by Acid Aspiration Mainly by Antagonizing Histones in Mice. *PLoS ONE*, 9(5), e97074. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097074>
- Zhao, Z. (2000). Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovascular Research*, 45(3), 651-660. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00354-5](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00354-5)
- Zhao, Z. Q., Velez, D. A., Wang, N. P., Hewan-Lowe, K. O., Nakamura, M., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2001). Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, 6(4), 279-290. <https://doi.org/10.1023/a:1011335525219>
- Zhao, Z.-Q., Corvera, J. S., Halkos, M. E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 285(2), H579-H588. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01064.2002>
- Zheng, Y., Gardner, S. E., & Clarke, M. C. H. (2011). Cell Death, Damage-Associated Molecular Patterns, and Sterile Inflammation in Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(12), 2781-2786. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.224907>
- Zhou, C., Bai, J., Jiang, C., Ye, L., Pan, Y., & Zhang, H. (2017). Geranylgeranylacetone attenuates myocardium ischemic/reperfusion injury through HSP70 and Akt/GSK-3 β /eNOS pathway. *American Journal of Translational Research*, 9(2), 386-395.
- Zhou, L.-S., Zhao, G.-L., Liu, Q., Jiang, S.-C., Wang, Y., & Zhang, D.-M. (2015). Silencing collapsin response mediator protein-2 reprograms macrophage phenotype and improves infarct healing in experimental myocardial infarction model. *Journal of Inflammation (London, England)*, 12, 11. <https://doi.org/10.1186/s12950-015-0053-8>
- Zhou, W., Guan, Q., Kwan, C. C. H., Chen, H., Gleave, M. E., Ngan, C. Y. C., & Du, C. (2010). Loss of clusterin expression worsens renal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 298(3), F568-F578. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00399.2009>
- Zhu, H., Cui, D., Liu, K., Wang, L., Huang, L., & Li, J. (2014). Long pentraxin PTX3 attenuates ischemia reperfusion injury in a cardiac transplantation model. *Transplant International*, 27(1), 87-95. <https://doi.org/10.1111/tri.12197>
- Zindel, J., & Kuberski, P. (2020). DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15(1), 493-518. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>

- Zingarelli, B., Hake, P. W., Denenberg, A., & Wong, H. R. (2002). Sesquiterpene Lactone Parthenolide, an Inhibitor of I κ B Kinase Complex and Nuclear Factor- κ B, Exerts Beneficial Effects in Myocardial Reperfusion Injury. *Shock*, 17(2), 127–134.
- Zlokovic, B. V., Martel, C. L., Matsubara, E., McComb, J. G., Zheng, G., McCluskey, R. T., Frangione, B., & Ghiso, J. (1996). Glycoprotein 330/megalin: Probable role in receptor-mediated transport of apolipoprotein J alone and in a complex with Alzheimer disease amyloid beta at the blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 4229-4234.
- Zou, N., Ao, L., Cleveland, J. C., Yang, X., Su, X., Cai, G.-Y., Banerjee, A., Fullerton, D. A., & Meng, X. (2008). Critical role of extracellular heat shock cognate protein 70 in the myocardial inflammatory response and cardiac dysfunction after global ischemia-reperfusion. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 294(6), H2805-H2813. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00299.2008>
- Zoubeidi, A., Ettinger, S., Beraldi, E., Hadaschik, B., Zardan, A., Klomp, L. W., Nelson, C. C., Rennie, P. S., & Gleave, M. E. (2010). Clusterin facilitates COMMD1 and I- κ B degradation to enhance NF- κ B activity in prostate cancer cells. *Molecular cancer research: MCR*, 8(1), 119-130. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0277>
- Zouggari, Y., Ait-Oufella, H., Bonnin, P., Simon, T., Sage, A. P., Guérin, C., Vilar, J., Caligiuri, G., Tsiantoulas, D., Laurans, L., Dumeau, E., Kotti, S., Bruneval, P., Charo, I. F., Binder, C. J., Danchin, N., Tedgui, A., Tedder, T. F., Silvestre, J.-S., & Mallat, Z. (2013). B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nature Medicine*, 19(10), 1273-1280. <https://doi.org/10.1038/nm.3284>
- Zuurbier, C. J., Abbate, A., Cabrera-Fuentes, H. A., Cohen, M. V., Collino, M., De Kleijn, D. P. V., Downey, J. M., Pagliaro, P., Preissner, K. T., Takahashi, M., & Davidson, S. M. (2019). Innate immunity as a target for acute cardioprotection. *Cardiovascular Research*, 115(7), 1131-1142. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy304>
- Zwain, I. H., Grima, J., & Cheng, C. Y. (1994). Regulation of clusterin secretion and mRNA expression in astrocytes by cytokines. *Molecular and Cellular Neurosciences*, 5(3), 229-237. <https://doi.org/10.1006/mcne.1994.1027>

ANNEXES

Cette partie comprend un article en cours de révision. Pendant mon stage de master 2, j'ai participé à ce travail qui a fait l'objet de la thèse du Docteur Rima Kamel.

Kynurenic acid reduces myocardial ischemia/reperfusion injuries by activating antioxidant defense and mitophagy (en révision dans *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*)

Kynurenic acid reduces myocardial ischemia/reperfusion injuries by activating antioxidant defense and mitophagy

Rima Kamel^a, MS; Delphine Baetz^c, PhD; Naïg Gueguen^{a,d}, PhD; Agnès Barbelivien^a; Anne-Laure Guihot^a, BS; Louwana Allawa^a, MS; Jean Gallet^a, MD; Justine Beaumont^a, BS; Michel Ovize^{c,e}, MD, PhD; Daniel Henrion^a, PhD; Pascal Reynier^{a,d}, MD, PhD; Delphine Mirebeau-Prunier^{a,d}, MD, PhD; Sophie Tamareille^{a*}, PhD; Fabrice Prunier^{a,b*}, MD, PhD

^aLaboratoire MITOVASC, CNRS UMR 6015 INSERM U1083, Université d'Angers, Angers, France

^bService de Cardiologie, CHU Angers, Angers, France

^cUniv Lyon, CarMeN Laboratory, INSERM, Université Claude Bernard Lyon 1, 69500, Bron France

^dDépartement de Biochimie et Génétique, CHU Angers, Angers, France

^eService d'Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires & CIC de Lyons, Hôpital Louis Pradel, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

*both authors contributed equally to this work as last co-authors

Corresponding author:

Prof. Fabrice Prunier

Laboratoire MITOVASC, Bâtiment IRIS 2, 3 rue Roger Amsler, 49100 Angers France

Tel: +33 (0)241 355 147, fax: +33 (0)241 354 004; email: FaPrunier@chu-angers.fr

Short title:

Kynurenic acid mediates cardioprotection

Keywords:

kynurenic acid, cardioprotection, mitophagy, oxidative stress

Highlights:

- Kynurenic acid mediates cardioprotection in a myocardial ischemia/reperfusion model

- FOXO3 α phosphorylation is decreased after kynurenic acid treatment
- Mitophagy and antioxidant markers are implicated in observed cardioprotection

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cardioprotective effect of Kynurenic acid (KYNA), a metabolite of the kynurenine pathway, has recently been reported. However, the mechanisms by which it may be protective are unknown. Hence, we sought to investigate its cardioprotective mechanisms in the context of myocardial ischemia/reperfusion.

METHODS: H9C2 cells hypoxia/reoxygenation (H/R) and rat *in vivo* myocardial ischemia/reperfusion models were used to test KYNA cardioprotective effect. H/R and H/R+KYNA groups were subjected to H/R and treated with vehicle or KYNA (1 μ M) respectively, at different times (pre=10 minutes before hypoxia, per=during hypoxia, post=during reoxygenation). MI and MI+KYNA groups underwent left coronary artery ligation and treated with vehicle (1M) or KYNA (300mg/Kg) respectively. Cell death was quantified by flow cytometry using propidium iodide and infarct size was quantified after TTC staining. Mitochondrial respiratory chain complexes activities were measured by spectrophotometry. Protein expression was evaluated by western blot and mRNA was quantified by RT-qPCR.

RESULTS: *In vitro*, KYNA treatment in pre, pre+per, pre+per+post groups significantly reduced H9C2 relative mortality by an average of 30% compared to vehicle group (p=0.024, p=0.006, p=0.007, respectively). Infarct size was significantly reduced in MI+KYNA group compared to MI group (p=0.023). KYNA treatment did not have any effect on the mitochondrial respiratory chain complex activity. GPR35, and SOD2 mRNA levels were increased in MI+KYNA group compared to MI group (p=0.022 and p=0.049 respectively for GPR35 and SOD2). A significant increase in PARK2 protein levels (p=0.036) marked a mitophagic stimulation. Additionally, ERK1/2, Akt and FOXO3 α phosphorylation levels were significantly reduced after KYNA treatment (p=0.005, p=0.047 and p<0.001 respectively for ERK1/2, Akt, FOXO3 α).

CONCLUSION: KYNA reduced ischemia/reperfusion injuries in both, *in vitro* and *in vivo* models. KYNA-mediated cardioprotection was associated with decreased ERK1/2 and Akt phosphorylation levels, which led to a decrease in FOXO3 α phosphorylation, a mechanism that was associated with an increase in mitophagy and antioxidant defense mechanisms.

1. INTRODUCTION

Myocardial infarction remains one of the leading causes of mortality in developed countries (Montrief et al. 2019). Reperfusion is paramount to the salvage of ischemic myocardium. However final infarct size is due to two components: ischemic damages and reperfusion injuries. Whilst several pharmacological or ischemic conditioning strategies were capable of reducing myocardial reperfusion injuries in animal models and prove-of-concept clinical studies, (with limited number of patients) no effective cardioprotective strategy was translated to the clinical arena.

In previous works, we have shown a plasmatic kynurenine concentration increase in rats and humans after remote ischemic conditioning, suggesting a link between the kynurenine pathway and cardioprotection (Chao de la Barca et al. 2016; Kouassi Nzougnet et al. 2017). Moreover, rats receiving a kynurenine intraperitoneal injection 10 minutes before a myocardial ischemia/reperfusion exhibited a reduced infarct size compared to vehicle treated group. The kynurenine pathway is one of the main routes of tryptophan degradation, an essential amino acid. Approximately, 95% of free tryptophan is oxidized into kynurenine, a rate limiting step controlled by Indolamine-2,3-Dioxygenase (IDO) or Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) in the liver. Afterwards, kynurenine is either transformed into kynurenic acid (KYNA) or into quinolinic acid, reactions catalyzed by kynurenine aminotransferase (KAT) and kynurenine 3-monooxygenase (KMO) respectively (Wang et al. 2015).

KYNA is a metabolite with pleiotropic effects (Wirthgen et al. 2017). In 2016, Olenchock *et al.* reported a cardioprotective effect of KYNA in an *ex vivo* and an *in vivo* myocardial ischemia/reperfusion mouse model (Olenchock et al. 2016). Altogether, these findings suggest a potential major role of kynurenine pathway in protecting the heart against ischemia/reperfusion injuries. However, mechanisms by which it is cardioprotective are largely unknown. KYNA has antioxidant properties (Lugo-Huitron et al. 2011; Perez-Gonzalez, Alvarez-Idaboy, and Galano 2015) and has been identified as a ligand of the recently de-orphanized G protein-coupled receptor 35 (GPR35) (Wirthgen et al. 2017). An emerging importance of GPR35 in cardiovascular diseases was recently documented (Ronkainen et al. 2014; Mackenzie et al. 2011). Like other G protein-coupled receptors, GPR35 has been shown to modulate signaling pathways which may be implicated in myocardial damage.

Mitophagy (mitochondrial autophagy), cell death, mitochondrial respiration, antioxidant defense being key targets of cardioprotective strategies (Yang and Hung 2009). In the present study, we sought to investigate the cardioprotective effect of KYNA and to elucidate potential implicated cardioprotective mechanisms in both *in vivo* rat myocardial infarction model and *in vitro* hypoxia/reoxygenation H9C2 cell model.

2. METHODS

2.1. *In vitro* H9C2 hypoxia/reoxygenation

H9C2-SV40 cells, an immortalized rat cardiomyoblasts cell line, were used for *in vitro* hypoxia/reoxygenation (Bochaton et al. 2015) in order to mimic myocardial ischemia/reperfusion. Cells were cultured in a standard cell culture media, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (4.5 g/L) with antibiotics (Penicillin and Streptomycin 10 mL/L) and 10% of Fetal Bovine Serum (FBS) (Dutscher, Brumath, France). Hypoxia was induced by washing away DMEM complete medium three times and by replacing it with a glucose and serum free isotonic solution (Tyrode's solution (mM)) (NaCl 130, KCl 5, Hepes 10, MgCl₂ 1, CaCl₂ 1.8, pH 7.4). Cells were placed in a hypoxia chamber flushed with a stream of pure nitrogen during 4 hours and 50 minutes at 37°C. Oxygen rate was kept at 0.5%. Reperfusion was mimicked by replacing the Tyrode's solution with complete medium in a standard incubator under normoxic conditions for 2 hours. Groups were defined as following (Fig. 1A):

- Control group: Cells did not undergo any intervention. Cells were kept in normoxic conditions and culture medium for 7 hours.
- H/R group: Cells underwent hypoxia/reoxygenation with DMSO (vehicle) treatment, 10 minutes before hypoxia and all through the procedure.
- H/R+KYNA group: Cells underwent hypoxia/reoxygenation with KYNA treatment (1μM) either 10 minutes before hypoxia (pre), or pre + during hypoxia (pre+per), or pre + per + during reoxygenation (pre+per+post).

2.2. Cell death and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) assessment

At the end of reoxygenation (i.e 2 hours), cells were detached from the plates using Accutase (PAA Laboratories, Ontario, Canada). Cell death was quantified by flow cytometry (LSR-Fortessa X-20 BD Biosciences, New jersey, United states) using 1μg/mL Propidium Iodide (PI) (ex: 488 nm; em: 590 nm) (Sigma Aldrich, Missouri, United States). Cell death in H/R group was considered equal to 1, and other data was expressed as relative mortality compared to H/R. $\Delta\Psi_m$ was quantified with 20mM of DilC1 (1,1',3,3,3',3'-Hexamethylindodicarbocyanine Iodide) (ex: 633 nm; em: 658 nm) (Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France). Triplicate samples were prepared for each condition and a total of 10 000 events were acquired by FACS.

2.3. Animal studies

Male adult Wistar rats, aged 8 to 10 weeks and weighing 250 to 300g, were used in this study. They were kept in a temperature-controlled room (22°C±2°C) with an adequate 12 hours light-12 hours dark cycle. Food and water were available *ad libitum*. All experiments were conducted in agreement with the guidelines from EU Directive 2010/63/EU; French Decree no. 2013–118 of the European

Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. The protocol was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of Pays de la Loire and by the French Ministry of Higher Education and Research (APAFIS#8668-20 170 12417473589 v3).

Hearts were excised under deep anesthesia (60 mg/kg of sodium pentobarbital (Exagon®, Axience, France). Afterwards, in one set of experiments the hearts were excised for infarct size assessment and, in another set of experiments, freeze-clamped and stored at -80°C for RNA messenger expression analysis, Western blot (WB) analysis, and assessment of the mitochondrial respiratory chain complexes activity.

2.4. Myocardial ischemia/reperfusion rat model

Rats were anesthetized by means of intraperitoneal injection of 60 mg/kg of sodium pentobarbital (Exagon®, Axience, France), orotracheally intubated, and mechanically ventilated with room air by means of a small animal ventilator (SAR-830 A/P, CWE, United states). Body core temperature was maintained at $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (HB101/2 RS; Bioseb, France). The pericardium was removed to expose the heart after a median sternotomy. Coronary occlusion was induced by realizing a left anterior descending coronary artery (LAD) ligature. Using a 7.0 monofilament suture (Premio 7.0, Peters Surgical, France) passed through a short length of tubing (PE50), a reversible snare was realized and clamped onto the epicardial surface directly above the coronary artery. The appearance of epicardial cyanosis and dyskinesia of the ischemic region confirmed ischemia. Following 40 minutes of occlusion, reperfusion was achieved by loosening the snare and confirmed by observing an epicardial hyperemic response. The depth of anesthesia was checked by toe pinch before and during surgery. An extra dose of 30 mg/kg pentobarbital was injected in case of positive nociceptive response. Rats were randomly assigned to one of the following groups (Fig. 1B):

- Sham group: animals undergoing all the surgical procedure except ligature of the coronary artery.
- MI group: animals undergoing myocardial ischemia/reperfusion and injected 10 minutes before ischemia with NaOH 1M (vehicle).
- MI+KYNA group: animals undergoing myocardial ischemia/reperfusion and injected 10 minutes before ischemia with 300mg/Kg KYNA (Sigma Aldrich, Missouri, United States). The dose was chosen based on previously published data (Germano et al. 1987; Leib et al. 1996).

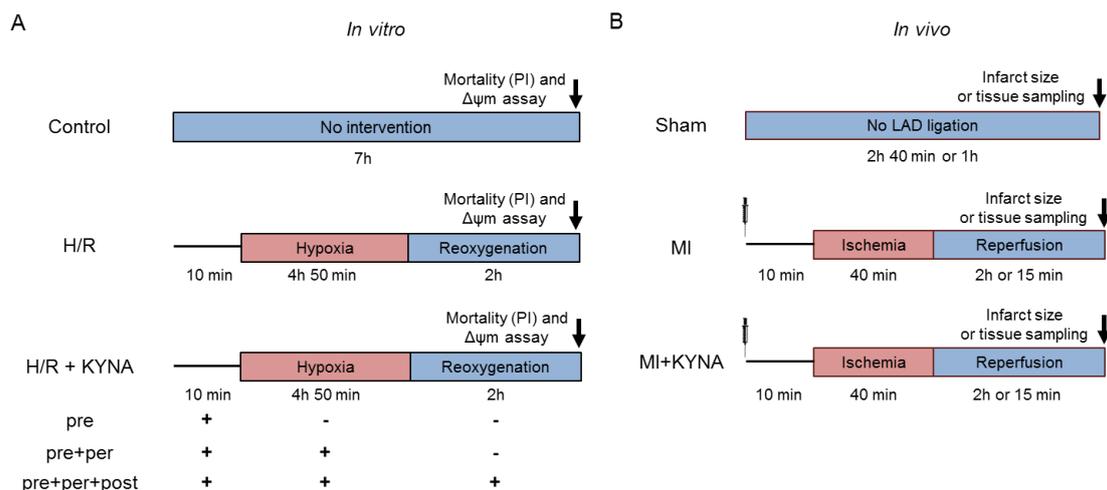


Fig. 1: *In vitro* and *in vivo* experimental design of protocols and groups. (A) *In vitro*: H9C2 control cells underwent no intervention, cells from the hypoxia/reoxygenation (H/R) groups were submitted to 4 hours 50 minutes of hypoxia followed by 2 hours of reoxygenation and were either treated with vehicle (DMSO) or with kynurenic acid (1 μ M) 10 minutes before hypoxia, or before and during hypoxia, or before, during and after hypoxia. Cell death quantification as well as mitochondrial membrane potential were performed 2 hours after reoxygenation. (B) *In vivo*: Sham animals underwent no injection and no left anterior descending coronary artery (LAD) ligation, MI group underwent 40 minutes of ischemia followed by 2 hours of reperfusion. 10 minutes before coronary artery occlusion vehicle (NaOH 1M) or kynurenic acid (300mg/Kg) was administrated intraperitoneally. Infarct size assessment using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining after 2 hours of reperfusion, tissue sampling was performed after either 15 minutes or 2 hours of reperfusion.

2.5. Area-at-risk and infarct-size determination

Following 120 minutes of reperfusion, the hearts of the vehicle and the KYNA-treated groups were excised and the LAD was re-occluded using the monofilament suture kept in place. The area at risk (AAR) was outlined after a retrograde perfusion with Evans blue (1%). From the apex to the base, the heart was cut into five equal slices and then incubated with a 1% solution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC, Sigma-Aldrich, Missouri, United states) in phosphate buffer at pH 7.4 and 37°C. TTC staining allows the distinction between infarcted myocardium in white and viable myocardium colored brick red. The slices were photographed. Infarct size was quantified using planimetry with Image J software (NIH, Maryland, United states). Area of necrosis (AN) was expressed as a percentage of the AAR (AN%AAR) and the AAR as a percentage of total left ventricular area (AAR%LV).

2.6. Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)

We quantified the expression of genes encoding Catalase, GPR35 and Superoxide Dismutase 1, 2, 3 (SOD1, 2, 3) following 120 minutes of reperfusion. Genes encoding hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hppt) and glucuronidase, beta (Gusb) were used as reference. Primer sequences are listed in Table 1.

Total RNA was extracted using RNeasy MiniKit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instructions from approximately 30 µg of frozen left ventricular tissue samples from the ischemic zone of MI and MI+KYNA animals, or non-ischemic zone in sham. cDNA was synthesized using Quantitect Reverse Transcription kit (Qiagen, Allemagne) following the manufacturer's instructions. In a total volume of 20 µl reaction system (10 ng of cDNA), SYBR™ Select Master Mix (Applied biosystems, California, United states) was used to perform qPCR using a Lightcycler® 480 II thermocycler (Roche, Switzerland). Thermal cycling conditions were as following: 95°C for 3 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60 °C for 1 min. Results of target genes mRNA were normalized on the average of the Ct value of the reference genes mRNA and expressed as $2^{\Delta Ct}$ where ΔCt is the difference between Ct of reference genes and Ct of target gene.

Gene	NCBI Genbank	Forward sequence	Reverse sequence
<i>Cat</i>	NM_012520.2	5'-ttgccaaccacctgaaagat-3'	5'-agggtggacgtcagtgaaat-3'
<i>Gpr35</i>	NM_001037359.1	5'-ccaactggccgtgtttatc-3'	5'-cctgcactgtcaggatcaaat-3'
<i>Gusb</i>	NM_017015.2	5'-ctctggtggccttacctgat-3'	5'-cagactcaggtgtgtcatcg-3'
<i>Hprt</i>	NM_012583.2	5'-gaccggtctgtcatgtcg-3'	5'-acctggtcatcatcactaatcac-3'
<i>Sod1</i>	NM_017050.1	5'-ggtccagcggatgaagag-3'	5'-ggacacattggccacacc-3'
<i>Sod2</i>	NM_017051.2	5'-attgccgctgtctaatc-3'	5'-gatagtaagcgtgctcccaca-3'
<i>Sod3</i>	NM_012880.1	5'-cttgggagagctgtcaggt-3'	5'-caccagtagcaggtgcaga-3'

Table 1: Forward and reverse primer sequences for target and reference genes.

2.7. Western blot (WB) analysis

Freeze-clamped ischemic (MI and MI+KYNA animals) and non-ischemic (sham) LV rat hearts were used following 15 minutes or 120 minutes of reperfusion for WB analysis. 40 µg of total proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose or PVDF membrane. Membranes were incubated with antibodies diluted in TBS buffer containing 5% non-fat dried milk, against p-ERK1/2, ERK1/2, p-Akt, Akt, phosphorylated AMP-activated protein kinase (p-AMPK α), AMPK α , p-FOXO3 α , FOXO3 α (1/1000; Cell Signaling Technology, Massachusetts, Unites states), catalase (1/1000; Sigma-

Aldrich, Missouri, United States), Total OXPHOS Rodent WB antibody Cocktail (1/250; Abcam, Cambridge, United Kingdom), Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC1 α), Superoxide dismutase 2 (SOD2) (1/1000, abcam, Cambridge, United Kingdom) SOD1 (1/500, Enzo Life Sciences, New York, United States), SOD3, Nucleoporin p62 (p62) (1/1000, Enzo Life Sciences, New York, United States), Parkin (PARK2) (1/1000, Abnova, Taiwan). GAPDH (1/10000; Sigma-Aldrich, Missouri, United States) and β -actin (1/1000; Sigma-Aldrich, Missouri, United States) were used as loading controls. Membranes were incubated with appropriate (rabbit or mouse) secondary antibodies (1/5000, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, United States) conjugated to horseradish peroxidase. The blots were developed using the enhanced chemi-luminescence method. The band densities were analyzed using Image Lab (BioRad, California, United States).

2.8. Mitochondrial respiratory chain complex enzymatic activity assessment

Activities of Lactate dehydrogenase (LDH), citrate synthase (CS) and the electron transport chain complexes (complexes I–IV) were spectrophotometrically measured at 37°C with a UV spectrophotometer (SAFAS, UVmc2, Monaco) in sham, MI and MI+KYNA left ventricle muscle homogenates after 2 hours of reperfusion. Homogenates were obtained after repeating two times the homogenization and centrifugation step (20 minutes at 650g) while discarding the pellet.

The activity of CS was measured in reaction medium consisting of 100 mM Tris·HCl pH 8.1, 150 μ M 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 50 μ M oxaloacetate, 30 μ M acetyl-CoA, and 0,1% Triton X-100. After 2 minutes of incubation, the reaction was initiated by adding 10 μ L/mL of homogenate, and the change in optical density at 412 nm was recorded over 1 min.

NADH ubiquinone reductase (complex I) activity was assayed in KH₂PO₄ buffer pH 7.5, 3.75 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 100 μ M decylubiquinone, 10 μ L/mL homogenate, with (to determine background rates, subsequently subtracted) or without 10 μ M rotenone. After 2 minutes of incubation at 37°C, the reaction was initiated by adding 0.1 mM NADH. The activity was measured at 340 nm by monitoring the oxidation of NADH over 2 min.

The activity of succinate dehydrogenase (complex II) was measured after the reduction of 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) at 600 nm in a buffer containing 50 mM KH₂PO₄, 2,5 mg/mL BSA, 6.5 μ M rotenone, 5 μ g/mL antimycin, 25 mM succinate, 1 mM KCN, and 100 μ M DCPIP, pH 7.5. After 2 minutes of incubation at 37°C with 15 μ L of homogenate, the reaction was initiated by the addition of 100 μ M decylubiquinone, and the optical density was recorded for 2 min.

The activity of ubiquinone-cytochrome c reductase (complex III) was determined by monitoring the reduction of cytochrome c at 550 nm. Ten μ L/mL of homogenate were incubated for 60 s in a reaction medium consisting of 100 mM KH₂PO₄ pH 7.5, 250 μ M Ethylenediaminetetraacetic acid

(EDTA), 1mg/mL BSA, 1mM KCN, 100 μ M oxidized cytochrome c with or without 5 μ g/mL antimycin (non-enzymatic reduction of cytochrome c). The reaction was initiated by adding 100 μ M decylubiquinol, and the optical density was measured over 40 seconds. The specific activity of complex III was calculated by subtracting the activity of the non-enzymatic reaction from that of the total activity.

The activity of cytochrome-c oxidase (complex IV) was measured by monitoring the oxidation of reduced cytochrome c at 550 nm. An 80 μ M solution of reduced cytochrome c (92–97% reduced using dithionite) in 55 mM KH₂PO₄, pH 7.0, was pre-incubated over 2 min. The reaction was initiated by adding 10 μ L/mL of homogenate, and the change in optical density was measured over 40 seconds.

The activity of LDH was measured by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm. The reaction was assayed in a buffer medium containing 95 mM KH₂PO₄ pH 7.1, 0.15% Triton 10X, 2.5 mM pyruvate, and 5 μ L of homogenate. After 5 minutes incubation at 37°C, the reaction is initiated by addition of 100 μ M NADH and measured over 30 to 60 seconds.

A control with beef heart mitochondria was executed in parallel with each set of samples to ensure proper running of experiment. The cellular protein content was determined using the BCA protein assay kit (Thermo scientific, Massachusetts, United States) with bovine serum albumin as standard. Specific complex activities were expressed as ratio of and normalized to citrate synthase activity.

2.9. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SPSS Statistics v.17.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Differences between two groups (for AAR%LV and AN%AAR) were evaluated using the Mann–Whitney U test. One-way ANOVA followed by a LSD *post-hoc* test was performed for multiple group comparisons. Data are reported as mean \pm standard error of the mean (SEM). $p < 0.05$ was considered significant.

3. RESULTS

3.1. KYNA reduced *in vitro* cell death and prevented mitochondrial membrane potential decrease after hypoxia/reoxygenation

To evaluate cytoprotective effects of KYNA *in vitro*, H9C2 cells were subjected to 4 hours 50 minutes of hypoxia followed by 2 hours of reoxygenation with either DMSO or KYNA treatments (Fig. 1A). As shown in figure 2, hypoxia/reoxygenation increased cell death compared to control (1.00 vs. 0.11 ± 0.02 ; $p < 0.001$). Relative mortality was significantly reduced in KYNA-treated groups compared to H/R group (0.69 ± 0.10 , 0.63 ± 0.17 , 0.64 ± 0.19 for KYNA pre, KYNA pre+per, KYNA pre+per+post vs. 1.00 in H/R, $p = 0.024$, $p = 0.006$, and $p = 0.007$ respectively). Hypoxia/reoxygenation led to a significant decrease in the number of cells with conserved mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) ($46.8 \pm 7\%$) compared to control ($91.5 \pm 7\%$, $p = 0.003$). KYNA treatment was able to significantly increase number of cells with conserved $\Delta\Psi_m$ ($72.72 \pm 1.82\%$, $78.74 \pm 9.50\%$, $80.97 \pm 10.50\%$, $p = 0.035$, $p = 0.011$, $p = 0.007$ vs. H/R; for KYNA pre, KYNA pre+per, KYNA pre+per+post respectively) (Fig. 2).

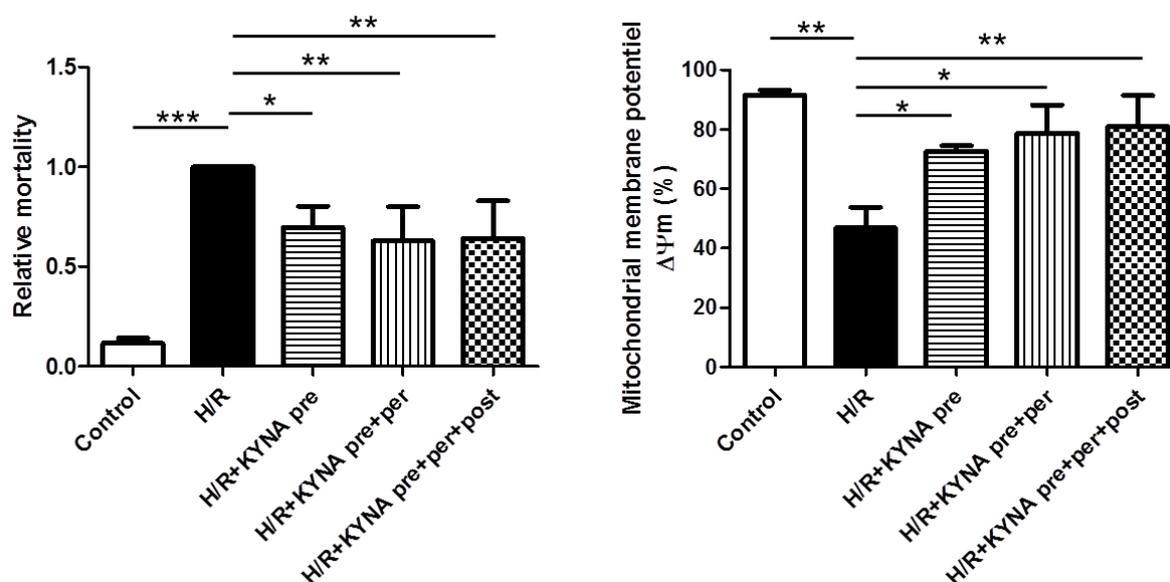


Fig. 2: Histograms showing (A) relative mortality and (B) percentage of cells with conserved mitochondrial membrane potential in control cells, that did not undergo hypoxia/reoxygenation (H/R), and cells that underwent hypoxia/reoxygenation either vehicle or KYNA ($1\mu\text{M}$)-treated. Treatment was performed either 10 minutes before hypoxia in DMEM medium (pre), or pre + during hypoxia (pre+per), or pre + per + during reoxygenation (pre+per+post) for KYNA, whereas vehicle (DMSO) treatment was performed at pre+per+post ($n=3-9$); Values are expressed as mean \pm SEM; * $p < 0.05$.

3.2. KYNA reduced infarct size *in vivo*

In order to confirm results obtained *in vitro*, KYNA or NaOH was injected to male Wistar rats 10 minutes before a myocardial ischemia/reperfusion. Both MI and MI+KYNA groups were subjected to 40 minutes myocardial ischemia followed by 2 hours reperfusion (Fig. 1B). Infarct size was significantly lower in animals receiving KYNA as compared to those receiving vehicle only (AN%AAR = $53.3\pm 3\%$ in MI+KYNA vs. $62.2\pm 2\%$ in MI, $p=0.012$), whereas AAR%LV was similar in the two groups (Fig. 3).

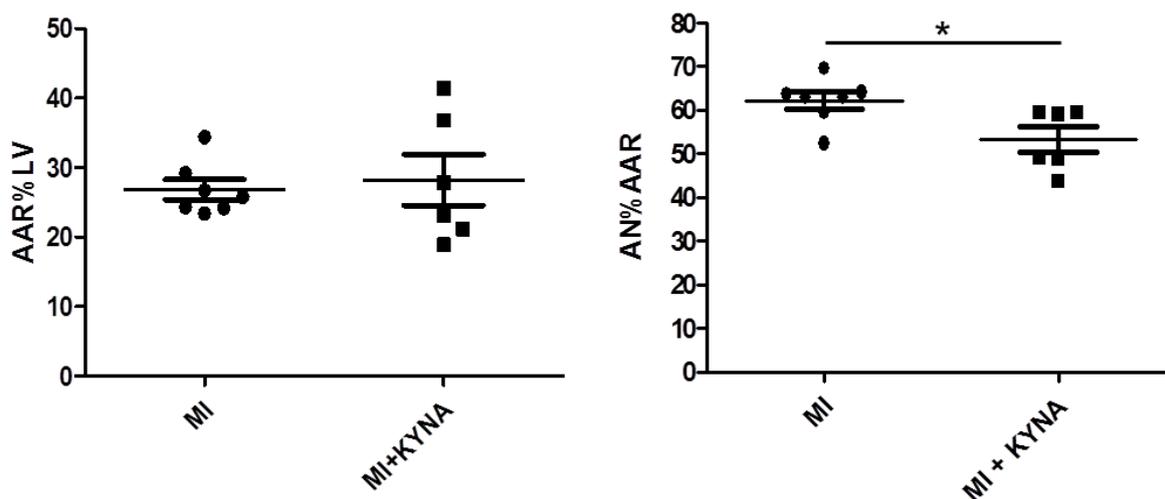


Fig. 3: Scatter dot plot showing area at risk (AAR) as a percentage of the total left ventricle (LV) and area of necrosis (AN) as a percentage of AAR after 2 hours of reperfusion ($n=6-7$); Values are expressed as mean \pm SEM; * $p<0.05$.

3.3. KYNA did not influence the mitochondrial respiratory chain complex activity

KYNA treatment did not influence mitochondrial respiratory chain complex protein expression. As shown in figure 4A, complex I and III proteins expression were increased, but did not reach statistical significance, in the MI group compared to sham, except for complex III (0.279 ± 0.085 in MI vs. 0.076 ± 0.023 in sham for complex I, $p=0.08$; 0.214 ± 0.050 in MI vs. 0.144 ± 0.017 in sham for complex III, $p<0.001$). PGC1- α protein expression, a transcription factor mediating mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation, was not different in sham, MI and MI+KYNA groups (Fig. 4B). Afterwards, we evaluated activities of complex I, II, III and IV spectrophotometrically. We found a complex I deficiency (0.41 ± 0.04 in MI vs. 0.53 ± 0.03 in sham, $p=0.052$) and a complex III over-activation after ischemia (0.42 ± 0.04 in MI vs. 0.29 ± 0.03 in sham, $p=0.04$). Accordingly, complex ratio were significantly different between MI and sham group (0.92 ± 0.06 in MI vs. 1.21 ± 0.07 in sham for complex ratio I/II, $p=0.01$; 1.13 ± 0.06 in MI vs. 0.55 ± 0.04 in sham for complex ratio III/I, $p=0.039$; 2.30 ± 0.21 in

MI vs. 1.25 ± 0.16 in sham for complex ratio IV/I, $p=0.01$). However, KYNA treatment did not correct complex I deficiency or complex III over-activation (Fig. 4C).

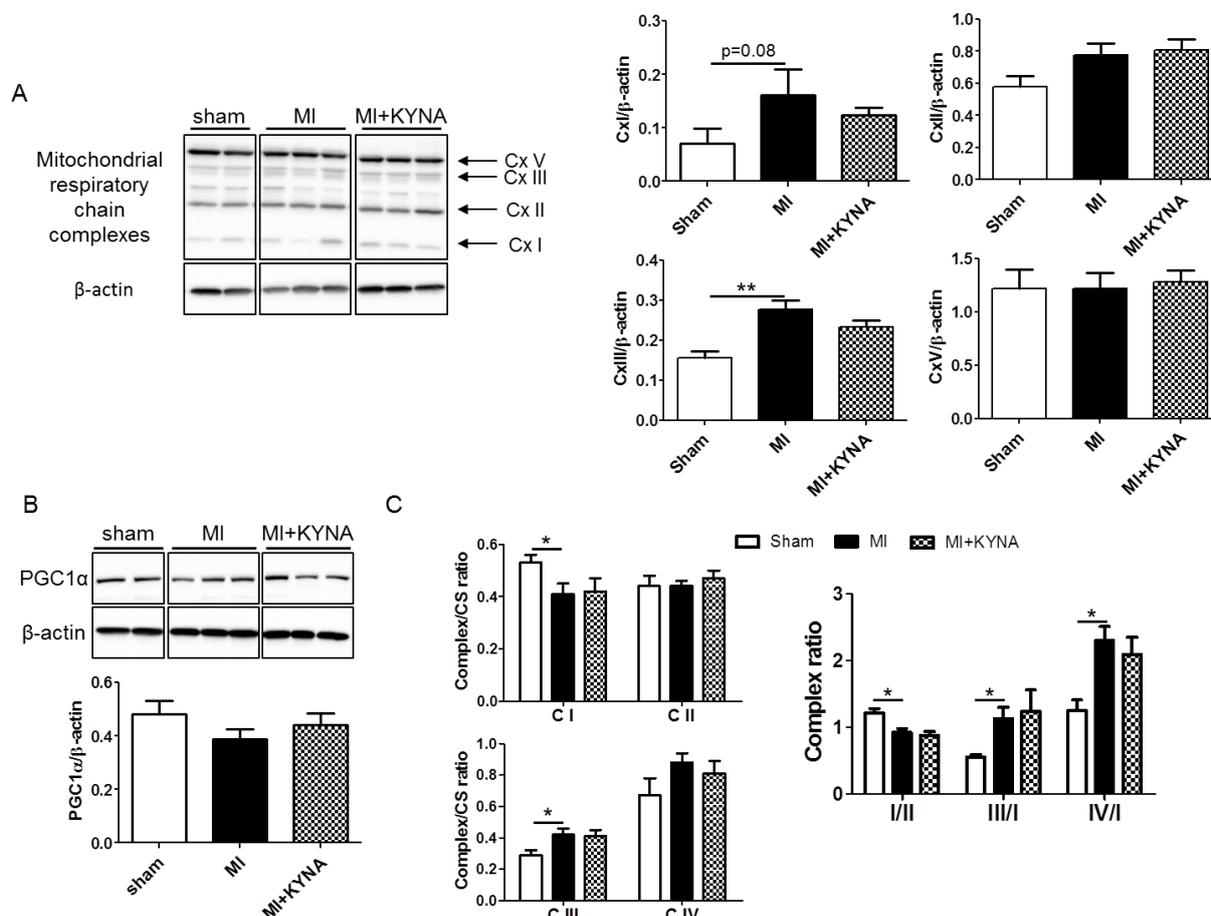


Fig. 4: Mitochondrial respiratory chain complex and PGC1 α protein expression by means of western blot and mitochondrial respiratory chain complex activity by spectrophotometry. Representative immunoblots and histograms showing quantification of protein expression for (A) mitochondrial respiratory chain complex and (B) PGC1 α in non-ischemic (sham), ischemic + vehicle (MI), and ischemic + kynurenic acid (MI+KYNA) left ventricle samples after 2 hours of reperfusion (n=5-10). β -actin was used as loading controls. (C) histograms showing complex over citrate synthase activity ratio (I/CS, II/CS, III/CS, IV/CS) or complex ratio activity (I/II, III/I, IV/I) in sham, MI, MI+KYNA left ventricle samples after 2 hours of reperfusion (n=5-10). Values are expressed as mean \pm SEM; * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

3.4. KYNA stimulated antioxidant defense after myocardial ischemia/reperfusion

KYNA has been reported having reactive oxygen species (ROS) scavenger properties. Thus, we evaluated mRNA as well as protein expression for SOD1, SOD2, SOD3, and catalase. SOD1 and catalase mRNA were significantly decreased after ischemia (28.50 ± 1.81 in MI vs. 38.33 ± 1.95 in sham for SOD1, $p=0.004$; 17.21 ± 1.39 in MI vs. 26.08 ± 1.24 in sham for catalase, $p<0.001$). SOD2 and SOD3

mRNA were not changed after ischemia. KYNA treatment induced a significant increase in SOD2 mRNA expression (59.68 ± 2.96 in MI+KYNA vs. 49.33 ± 4.61 in MI, $p=0.049$) and an increase, although not significant, in SOD3 mRNA levels (2.64 ± 0.18 in MI+KYNA vs. 2.24 ± 0.15 in MI, $p=0.08$) (Fig. 5A). SOD1 and SOD2 protein levels were comparable among all groups. SOD3 protein levels were significantly higher in MI group (1.02 ± 0.16) vs. sham group (0.44 ± 0.02 ; $p=0.005$). Catalase protein levels were also significantly higher in MI group (0.42 ± 0.03) vs. sham group (0.25 ± 0.01 ; $p=0.007$). Finally, KYNA treatment showed a trend in increasing catalase protein levels compared to MI group (0.53 ± 0.05 in MI+KYNA vs. 0.42 ± 0.03 in MI, $p=0.055$) (Fig. 5B).

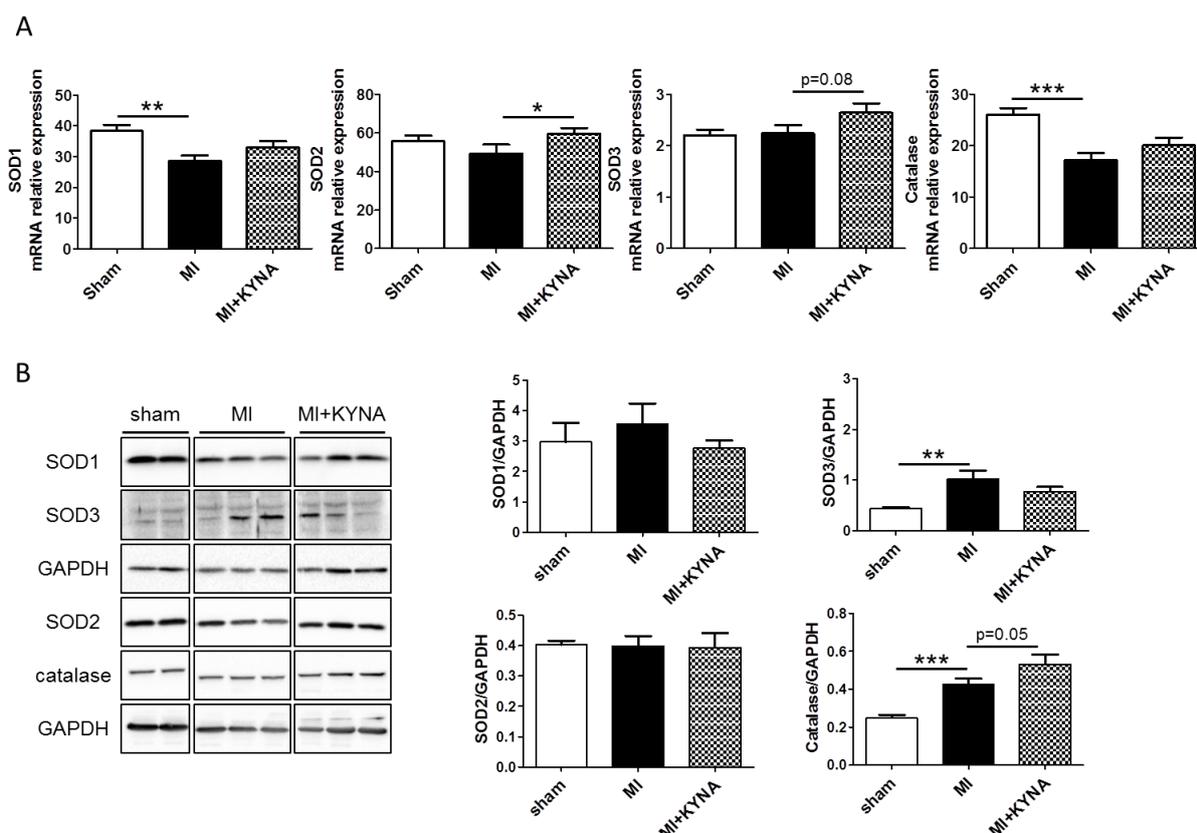


Fig. 5: Antioxidant markers mRNA and protein expression, respectively by means of RT-qPCR and western blot. (A) SOD1, 2, 3 and catalase mRNA expression in non-ischemic (sham), ischemic + vehicle (MI), and ischemic + kynurenic acid (MI+KYNA) left ventricle samples after 2 hours of reperfusion ($n=6-11$). (B) Representative immunoblots and histogram quantification of protein expression for SOD1, 2, 3 and catalase in sham, MI and MI + KYNA groups after 2 hours of reperfusion ($n=6-9$). GAPDH was used as loading control.

Values are expressed as mean \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

3.5. KYNA increased the mitophagy marker PARK2 after myocardial ischemia/reperfusion

We assessed whether KYNA was capable of stimulating mitophagy as a cardioprotective mechanism. P62 protein levels were significantly decreased after myocardial ischemia/reperfusion

compared to sham intervention (0.650 ± 0.078 in MI vs. 0.399 ± 0.041 in sham, $p=0.005$) with a trend to be even more reduced after KYNA treatment (0.268 ± 0.050 in MI+KYNA vs. MI, $p=0.094$). In addition, PARK2 protein levels were significantly increased in MI group compared to sham group (0.157 ± 0.012 in MI vs. 0.377 ± 0.059 in sham, $p=0.039$). KYNA treatment significantly increased PARK2 protein levels compared to MI (0.590 ± 0.095 in MI+KYNA, $p=0.036$) (Fig. 6).

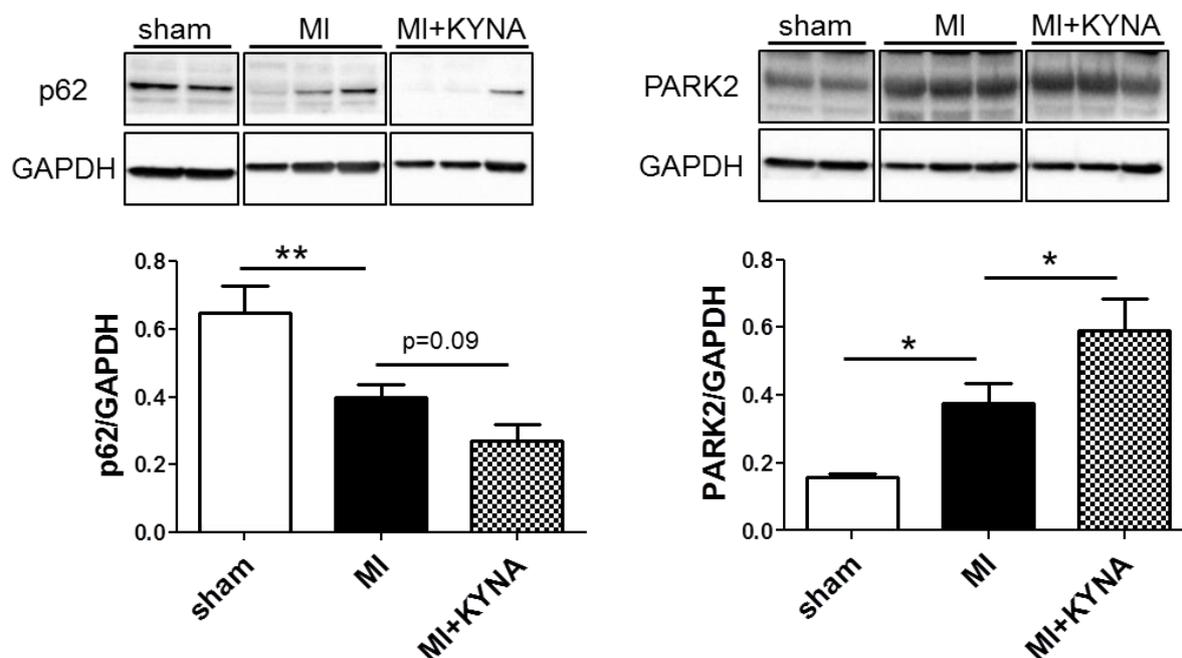


Fig. 6: Mitophagy protein markers expression using western blot. Representative immunoblots and histogram quantification of protein expression for p62 and PARK2 in non-ischemic (sham), ischemic + vehicle (MI), and ischemic + kynurenic acid (MI+KYNA) left ventricle samples after 2 hours of reperfusion ($n=6-7$). GAPDH was used as loading control. Values are expressed as mean \pm SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

3.6. KYNA increased GPR35 mRNA expression and reduced ERK1/2 and Akt phosphorylation levels after myocardial ischemia/reperfusion

KYNA is a known ligand of the G protein-coupled receptor GPR35. GPR35 mRNA expression was significantly increased in MI+KYNA group compared to MI group (0.0421 ± 0.0082 in MI+KYNA vs. 0.0218 ± 0.0037 in MI, $p=0.022$) (Fig. 7A). ERK1/2 and Akt kinases are known targets of G protein-coupled receptors; hence we evaluated the potential effect of GPR35 mRNA upregulation on their phosphorylation levels after 15 minutes of reperfusion. Myocardial ischemia/reperfusion induced an increase in ERK1/2 phosphorylation levels (1.61 ± 0.36 in MI group vs. 0.07 ± 0.04 in sham group, $p<0.001$). KYNA treatment induced a significant decrease in ERK1/2 phosphorylation (0.56 ± 0.14 in MI+KYNA, $p=0.005$) as well as a significant decrease in Akt phosphorylation compared to MI group (0.67 ± 0.06 in MI+KYNA vs. 0.92 ± 0.10 in MI, $p=0.047$) (Fig. 7B).

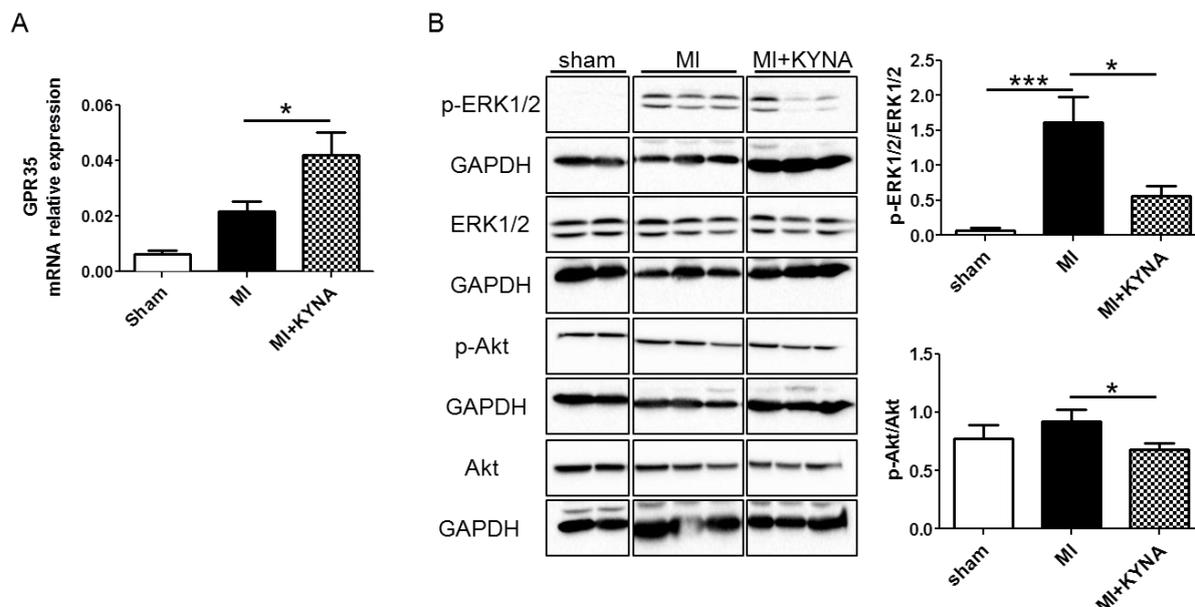


Fig. 7: GPR35 mRNA expression and protein expression levels for p-ERK1/2, ERK1/2, p-Akt, Akt respectively by means of RT-qPCR and WB. (A) GPR35 mRNA expression in sham, MI, and MI+KYNA left ventricle samples after 2 hours of reperfusion (n=6-11). (B) Representative immunoblots and histogram quantification of protein expression for p-ERK1/2, ERK1/2, p-Akt, Akt in sham, MI and MI + KYNA groups after 15 minutes of reperfusion (n=6-9). GAPDH was used as loading control. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.7. KYNA inhibited FOXO3 α phosphorylation

FOXO3 α is a transcription factor known to regulate the expression of genes implicated in important cell functions (including oxidative stress, mitophagy...) and is regulated by AMPK α . Therefore we evaluated phosphorylation levels of both proteins. After 15 minutes of reperfusion, FOXO3 α phosphorylation levels were significantly increased in MI group compared to sham group (6.22 ± 1.61 vs. 1.68 ± 0.51 , $p = 0.017$), whereas KYNA treatment significantly reduced FOXO3 α phosphorylation levels (0.89 ± 0.36 , $p < 0.001$ vs. MI). AMPK α phosphorylation levels were not significantly different among the groups.

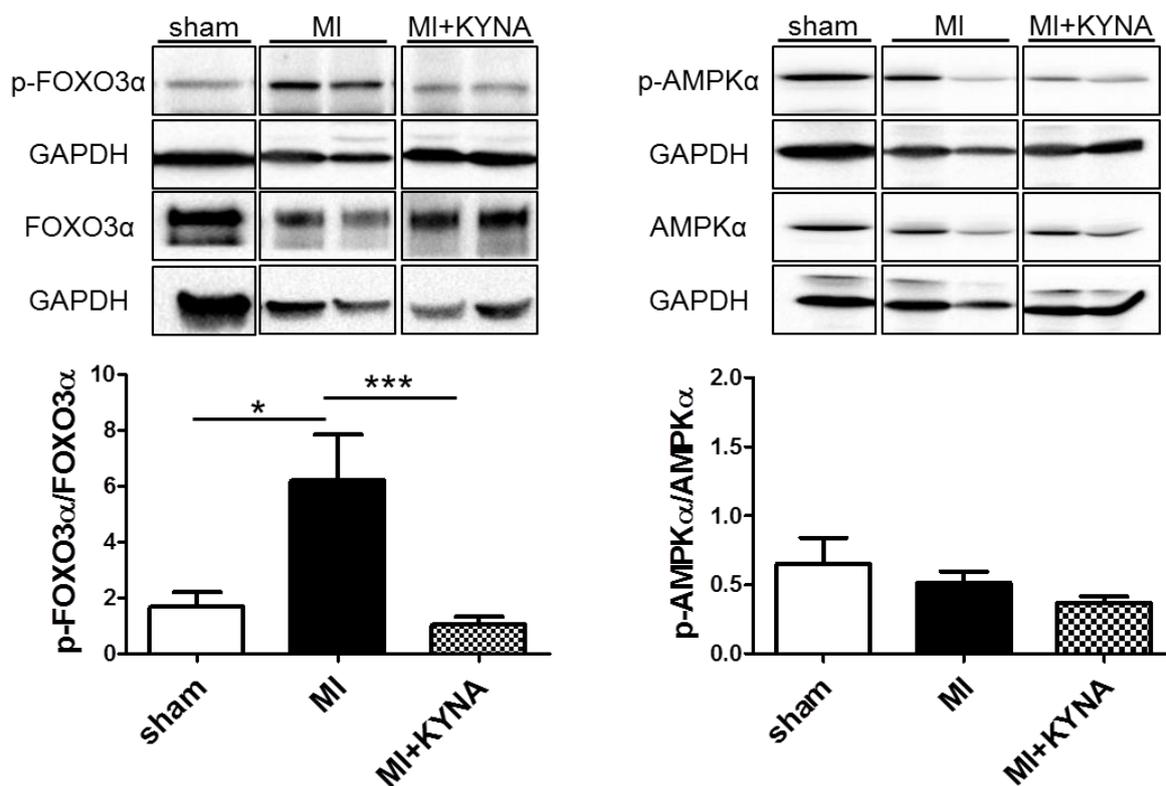


Fig. 8: Western blot analysis of AMPK α and FOXO3 α phosphorylation. Representative immunoblots and histogram showing quantification of protein expression for AMPK α and FOXO3 α in non-ischemic (sham), ischemic + vehicle (MI), and ischemic + kynurenic acid (MI+KYNA) left ventricle samples after 15 minutes of reperfusion (n=6-11). GAPDH was used as loading control. Values are expressed as mean \pm SEM. * p<0.05, *** p<0.001.

4. DISCUSSION

Tryptophan is mainly catabolized through the kynurenine pathway. The first metabolite generated is kynurenine which in turn can be metabolized into KYNA. Previous studies demonstrated neuroprotective abilities of KYNA. In a neonatal rat cerebral ischemia/reperfusion model (left carotid artery ligation), KYNA was administrated at 300 mg/Kg 2 hours after cerebral hypoxia. This induced a reduction in brain lesions (Andine et al. 1988). In another model, a middle cerebral artery occlusion rat model, a pre-treatment with KYNA, also at 300 mg/Kg, reduced cerebral infarct size (Germano et al. 1987). Little is known regarding the ability of KYNA to protect the heart in the context of myocardial ischemia-reperfusion. We previously reported that increased plasmatic concentrations of kynurenine, the precursor of KYNA, were associated with the cardioprotection induced by remote ischemic conditioning (Chao de la Barca et al. 2016; Kouassi Nzoughet et al. 2017). Moreover, a protective role of KYNA was recently described in a mice model of myocardial ischemia/reperfusion injury (Olenchok et al. 2016). Olenchok et al. generated a mouse model with an alpha-ketoglutarate (α KG)-dependent dioxygenase's (*Egln1*) somatic gene ablation. EGLN1 senses oxygen and regulates the hypoxia-inducible factor (HIF) transcription factor, thus coordinating adaptive cellular response to hypoxia/ischemia (Kaelin and Ratcliffe 2008). These mice were protected against myocardial ischemia/reperfusion injuries *via* a KYNA increase. Authors reported that EGLN1 downregulation induced an accumulation of circulating α -ketoglutarate, which is the co-factor for KYNA production. KYNA, in its turn, was increased and mediated cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injuries. They confirmed their findings by re-injecting KYNA to mice 2 hours before and 2 hours after a myocardial ischemia/reperfusion, and were capable of stimulating cardioprotection (Olenchok et al. 2016). However mechanisms and signaling pathways by which KYNA can mediate cardioprotection were unknown. In the present study, we showed that KYNA was capable of reducing ischemia/reperfusion injuries in both *in vitro* rat cardiomyoblast H9C2 hypoxia/reoxygenation cell model and *in vivo* myocardial infarction rat model. In addition, our results suggest that KYNA-induced cardioprotection may be associated with ERK1/2 and Akt phosphorylation inhibition, which leads to a decrease in FOXO3 α degradation, hence increasing mitophagy and antioxidant defense mechanisms (Fig. 9).

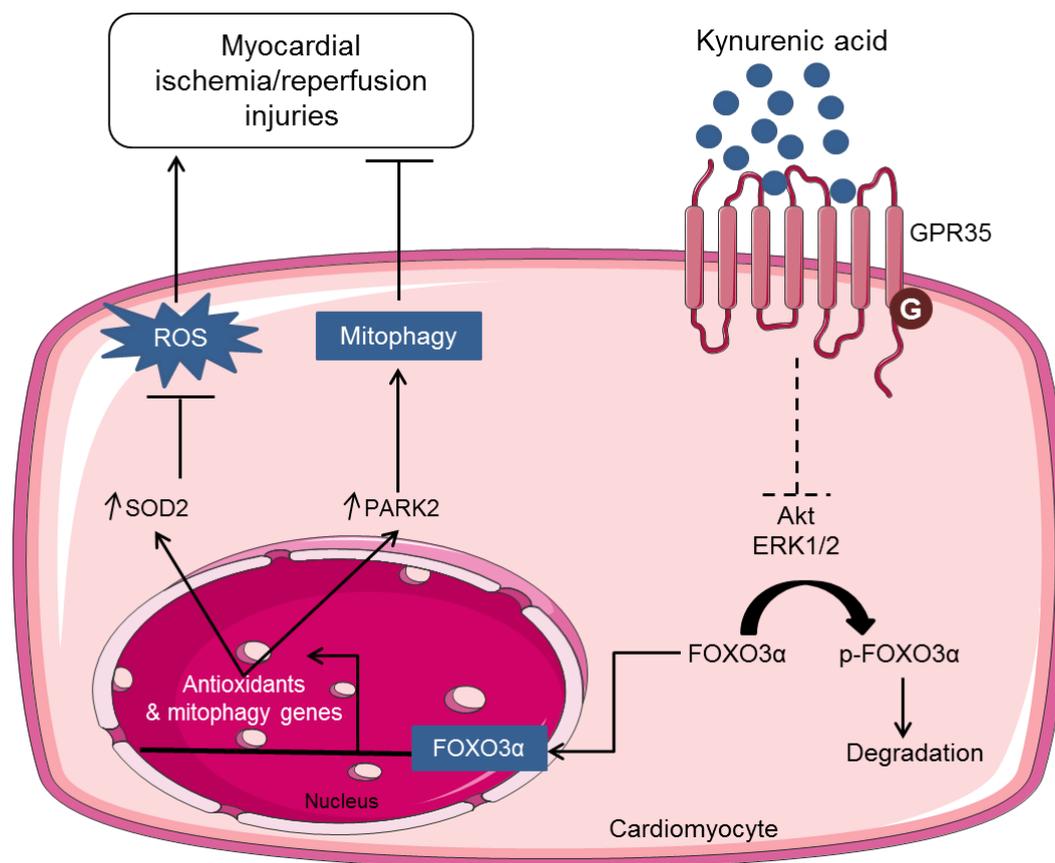


Fig. 9: Schematic representation summarizing proposed signaling pathways activated by KYNA to decrease myocardial ischemia/reperfusion injuries. KYNA inhibits ERK1/2 and Akt phosphorylation, kinases known to phosphorylate FOXO3 α , thus promoting its degradation. Once, FOXO3 α 's inhibition is lifted, it can stimulate transcription of gene implicated in antioxidant defense and mitophagy. In turn, these proteins ensure a decrease in reactive oxygen species (ROS) and an adequate elimination of defective mitochondria respectively, which will allow myocardial ischemia/reperfusion injuries decrease. Moreover, KYNA up-regulates GPR35 expression. The latter's role in mediating ERK1/2 and Akt inhibition remains to be confirmed.

Ischemia/reperfusion injuries are associated with a dysfunction in oxidative phosphorylation (Lesnefsky et al. 1997). Indeed complex I and III's activity is modulated after ischemia (Rouslin 1983; Lesnefsky et al. 2001). These complexes are key sites generating ROS responsible for mitochondrial and eventual myocardial damage (Chen et al. 2003; Ambrosio et al. 1993). A reversible blockage of complex I (e.g. by amobarbital) during ischemia largely avoided reperfusion injury (Chen et al. 2006; Chen et al. 2018). Cardioprotection is partly related to a lesser ROS damage, a better cytochrome c retention and a preservation of the outer membrane integrity (Chen et al. 2006). In a previous work, KYNA effect on mitochondrial respiration was assessed by oxygraphy (Baran et al. 2016; Baran et al. 2001; Baran et al. 2003). KYNA was capable of acting as an oxidative phosphorylation uncoupler thus decreasing mitochondrial respiration in mitochondria isolated from rat heart under basal conditions, i.e.

without ischemia/reperfusion. Hence, we tested the hypothesis that KYNA could decrease myocardial ischemia/reperfusion injuries by modulating mitochondrial function. In our model, KYNA did not influence mitochondrial respiratory chain complex I, II, III and IV protein expression or activities after ischemia/reperfusion, suggesting that KYNA-induced cardioprotection may not act through mitochondrial respiratory chain complexes modulation.

KYNA was identified as an endogenous ligand for GPR35, a G protein-coupled receptor, using inositol phosphate production and calcium mobilization assays (Wang et al. 2006). More importantly, KYNA was screened to show its effectiveness and selectiveness in activating approximately 40 other G protein-coupled receptors. KYNA did not activate other receptors, even GPR55, the closest homologue of GPR35, showing a certain specificity of KYNA towards GPR35. GPR35 was found positively regulated in the acute phase of myocardial infarction and in cultured cardiomyocytes hypoxia cell models (HL-1 and neonatal mouse cardiomyocytes) (Ronkainen et al. 2014). In 2014, Ronkainen et al. reported an increase in GPR35 mRNA after hypoxia that was concomitantly associated with an increase in HIF-1 α mRNA expression (Ronkainen et al. 2014). Similarly with other G protein-coupled receptors, GPR35 has been suggested to modulate ERK1/2 and Akt phosphorylation levels (Oka et al. 2010; Deng, Hu, and Fang 2011). Indeed, using phospho-ERK1/2 immunoblotting, ligand activation of GPR35 was demonstrated (Oka et al. 2010; Deng, Hu, and Fang 2011). In these studies, 2-oleoyl lysophosphatidic acid and tyrphostin-51 were recognized as GPR35 agonists using this type of experiment. Use of pertussis toxin, which abolishes G α_{i0} mediated response, confirmed ERK1/2 phosphorylation stimulation by GPR35 (Zhao et al. 2010). KYNA has been shown to either stimulate or inhibit ERK1/2 or Akt phosphorylation. In a work conducted on inguinal primary adipocytes, KYNA induced an increase of phosphorylation of ERK1/2. In contrast, KYNA decreased phosphorylation of Akt and ERK1/2 on colon adenocarcinoma HT-29 cells, (Walczak, Turski, and Rajtar 2014). Hence, the exact link between KYNA, GPR35 and ERK1/2, Akt is yet to be established. Furthermore, to the best of our knowledge, KYNA effect on cardiomyocytes has not been reported before the present study. In our *in vivo* model, KYNA-induced cardioprotection was associated with an upregulation of GPR35 mRNA, and an inhibition of ERK1/2 and Akt phosphorylation.

FOXO3 α is a transcription factor known for its role in promoting transcription of genes implicated in mitophagy and antioxidant defense (Sundaresan et al. 2009; Yang and Hung 2009). FOXO3 α 's activity is regulated by multiple post-translational modifications. FOXO3 α phosphorylation by ERK1/2 and Akt (Yang and Hung 2009) is a signal ensuring its degradation (Ronnebaum and Patterson 2010; Wang, Hu, and Liu 2017). Moreover, AMPK α activates FOXO3 α translocation to the nucleus by inhibiting its Akt-induced phosphorylation (Yung et al. 2013). In our work the decrease in FOXO3 α

phosphorylation was associated with an ERK1/2 and Akt phosphorylation levels decrease. However, we did not highlight AMPK α activation at 15 min of reperfusion. We found a SOD2 mRNA levels significant increase and a high trend of increase in catalase protein expression levels in the KYNA-treated group compared to vehicle-treated group. In a study by Wang et al. FOXO3 α has been reportedly associated with increased antioxidant genes transcription, thus decreasing myocardial ischemia/reperfusion injuries (Wang et al. 2016). Furthermore, we found an increase in PARK2 levels suggesting an increase in mitophagy, associated with a decrease, although not significant, in p62 protein levels. Several studies showed the importance of FOXO3 α in regulating Parkin-mediated mitophagy (Yu et al. 2017; Das et al. 2014; Mei et al. 2009). Indeed, Mei et al. demonstrated a direct interaction between FOXO3 α and (PTEN)-induced putative kinase 1 (PINK1) promoter. PINK1 is an important factor in the Parkin-mediated mitochondrial autophagic pathway. Moreover, the importance of mitophagy has been highlighted in cardioprotection (Moyzis, Sadoshima, and Gustafsson 2015). For instance, Parkin-deficient mice presented larger infarct size compared to wild type, which was associated with a reduced mitophagy, and accumulation of defective mitochondria (Kubli et al. 2013). Moreover, Parkin loss in mice abolished cardioprotective effect of ischemic preconditioning (Huang et al. 2011). This proves that maintaining the integrity of mitophagy in cardiomyocytes is crucial.

5. LIMITS

Herein, our *in vitro* work demonstrated cytoprotective effects of KYNA in H9C2 cells, a widely used immortalized cardiomyoblast cell line. These cells present a phenotype different than that of adult cardiomyocytes. However, we confirmed KYNA-induced cardioprotection in an *in vivo* rat myocardial ischemia/reperfusion model and proposed possible mechanisms.

In order to decipher underlying mechanisms, we chose to work in a pre-treatment model with a high dose of KYNA. Hence, we will need further studies to translate our findings in the clinical arena.

6. CONCLUSION

KYNA reduced ischemia/reperfusion injuries in both *in vitro* and *in vivo* models. KYNA-mediated cardioprotection was associated with decreased ERK1/2 and Akt phosphorylation levels, which may have led to a decrease in FOXO3 α phosphorylation, mechanism that was associated with an increased mitophagy and antioxidant defense mechanisms.

SOURCES OF FUNDING

This work was supported by a grant from Fédération Française de Cardiologie.

DISCLOSURE

None

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the University Hospital's Joint Animal Care Department (Service commun d'animalerie hospitalo-universitaire) and the PACEM (Plateforme d'Analyse Cellulaire et Moléculaire) platform.

REFERENCES

- [1] T. Montrief, W.T. Davis, A. Koyfman, B. Long, Mechanical, inflammatory, and embolic complications of myocardial infarction: An emergency medicine review, *Am J Emerg Med* 37(6) (2019) 1175-1183 DOI: 10.1016/j.ajem.2019.04.003.
- [2] J.M. Chao de la Barca, O. Bakhta, H. Kalakech, G. Simard, S. Tamareille, V. Catros, J. Callebert, C. Gadras, L. Tessier, P. Reynier, F. Prunier, D. Mirebeau-Prunier, Metabolic Signature of Remote Ischemic Preconditioning Involving a Cocktail of Amino Acids and Biogenic Amines, *J Am Heart Assoc* 5(9) (2016) DOI: 10.1161/JAHA.116.003891.
- [3] J. Kouassi Nzoughe, C. Bocca, G. Simard, D. Prunier-Mirebeau, J.M. Chao de la Barca, D. Bonneau, V. Procaccio, F. Prunier, G. Lenaers, P. Reynier, A Nontargeted UHPLC-HRMS Metabolomics Pipeline for Metabolite Identification: Application to Cardiac Remote Ischemic Preconditioning, *Anal Chem* 89(3) (2017) 2138-2146 DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04912.
- [4] Q. Wang, D. Liu, P. Song, M.H. Zou, Tryptophan-kynurenine pathway is dysregulated in inflammation, and immune activation, *Front Biosci (Landmark Ed)* 20 (2015) 1116-43.
- [5] E. Wirthgen, A. Hoeflich, A. Rebl, J. Gunther, Kynurenic Acid: The Janus-Faced Role of an Immunomodulatory Tryptophan Metabolite and Its Link to Pathological Conditions, *Front Immunol* 8 (2017) 1957 DOI: 10.3389/fimmu.2017.01957.
- [6] B.A. Olenchok, J. Moslehi, A.H. Baik, S.M. Davidson, J. Williams, W.J. Gibson, A.A. Chakraborty, K.A. Pierce, C.M. Miller, E.A. Hanse, A. Kelekar, L.B. Sullivan, A.J. Wagers, C.B. Clish, M.G. Vander Heiden, W.G. Kaelin, Jr., EGLN1 Inhibition and Rerouting of alpha-Ketoglutarate Suffice for Remote Ischemic Protection, *Cell* 164(5) (2016) 884-95 DOI: 10.1016/j.cell.2016.02.006.
- [7] R. Lugo-Huitron, T. Blanco-Ayala, P. Ugalde-Muniz, P. Carrillo-Mora, J. Pedraza-Chaverri, D. Silva-Adaya, P.D. Maldonado, I. Torres, E. Pinzon, E. Ortiz-Islas, T. Lopez, E. Garcia, B. Pineda, M. Torres-Ramos, A. Santamaria, V.P. La Cruz, On the antioxidant properties of kynurenic acid: free radical scavenging activity and inhibition of oxidative stress, *Neurotoxicol Teratol* 33(5) (2011) 538-47 DOI: 10.1016/j.ntt.2011.07.002.
- [8] A. Perez-Gonzalez, J.R. Alvarez-Idaboy, A. Galano, Free-radical scavenging by tryptophan and its metabolites through electron transfer based processes, *J Mol Model* 21(8) (2015) 213 DOI: 10.1007/s00894-015-2758-2.
- [9] V.P. Ronkainen, T. Tuomainen, J. Huusko, S. Laidinen, M. Malinen, J.J. Palvimo, S. Yla-Herttuala, O. Vuolteenaho, P. Tavi, Hypoxia-inducible factor 1-induced G protein-coupled receptor 35 expression

is an early marker of progressive cardiac remodelling, *Cardiovasc Res* 101(1) (2014) 69-77 DOI: 10.1093/cvr/cvt226.

[10] A.E. Mackenzie, J.E. Lappin, D.L. Taylor, S.A. Nicklin, G. Milligan, GPR35 as a Novel Therapeutic Target, *Front Endocrinol (Lausanne)* 2 (2011) 68 DOI: 10.3389/fendo.2011.00068.

[11] J.Y. Yang, M.C. Hung, A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer, *Clin Cancer Res* 15(3) (2009) 752-7 DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0124.

[12] T. Bochaton, C. Crola-Da-Silva, B. Pillot, C. Villedieu, L. Ferreras, M.R. Alam, H. Thibault, M. Strina, A. Gharib, M. Ovize, D. Baetz, Inhibition of myocardial reperfusion injury by ischemic postconditioning requires sirtuin 3-mediated deacetylation of cyclophilin D, *J Mol Cell Cardiol* 84 (2015) 61-9 DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.03.017.

[13] I.M. Germano, L.H. Pitts, B.S. Meldrum, H.M. Bartkowski, R.P. Simon, Kynurenate inhibition of cell excitation decreases stroke size and deficits, *Ann Neurol* 22(6) (1987) 730-4 DOI: 10.1002/ana.410220609.

[14] S.L. Leib, Y.S. Kim, D.M. Ferriero, M.G. Tauber, Neuroprotective effect of excitatory amino acid antagonist kynurenic acid in experimental bacterial meningitis, *J Infect Dis* 173(1) (1996) 166-71 DOI: 10.1093/infdis/173.1.166.

[15] P. Andine, A. Lehmann, K. Ellren, E. Wennberg, I. Kjellmer, T. Nielsen, H. Hagberg, The excitatory amino acid antagonist kynurenic acid administered after hypoxic-ischemia in neonatal rats offers neuroprotection, *Neurosci Lett* 90(1-2) (1988) 208-12.

[16] W.G. Kaelin, Jr., P.J. Ratcliffe, Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway, *Mol Cell* 30(4) (2008) 393-402 DOI: 10.1016/j.molcel.2008.04.009.

[17] E.J. Lesnefsky, B. Tandler, J. Ye, T.J. Slabe, J. Turkaly, C.L. Hoppel, Myocardial ischemia decreases oxidative phosphorylation through cytochrome oxidase in subsarcolemmal mitochondria, *Am J Physiol* 273(3 Pt 2) (1997) H1544-54 DOI: 10.1152/ajpheart.1997.273.3.H1544.

[18] W. Rouslin, Mitochondrial complexes I, II, III, IV, and V in myocardial ischemia and autolysis, *Am J Physiol* 244(6) (1983) H743-8 DOI: 10.1152/ajpheart.1983.244.6.H743.

[19] E.J. Lesnefsky, T.I. Gudz, C.T. Migita, M. Ikeda-Saito, M.O. Hassan, P.J. Turkaly, C.L. Hoppel, Ischemic injury to mitochondrial electron transport in the aging heart: damage to the iron-sulfur protein subunit of electron transport complex III, *Arch Biochem Biophys* 385(1) (2001) 117-28 DOI: 10.1006/abbi.2000.2066.

- [20] Q. Chen, E.J. Vazquez, S. Moghaddas, C.L. Hoppel, E.J. Lesnefsky, Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III, *J Biol Chem* 278(38) (2003) 36027-31 DOI: 10.1074/jbc.M304854200.
- [21] G. Ambrosio, J.L. Zweier, C. Duilio, P. Kuppasamy, G. Santoro, P.P. Elia, I. Tritto, P. Cirillo, M. Condorelli, M. Chiariello, et al., Evidence that mitochondrial respiration is a source of potentially toxic oxygen free radicals in intact rabbit hearts subjected to ischemia and reflow, *J Biol Chem* 268(25) (1993) 18532-41.
- [22] Q. Chen, S. Moghaddas, C.L. Hoppel, E.J. Lesnefsky, Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion, *J Pharmacol Exp Ther* 319(3) (2006) 1405-12 DOI: 10.1124/jpet.106.110262.
- [23] Q. Chen, M. Younus, J. Thompson, Y. Hu, J.M. Hollander, E.J. Lesnefsky, Intermediary metabolism and fatty acid oxidation: novel targets of electron transport chain-driven injury during ischemia and reperfusion, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 314(4) (2018) H787-H795 DOI: 10.1152/ajpheart.00531.2017.
- [24] H. Baran, K. Staniek, M. Bertignol-Sporr, M. Attam, C. Kronsteiner, B. Kepplinger, Effects of Various Kynurenine Metabolites on Respiratory Parameters of Rat Brain, Liver and Heart Mitochondria, *Int J Tryptophan Res* 9 (2016) 17-29 DOI: 10.4137/IJTR.S37973.
- [25] H. Baran, K. Staniek, B. Kepplinger, L. Gille, K. Stolze, H. Nohl, Kynurenic acid influences the respiratory parameters of rat heart mitochondria, *Pharmacology* 62(2) (2001) 119-23 DOI: 10.1159/000056082.
- [26] H. Baran, K. Staniek, B. Kepplinger, J. Stur, M. Draxler, H. Nohl, Kynurenines and the respiratory parameters on rat heart mitochondria, *Life Sci* 72(10) (2003) 1103-15.
- [27] J. Wang, N. Simonavicius, X. Wu, G. Swaminath, J. Reagan, H. Tian, L. Ling, Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35, *J Biol Chem* 281(31) (2006) 22021-8 DOI: 10.1074/jbc.M603503200.
- [28] S. Oka, R. Ota, M. Shima, A. Yamashita, T. Sugiura, GPR35 is a novel lysophosphatidic acid receptor, *Biochem Biophys Res Commun* 395(2) (2010) 232-7 DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.03.169.
- [29] H. Deng, H. Hu, Y. Fang, Tyrphostin analogs are GPR35 agonists, *FEBS Lett* 585(12) (2011) 1957-62 DOI: 10.1016/j.febslet.2011.05.026.

- [30] P. Zhao, H. Sharir, A. Kapur, A. Cowan, E.B. Geller, M.W. Adler, H.H. Seltzman, P.H. Reggio, S. Heynen-Genel, M. Sauer, T.D. Chung, Y. Bai, W. Chen, M.G. Caron, L.S. Barak, M.E. Abood, Targeting of the orphan receptor GPR35 by pamoic acid: a potent activator of extracellular signal-regulated kinase and beta-arrestin2 with antinociceptive activity, *Mol Pharmacol* 78(4) (2010) 560-8 DOI: 10.1124/mol.110.066746.
- [31] K. Walczak, W.A. Turski, G. Rajtar, Kynurenic acid inhibits colon cancer proliferation in vitro: effects on signaling pathways, *Amino Acids* 46(10) (2014) 2393-401 DOI: 10.1007/s00726-014-1790-3.
- [32] N.R. Sundaresan, M. Gupta, G. Kim, S.B. Rajamohan, A. Isbatan, M.P. Gupta, Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice, *J Clin Invest* 119(9) (2009) 2758-71 DOI: 10.1172/JCI39162.
- [33] S.M. Ronnebaum, C. Patterson, The FoxO family in cardiac function and dysfunction, *Annu Rev Physiol* 72 (2010) 81-94 DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135931.
- [34] X. Wang, S. Hu, L. Liu, Phosphorylation and acetylation modifications of FOXO3a: Independently or synergistically?, *Oncol Lett* 13(5) (2017) 2867-2872 DOI: 10.3892/ol.2017.5851.
- [35] M.M. Yung, D.W. Chan, V.W. Liu, K.M. Yao, H.Y. Ngan, Activation of AMPK inhibits cervical cancer cell growth through AKT/FOXO3a/FOXM1 signaling cascade, *BMC Cancer* 13 (2013) 327 DOI: 10.1186/1471-2407-13-327.
- [36] X.X. Wang, X.L. Wang, M.M. Tong, L. Gan, H. Chen, S.S. Wu, J.X. Chen, R.L. Li, Y. Wu, H.Y. Zhang, Y. Zhu, Y.X. Li, J.H. He, M. Wang, W. Jiang, SIRT6 protects cardiomyocytes against ischemia/reperfusion injury by augmenting FoxO3alpha-dependent antioxidant defense mechanisms, *Basic Res Cardiol* 111(2) (2016) 13 DOI: 10.1007/s00395-016-0531-z.
- [37] W. Yu, B. Gao, N. Li, J. Wang, C. Qiu, G. Zhang, M. Liu, R. Zhang, C. Li, G. Ji, Y. Zhang, Sirt3 deficiency exacerbates diabetic cardiac dysfunction: Role of Foxo3A-Parkin-mediated mitophagy, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863(8) (2017) 1973-1983 DOI: 10.1016/j.bbadis.2016.10.021.
- [38] S. Das, G. Mitrovsky, H.R. Vasanthi, D.K. Das, Antiaging properties of a grape-derived antioxidant are regulated by mitochondrial balance of fusion and fission leading to mitophagy triggered by a signaling network of Sirt1-Sirt3-Foxo3-PINK1-PARKIN, *Oxid Med Cell Longev* 2014 (2014) 345105 DOI: 10.1155/2014/345105.

- [39] Y. Mei, Y. Zhang, K. Yamamoto, W. Xie, T.W. Mak, H. You, FOXO3a-dependent regulation of Pink1 (Park6) mediates survival signaling in response to cytokine deprivation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(13) (2009) 5153-8 DOI: 10.1073/pnas.0901104106.
- [40] A.G. Moyzis, J. Sadoshima, A.B. Gustafsson, Mending a broken heart: the role of mitophagy in cardioprotection, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 308(3) (2015) H183-92 DOI: 10.1152/ajpheart.00708.2014.
- [41] D.A. Kubli, X. Zhang, Y. Lee, R.A. Hanna, M.N. Quinsay, C.K. Nguyen, R. Jimenez, S. Petrosyan, A.N. Murphy, A.B. Gustafsson, Parkin protein deficiency exacerbates cardiac injury and reduces survival following myocardial infarction, *J Biol Chem* 288(2) (2013) 915-26 DOI: 10.1074/jbc.M112.411363.
- [42] C. Huang, A.M. Andres, E.P. Ratliff, G. Hernandez, P. Lee, R.A. Gottlieb, Preconditioning involves selective mitophagy mediated by Parkin and p62/SQSTM1, *PLoS One* 6(6) (2011) e20975 DOI: 10.1371/journal.pone.0020975.

Titre : Rôle de la clusterine à la phase aiguë de l'infarctus du myocarde

Mots clés : Infarctus du myocarde, cardioprotection, clusterine, histones extracellulaires, inflammation

Résumé : L'infarctus du myocarde (IDM) est une pathologie décrite comme étant la mort massive des cellules myocardiques à la suite d'une ischémie prolongée. La reperfusion, bien qu'elle soit essentielle pour sauver le myocarde ischémique, est elle-même à l'origine de lésions irréversibles. Les recherches se poursuivent dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour protéger le cœur contre les lésions d'ischémie/reperfusion (I/R). Récemment, un effet cardioprotecteur de la clusterine (CLU) exogène, une chaperonne extracellulaire, a été démontré *in vivo*. L'objectif de cette thèse était de tester l'hypothèse que la CLU exerce son effet cardioprotecteur en neutralisant les propriétés cytotoxiques et inflammatoires des histones extracellulaires, signaux de dangers endogènes libérés par les cellules mortes post-IDM.

Dans ce travail, nous avons déterminé la cinétique de la libération de la CLU, des histones et de la formation des complexes CLU-histones au décours de l'IDM. Nous avons ainsi analysé l'effet cardioprotecteur de la CLU dans des modèles *in vitro* et pré-clinique d'IDM. Enfin, nous avons recherché les voies de signalisation inflammatoire modulées par la CLU dans le contexte de l'IDM. Les résultats montrent que la CLU forme des complexes avec les histones extracellulaires et exerce son effet cardioprotecteur en réduisant la cytotoxicité induite par les histones extracellulaires et l'activité de l'inflammasome dans le contexte des lésions d'I/R. Ces données suggèrent qu'une stratégie thérapeutique impliquant la CLU et ciblant les histones extracellulaires pourrait diminuer les lésions d'I/R.

Title : Role of clusterin in the acute phase of myocardial infarction

Keywords : Myocardial infarction, cardioprotection, clusterin, extracellular histones, inflammation

Abstract: Myocardial infarction (MI) is defined as a massive myocardial cell death following prolonged ischemia. Reperfusion, although essential for ischemic myocardium salvage, can itself induce irreversible myocardial injury. Therefore, research is ongoing to discover new therapeutic targets to protect the heart against ischemia/reperfusion (I/R) injuries. Recently, a cardioprotective effect of exogenous clusterin (CLU), an extracellular chaperone, in reducing myocardial infarct size has been demonstrated *in vivo*. The aim of this thesis was to hypothesize that CLU exerts its protective effect on MI by neutralizing the cytotoxic and inflammatory properties of extracellular histones, damage-associated molecular patterns released by dead cells after MI.

In this work, we determined the kinetics of CLU and histone release and CLU-histone complexes formation during MI. We thus analyzed the existence of the cardioprotective effect of CLU *in vitro* and preclinical models of MI. Finally, we investigated the inflammatory signaling pathways modulated by CLU in the context of MI. The results show that CLU forms complexes with extracellular histones and exerts its cardioprotective effect by reducing histone-induced cytotoxicity and inflammasome activity in the context of I/R injuries. These data suggest that a therapeutic strategy involving CLU and targeting extracellular histones could reduce I/R injuries.