

TLEMCEM

N° D'ORDRE :



UNIVERSITE DE TLEMCEM–ABOU-BEKR BELKAID

FACULTE SNV/STU–DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie –
BIOMOLIM

THESE DE DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur PhD. 3^{ème} cycle
LMD en Biologie

Spécialité : Immunologie Appliquée

Présentée par
Imène **BELHASSENA**

Sujet de la Thèse :

**Etude *ex vivo* du niveau d'expression de la molécule CD40 et des marqueurs
phénotypiques CD14 et CD16 des sous-populations du monocyte traité par l'aspirine
au cours de l'auto-inflammation de l'infarctus du myocarde**

Sous la direction des Professeurs :

Mourad ARIBI
Sid-Ahmed Chawki
LAMARA

Université de Tlemcen, Algérie
Université Oran 1 Ahmed Ben-Bella,
Algérie

Devant les membres du jury :

Pr Nassima Amel MOKHTARI-SOULIMANE	Université de Tlemcen, Algérie	Présidente du jury
Pr Chafia TOUIL-BOUKOFFA	Université USTHB, Alger, Algérie	Examinatrice
MCA Franck MENNECHET	Université de Montpellier, France	Examinateur
MCA Radia BALI née TABET AOUL	Université de Tlemcen, Algérie	Examinatrice

19 Juillet 2020

TLEMCEM

N° D'ORDRE :



UNIVERSITE DE TLEMCEM-ABOU-BEKR BELKAID

FACULTE SNV/STU-DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie –
BIOMOLIM

THESE DE DOCTORAT

Présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur PhD. 3^{ème} cycle
LMD en Biologie

Spécialité : Immunologie Appliquée

Présentée par
Imène BELHASSENA

Sujet de la Thèse :

**Etude *ex vivo* du niveau d'expression de la molécule CD40 et des marqueurs
phénotypiques CD14 et CD16 des sous-populations du monocyte traité par l'aspirine
au cours de l'auto-inflammation de l'infarctus du myocarde**

Sous la direction des Professeurs :

Mourad ARIBI
Sid-Ahmed Chawki
LAMARA

Université de Tlemcen, Algérie
Université Oran 1 Ahmed Ben-Bella,
Algérie

Devant les membres du jury :

Pr	Nassima Amel MOKHTARI-SOULIMANE	Université de Tlemcen, Algérie	Présidente du jury
Pr	Chafia TOUIL-BOUKOFFA	Université USTHB, Alger, Algérie	Examinatrice
MCA	Franck MENNECHET	Université de Montpellier, France	Examinateur
MCA	Radia BALI née TABET AOUL	Université de Tlemcen, Algérie	Examinatrice

19 Juillet 2020

Avant-propos

A la personne que j'aime le plus au monde ; à mon Papa. Tu n'es pas présent aujourd'hui mais j'espère que cela t'aurais rendu fier ...

Ce travail de thèse a été effectué au niveau du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie (BIOMOLIM), Université de Tlemcen, sous la direction du Professeur Mourad ARIBI.

A l'issue de ce travail achevé, je tiens à remercier mes Directeurs de thèse :

Professeur Mourad ARIBI, Directeur du Laboratoire de Recherche Biologie Moléculaire Appliquée et Immunologie – BIOMOLIM, W0414100, Université de Tlemcen, Algérie, de m'avoir confié la réalisation sur paillasse de l'une de ses grandes idées originales qui ne font que refléter son génie scientifique. Cette recherche a pour objectif d'évaluer l'effet immuno-modulateur de l'aspirine sur les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des monocytes au cours de l'auto-inflammation de l'infarctus du myocarde.

Professeur, c'est à vos côtés que j'ai appris à mener une recherche mécanistique à travers la culture cellulaire, vous m'avez fait découvrir le monde des cytokines et appris à réaliser la technique d'immunofluorescence et d'imagerie cellulaire. C'est ainsi après de longs mois de patience, que nous sommes arrivés à déterminer les dilutions appropriées. Viennent après des veillées tardives au Laboratoire pour l'interprétation des résultats et la correction de l'article. Je tiens à exprimer mon admiration pour la façon minutieuse avec laquelle vous traiter l'information. Vos conseils constructifs m'ont été, me sont et me seront d'une grande utilité à l'avenir. Vous m'avez tout appris, Merci d'être mon mentor.

Professeur Sid-Ahmed Chawki LAMARA, Chef du Département de Biotechnologie, Université Oran 1 Ahmed Ben-Bella, Algérie, d'avoir accepté de participer à l'encadrement de ma thèse. Merci aussi pour votre soutien et vos encouragements au cours de mon parcours.

Je remercie également les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse :

Professeure Nassima Amel MOKHTARI-SOULIMANE, Doyenne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Tlemcen, Algérie, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de ma soutenance de thèse.

Professeure Chafia TOUIL-BOUKOFFA, Equipe Cytokines et NO Synthases, Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire – LBCM, Faculté (USTHB), Alger, Algérie, d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit de thèse, il m'est d'un grand honneur. Le Professeur Mourad ARIBI n'a pas tari d'éloges à votre égard.

Professeure Radia BALI née TABET AOUL, Cardiologue au Centre Hospitalo-universitaire Dr Tidjani Damerdji, Tlemcen, Algérie, d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse en qualité d'examinatrice. Je tiens aussi à vous remercier pour m'avoir chaleureusement accueillie au sein du Service de Cardiologie tout en espérant de futures collaborations qui nous feront partager ensemble des articles internationaux. Merci également à tout le personnel médical de ce Service.

Docteur Franck MENNECHET, Maître de Conférences, Institut de Génétique Moléculaire de Montpellier (IGMM) - UMR5535, CNRS et Université de Montpellier, France, pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je voudrai aussi vous remercier pour toutes vos conférences tenues à l'Université de Tlemcen, vous nous avez beaucoup appris.

Je remercie également tous les membres du Laboratoire de BIOMOLIM pour toutes les fois où nous nous sommes échangés des discussions scientifiques et parfois des remarques constructives sans la moindre once de méchanceté. Merci d'avoir grandement animé la vie dans le Laboratoire.

Il faut aussi savoir qu'un parcours de Doctorat n'est toujours pas aussi facile, il y a des hauts et des bas, on peut être touchés par des découragements ou de l'euphorie mais au final on n'y arrive grâce à des personnes à travers lesquelles on puise notre force et notre acharnement. Cette force je l'ai eu de mes parents, je vous remercie pour votre soutien indéfectible de toutes les manières possibles et quelques soit les circonstances. Et comme tout le monde le dit si bien *sans vous je n'aurai pas été ce que je suis maintenant*. Je remercie aussi mes sœurs ; Yasmine et Dalila qui ont toujours été présentes pour moi. Yasmine ; merci pour toutes les fois où tu te souciais pour moi. Je remercie aussi mes deux frères Mohamed et Ihssène et Lily pour son sourire qui m'a nourrit d'espoir.

Je voudrai aussi exprimer une profonde pensée aux patients que j'ai croisés et à ceux qui ont participé à l'étude. Je pense affectueusement à vous.

Résumé

Introduction : Il a été démontré que l'exacerbation de l'expression du CD16 ; considéré comme marqueur phénotypique des monocytes (MOs) intermédiaires et non classiques est impliquée dans la pathogenèse de l'infarctus du myocarde (IDM).

Objectifs : Dans cette étude, nous avons évalué l'effet de l'aspirine (acide acétylsalicylique ou ASA) sur l'expression du CD16 et de l'activation associée au CD40 des MOs au cours de l'IDM.

Méthodes : Les MOs ont été isolés du sang total des patients présentant un IDM et des contrôles sains. Les cellules ont été stimulées et traitées simultanément avec différentes doses d'ASA.

Résultats : L'ASA a significativement diminué la production de l'oxyde nitrique (NO) et l'activité de la NO synthase inductible (iNOS), mais a augmenté de manière significative l'activité d'arginase. Le taux d'interleukine (IL)-1 β , d'IL-6 et d'interféron- γ (IFN- γ) ont diminué, tandis que celui d'IL-10 a augmenté. De plus, l'ASA a induit une augmentation marquée des activités phagocytaire et bactéricide mais aussi une augmentation significative du taux de glucose intracellulaire (i Glu) et des ions de calcium intracellulaire libre (i Ca $^{2+}$) et à l'inverse a induit une diminution significative de la teneur totale du cholestérol cellulaire (t_{cc} CHOL). Par ailleurs, l'expression du CD16 et du CD40 était significativement diminuée à la surface des MOs traités par l'ASA.

Conclusions : Nous démontrons pour la première fois que l'ASA immunomodule les activités fonctionnelles des MOs pendant l'IDM et favorise leur basculement vers le phénotype « classique » présentant une faible expression du CD16 et donc des propriétés anti-inflammatoires.

Mots-clés : Aspirine ; Expression du CD16 (FcR γ IIIa) et du CD40 sur les monocytes humains ; Immunomodulation ; Phénotypes et activités fonctionnelles des monocytes ; Maladie auto-inflammatoire de l'infarctus du myocarde.

Abstract

Background: Exacerbation of CD16 as molecule marker of both intermediate and non-classical monocytes (MOs) has been shown to be involved in the pathogenesis of myocardial infarction (MI).

Objectives: In this study, we have tried to evaluate the aspirin (acetylsalicylic acid, ASA) treatment effect on the CD16-expressed MOs and activation associated CD40 in MI.

Methods: MOs were isolated from the whole blood of healthy controls and patients with MI. The cells were stimulated and treated with different doses of ASA.

Results: ASA significantly decreased nitric oxide (NO) production and inducible NO synthase (iNOS) activity, but significantly increased arginase activity. Levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and interferon- γ (IFN- γ) were downregulated, whereas those of IL-10 were upregulated. Additionally, ASA induced a markedly increase in both phagocytosis and intracellular pathogen killing activities. Moreover, ASA treatment induced significantly upregulation of intracellular levels of glucose (i Glu), and free calcium ions (i rCa²⁺), and, covertly, significantly downregulation of total cellular cholesterol content (i ccCHOL). Furthermore, the expression levels of CD16 and CD40 were significantly downregulated in ASA-treated MOs.

Conclusions: We show for the first time that ASA immunomodulates the functional activities of MOs during MI and promotes their switching toward a classical phenotype, exhibiting low CD16 expression levels and thereby anti-inflammatory properties.

Keywords: Aspirin; Human monocyte CD16 (FcR γ IIIa) and CD40 expression; Immunomodulation; Monocyte phenotypes and functional activities; Myocardial infarction autoinflammatory disease.

ملخص

المقدمة: لقد ثبت أن تفاقم تعبير CD16 التي تعتبر كوسامة جزيئية للخلايا أحادية النواة المتوسطة وغير الكلاسيكية أنها تشارك في التسبب في احتشاء عضلة القلب.

الهدف: في هذه الدراسة، قمنا بتقييم تأثير الأسبرين (حمض أسيتيل الساليسيليك أو ASA) على التعبير عن CD16 والتفعيل المرتبط بي CD40 في الخلايا أحادية النواة أثناء احتشاء عضلة القلب.

الطريقة: تم عزل الخلايا أحادية النواة من الدم الكامل من مرضى يعانون من احتشاء عضلة القلب ومن متبرعين معافين. ثم تم بعدها تحفيز الخلايا ومعالجتها في وقت واحد بجرعات مختلفة من ASA.

النتائج: خفضت ASA بشكل ملحوظ إنتاج أكسيد النيتريك (NO) ونشاط الأنزيم iNOS، ولكنها زادت بشكل ملحوظ من نشاط الأرجيناز. انخفض مستوى الإنترلوكين IL-1 β و IL-6 و IFN- γ ، بينما ارتفع مستوى IL-10. بالإضافة إلى ذلك تسببت ASA في زيادة ملحوظة في الأنشطة البلعمية للجراثيم. أيضاً تم تنظيم إيجابي كبير لمستوى الجلوكوز داخل الخلايا (iGlu) وأيونات الكالسيوم الحرة داخل الخلايا (Ca^{2+}) بينما حدث انخفاضاً كبيراً للمحتوى الكلي للكوليسترول الخولي (tccChol). علاوة على ذلك، تم تقليل التعبير عن CD16 و CD40 بشكل ملحوظ على سطح الخلايا أحادية النواة المعالجة بي ASA.

الاستنتاجات: أثبتنا لأول مرة أن ASA تقوم بتعديل الأنشطة الوظيفية للخلايا أحادية النواة أثناء احتشاء عضلة القلب وتعزز التحول إلى النمط الظاهري " الكلاسيكي " مع تعبير CD16 منخفض وبالتالي خصائص مضادة للالتهابات.

الكلمات المفتاحية: الأسبرين؛ التعبير عن CD16 (FcRyIIIa) و CD40 على الخلايا أحادية النواة؛ التعديل المناعي؛ الأنماط الظاهرية والأنشطة الوظيفية للخلايا أحادية النواة؛ مرض احتشاء عضلة القلب الالتهابي التلقائي.

Liste des figures

Figure 1	Infarctus du myocarde : de l'athérosclérose à la rupture de la plaque d'athérome	4
Figure 2	Mécanisme d'internalisation des LDL-ox par les macrophages	5
Figure 3	Rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'athérosclérose	7
Figure 4	Source cellulaire des MMPs dans l'athérosclérose humaine et rôles opposés des MMPs dans la progression et la stabilité de la plaque d'athérosclérose	10
Figure 5	Dynamique temporelle des cellules immunitaires post-IM	11
Figure 6	Réponse inflammatoire post-infarctus	13
Figure 7	Structure et fonction des NOS	23
Figure 8	Signalisation TLR4	30
Figure 9	Structure chimique et moléculaire de l'aspirine	35
Figure 10	Inhibition de la cyclooxygénase (COX)-1 des plaquettes par l'aspirine	36
Figure 11	Inhibition de COX-1 plaquettaire vs COX-2 monocytaire	38
Figure 12	Aspects immunosuppresseurs de l'aspirine et de ses dérivés à différentes étapes de la réaction inflammatoire	42
Figure 13	Organigramme de l'étude	46
Figure 14	Effet de l'aspirine sur la production du monoxyde d'azote et du peroxyde d'hydrogène par les monocytes des patients présentant un infarctus du myocarde et des contrôles sains	52
Figure 15	Effet de l'aspirine sur les activités d'arginase et d'iNOS des monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains.	53
Figure 16	Effet de l'aspirine sur la capacité phagocytaire et bactéricide des MOs des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains.	54
Figure 17	Effet de l'aspirine sur le taux du calcium intracellulaire des monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains	55
Figure 18	Effet de l'aspirine sur la teneur totale du cholestérol intracellulaire des monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains.	56
Figure 19	Effet de l'aspirine sur le taux du glucose intracellulaire des monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains	57
Figure 20	Effet de l'aspirine sur la production d'IL-1 β , d'IL-6, d'IFN- γ , du TNF- α et d'IL-10 par les monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains	59
Figure 21	Effet de l'aspirine sur l'expression du CD16 et du CD40 et leurs co-expressions avec le CD14 à la surface des monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains	61

Liste des abbreviations

4-AP	4-aminophénazone
AA	Acide arachidonique
ABCA1	<i>Adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1</i>
ABCG1	<i>Adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1</i>
ADCC	Cytotoxicité dépendante de l'anticorps
ADCP	Phagocytose cellulaire dépendante de l'anticorps
AHR	Récepteur d'aryl d'hydrocarbure
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AMPc	Monophosphate cyclique
AP-1	Protéine activatrice 1
ARE	Eléments riches en AU
Arg1	Arginase 1
Arg2	Arginase 2
ASA	Aspirine ou acide acétylsalicylique
ATLs	Epi-lipoxines déclenchées par l'aspirine (<i>aspirin-triggered lipoxins</i>)
BAFF	<i>B cell-activating factor belonging to the TNF family</i>
BH4	Tétrahydrobioptérine
BMDM	Macrophages murins dérivés de la moelle osseuse
C/EBPα	<i>CCAAT/enhancer-binding protein α</i>
CaBPs	Protéines liant le Ca ²⁺
CD	Cluster de différenciation
cDCs	Cellules dendritiques conventionnelles
CLRs	Récepteurs lectines de type C
CMH-II	Complexe majeur d'histocompatibilité II
CMP	Progéniteur myéloïde commun
cNOS	NOS constitutives
Co	Contrôles
COX	Cyclooxygénase
CTCF	<i>Corrected total cell fluorescence</i>
DAG	Diacylglycérol
DAMPs	Motifs moléculaires associés aux dommages
DC	Cellules dendritiques
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Enos	NOS endothéliale

ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FAD	Flavine-adenine dinucleotide
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
FMN	Flavine mononucléotide
FPR2	Récepteur de peptide formyle 2
FT	Facteur tissulaire
GLUT	Transporteurs de glucose
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de granulocytes/macrophages
GMP	Progéniteur granulocyte-monocyte
GOD	Glucose oxydase
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HIF-1α	Facteur induit par l'hypoxie 1 α (<i>hypoxia-inducible factor 1α</i>)
HMG-CoA	Hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA
HRPO	Peroxydase de raifort
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ICSBP	<i>Interferon consensus sequence binding protein</i>
iCa²⁺	Ions de calcium intracellulaire libre
IFN-γ	Interféron- γ
iGlu	Glucose intracellulaire
IKK	I κ B kinase
IL-1R1	Récepteur 1 de l'IL-1 β
IDM	Infarctus du myocarde
iNOS	Oxyde nitrique synthase inductible
IRAK	Kinases associées au récepteur d'IL-1 (<i>IL-1RI-associated protein kinases</i>)
IRF8	Facteur 8 régulateur de l'IFN
ITAM	Motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
IκB	Protéine inhibitrice de NF-K β
JAK	Janus kinase
KLF4	Facteur 4 de type Krueppel
LBP	Protéine de liaison au LPS
LDL	Low-density lipoprotein
LDL-ox	Lipoprotéines de basse densité oxydées (<i>oxidized low-density lipoprotein</i>)

LDL-R	Récepteur des lipoprotéines de basse densité (<i>low-density lipoprotein-receptor</i>)
LO	Lipoxygénases
LOD	Limites de détection
LOX-1	Récepteur de type lectine des lipoprotéines de basse densité oxydées (<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1</i>)
LSP-1	Protéine spécifique des leucocytes 1
LXRα	<i>Liver X Receptor alpha</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
M-CSF	Facteur stimulant les colonies de macrophages (<i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
MDP	<i>Monocyte-dendritic cell progenitor</i>
mHCX	Echangeur H ⁺ /Ca ²⁺
MIP-1α	Protéine inflammatoire des macrophages de type 1 α
MMPs	Métalloprotéinases matricielles (<i>matrix metalloproteinases</i>)
mNCX	Echangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
mo-DCs	Cellules dendritiques dérivées des monocytes
MOs	Monocytes
MPA	Agrégation plaquettes-monocytes
MPO	Myéloperoxydase
MPS	Système des phagocytes mononucléaires
MyD88	Protéine de différenciation myéloïde 88
Mϕs	Macrophages
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NF-κB	Facteur nucléaire kappa-chaîne légère-activateur des cellules B activées
NIK	<i>Nck interacting kinase</i>
NLRP3	Récepteurs de type <i>nucleotid-binding oligomerization domain (NOD)-protein 3</i>
nNOS	NOS neuronale
NO	Oxyde nitrique
NOHA	<i>N^o-hydroxy-L-arginine</i>
NOx	Métabolites oxydatives
NOX	NADPH oxydase
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid-2-related factor 2</i>

O₂⁻	Superoxyde
ONOO⁻	Anion peroxydinitrite
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
PAMPs	Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (<i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PBMCs	Cellules mononucléaires du sang périphérique
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
pDCs	Cellules dendritiques plasmacytoïdes
PE	Phycoérythrine
PG	Prostaglandine
PGI₂	Prostacycline
PHA	Phytohémagglutinine
PI3K	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKC	Protéine kinase C
PKM2	Pyruvate kinase M2
PMCA	Pompe calcique ATP-dépendante de la membrane plasmique
PRRs	Récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (<i>pattern recognition receptors</i>)
PRS	Solution tamponnée de rouge phénol
RIP1	<i>Receptor-interacting protein 1</i>
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (<i>reactive oxygen species</i>)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SEM	Erreur standard de la moyenne
Ser	Sérine
SERCA	<i>Pompe sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase</i>
SR-A	Récepteur scavenger A
SREBP2	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i>
STAT3	Transducteur du signal et activateur de transcription 3
STEMI	Infarctus du myocarde avec élévation du segment ST
SVF ou FBS	Sérum de veau fœtal (<i>fetal bovine serum</i>)
TAB	<i>TAK1-binding protein</i>
TAK1	Kinase 1 activée par les isotypes de TGF-β (<i>transforming growth factor (TGF)-β-activated kinase</i>)
Tampon PAB	<i>Peroxide assay buffer</i>

TBET	Test d'exclusion au bleu Trypan
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TCA	Acide trichloracétique
^{tcc}CHOL	Teneur totale du cholestérol cellulaire
TGF-β	Facteur de croissance transformant (<i>transforming growth factor-β</i>)
TIMPs	Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
TIR	Toll/IL-1 récepteur
TIRAP	Protéine adaptatrice contenant le domaine TIR (<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>)
TLRs	Récepteurs de type Toll (toll-like receptors)
TNF-α	Facteur de nécrose tumorale alpha
TRAFs	Facteurs associés aux récepteurs de TNF
TRAM	Molécule adaptatrice apparentée au TRIF (<i>TIRF-related adaptor molecule</i>)
TRIF	Adaptateur à domaine TIR inducteur d'interféron β (<i>TIR domain-containing adaptor inducing $\gamma\beta$</i>)
TXA₂	Thromboxane A ₂
TXs	Thromboxanes
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VSMCs	Cellules musculaires lisses vasculaires (<i>vascular smooth muscle cells</i>)

Table des matières

Avant-propos	iii
Résumé	v
Abstract	vi
ملخص	vii
Liste des figures	viii
Liste des abbreviations	ix
Table des matières	xiv
Introduction	1
1. Chapitre 1. Revue de la littérature	3
1.1. Infarctus du myocarde	3
1.1.1. Généralités	3
1.1.2. Physiopathologie de l'infarctus du myocarde	4
1.1.2.1. Composante inflammatoire de l'athérosclérose	5
1.1.2.1.1. Oxydation et captation des lipoprotéines de basse densité	5
1.1.2.1.2. Recrutement des monocytes et différenciation en macrophages	5
1.1.2.2. Composante auto-immune et système immunitaire adaptatif	7
1.1.2.2.1. Lymphocytes B	8
1.1.2.2.1.1. Lymphocytes B1	8
1.1.2.2.1.2. Lymphocytes B2	8
1.1.2.2.2. Lymphocytes T	8
1.1.2.2.2.1. Lymphocytes Th1	8
1.1.2.2.2.2. Lymphocytes Th2	9
1.1.2.2.2.3. Lymphocytes Treg	9
1.1.2.3. Déstabilisation et rupture de la plaque d'athérosclérose : Infarctus du myocarde	9
1.1.3. Réponse immuno-inflammatoire lors d'un infarctus du myocarde	10
1.1.3.1. Effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire post-infarctus	10
1.1.3.1.1. Monocytes/Macrophages	11
1.1.3.1.1.1. Monocytes	11
1.1.3.1.1.2. Macrophages	12
1.1.3.2. Effecteurs moléculaires de la réponse immunitaire post-infarctus	12
1.1.3.2.1. Les chimiokines	13
1.1.3.2.2. Les cytokines	14
1.1.3.2.2.1. IL-1 β	14

1.1.3.2.2.2. IL-6.....	14
1.1.3.2.2.3. TNF- α	15
1.1.3.2.2.4. IL-10.....	15
1.2. Monocytes.....	16
1.2.1. Définition	16
1.2.2. Ontogénie et destins cellulaires	16
1.2.2.1. Origine des monocytes fœtaux et post-nataux.....	16
1.2.2.1.1. Régulation extrinsèque	17
1.2.2.1.1.1. Facteurs stimulant les colonies	17
1.2.2.1.1.2. Facteurs synergiques.....	17
1.2.2.1.2. Régulation intrinsèque.....	17
1.2.2.2. Différenciation en macrophages	18
1.2.2.3. Différenciation en cellules dendritiques	19
1.2.3. Classification des monocytes humains	19
1.2.3.1. Expression du CD14.....	19
1.2.3.2. Expression du CD16.....	20
1.2.3.3. Sous-ensembles des monocytes humains.....	21
1.2.4. Caractéristiques fonctionnelles des monocytes.....	22
1.2.4.1. La dichotomie oxyde nitrique synthase inductible/Arginase.....	22
1.2.4.1.1. Oxyde nitrique synthases	22
1.2.4.1.1.1. Expression et régulation de l'oxyde nitrique synthase inductible	23
1.2.4.1.1.2. Production d'oxyde nitrique.....	24
1.2.4.1.2. Activité de l'arginase.....	25
1.2.4.1.3. Switch entre les voies métaboliques de la L-arginine	26
1.2.4.2. Production de peroxyde d'hydrogène	26
1.2.4.3. Phagocytose et destruction bactérienne « Bacterial Killing »	27
1.2.4.4. Production des cytokines	28
1.2.4.4.1. Voie dépendante de MyD88.....	29
1.2.4.4.2. Voie indépendante de MyD88 ou voie TRIF dépendante.....	29
1.2.5. Immuno-métabolisme des monocytes.....	30
1.2.5.1. Dynamique du calcium intracellulaire.....	30
1.2.5.2. Cholestérol cellulaire total.....	31
1.2.5.3. Métabolisme du glucose intracellulaire.....	32
1.2.6. Expression de la molécule de co-stimulation CD40 et voie signalétique.....	33

1.3.	Aspirine	35
1.3.1.	Chimie de l'aspirine	35
1.3.2.	Propriétés pharmacologiques	35
1.3.2.1.	Propriétés dépendantes des cyclooxygénases	35
1.3.2.1.1.	Inhibition des cyclooxygénases	35
1.3.2.1.1.1.	Inhibition de la COX-1 plaquettaire et effet anti-thrombotique.....	35
1.3.2.1.1.2.	Inhibition de la COX-2 et effet anti-inflammatoire.....	36
1.3.2.1.1.3.	Exigences posologiques pour un effet anti-thrombotique et/ou anti inflammatoire	38
1.3.2.2.	Propriétés indépendantes des cyclooxygénases : Inhibition de NF-κB.....	39
1.3.2.3.	Propriétés anti-oxydantes	40
1.3.2.4.	Propriétés anti-pyrétiques	40
1.3.3.	Effets immuno-modulateurs de l'aspirine sur les monocytes/macrophages	41
1.3.4.	Aspirine et infarctus du myocarde.....	43
1.4.	Problématique et objectifs	43
1.4.1.	Problématique	43
1.4.2.	Objectifs	44
1.4.3.	But.....	44
2.	Chapitre 2. Matériels et méthodes.....	45
2.1.	Conception de l'étude et échantillons cellulaires	45
2.2.	Isolement des monocytes et culture cellulaire	46
2.3.	Lyse des monocytes.....	47
2.4.	Dosage des protéines totales	47
2.5.	Evaluation du burst oxydatif.....	47
2.5.1.	Dosage du monoxyde d'azote	47
2.5.2.	Dosage du peroxyde d'hydrogène	48
2.6.	Evaluation de l'activité d'iNOS.....	48
2.7.	Evaluation de l'activité de l'arginase.....	48
2.8.	Test de phagocytose et destruction bactérienne	48
2.9.	Dosage du calcium intracellulaire libre.....	49
2.10.	Dosage de la teneur totale du cholestérol cellulaire.....	49
2.11.	Dosage du glucose intracellulaire.....	49
2.12.	Dosage des cytokines.....	49
2.13.	Imagerie cellulaire et tests d'immunofluorescence	50

2.14.	Analyses statistiques des données	50
3.	Chapitre 3. Résultats.....	51
3.1.	Effet de l'aspirine sur la production du monoxyde d'azote et du peroxyde d'hydrogène.....	51
3.2.	Effet de l'aspirine sur les activités d'iNOS et d'arginase	52
3.3.	Effet de l'aspirine sur la capacité phagocytaire et la destruction bactérienne	53
3.4.	Effet de l'aspirine sur le taux de calcium intracellulaire	55
3.5.	Effet de l'aspirine sur la teneur totale du cholestérol intracellulaire.....	55
3.6.	Effet de l'aspirine sur le taux du glucose intracellulaire	56
3.7.	Effet de l'aspirine sur la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires	57
3.8.	Effet de l'aspirine sur l'expression du CD16 et du CD40	60
4.	Chapitre 4. Discussion.....	62
4.1.	Effet de l'aspirine sur la production du monoxyde d'azote et du peroxyde d'hydrogène.....	62
4.2.	Effet de l'aspirine sur les activités d'iNOS et d'arginase	63
4.3.	Effet de l'aspirine sur la capacité phagocytaire et la destruction bactérienne	64
4.4.	Effet de l'aspirine sur le taux du calcium intracellulaire	64
4.5.	Effet de l'aspirine sur la teneur totale du cholestérol intracellulaire.....	65
4.6.	Effet de l'aspirine sur le taux du glucose intracellulaire.....	65
4.7.	Effet de l'aspirine sur la production des cytokines pro-inflammatoires et des cytokines régulatrices ou immunosuppressives	66
4.7.1.	Effet de l'aspirine sur la production d'IL-1 β	66
4.7.2.	Effet de l'aspirine sur la production d'IL-6.....	66
4.7.3.	Effet de l'aspirine sur la production d'IFN- γ	67
4.7.4.	Effet de l'aspirine sur la production du TNF- α	67
4.7.5.	Effet de l'aspirine sur la production d'IL-10	68
4.8	Effet de l'aspirine sur l'expression du CD16 et du CD40	68
5.	Chapitre 5. Conclusions et perspectives.....	70
6.	Chapitre 6. Bibliographie	72

Introduction

Introduction

L'infarctus du myocarde correspond à la nécrose des cellules du muscle cardiaque suite au rétrécissement des artères coronaires et le manque d'oxygénation au niveau du myocarde. Le mécanisme physiopathologique de l'infarctus du myocarde est l'athérosclérose (Gisterå and Hansson, 2017); une maladie auto-inflammatoire chronique de la paroi des artères qui irriguent le cœur (Matsuura et al., 2014a). Il est à noter que les cellules du système immunitaire inné jouent un rôle clé dans le processus pro-inflammatoire associé à la maladie, compte tenu de leur habilité d'auto-activation des cellules T par divers voies notamment le «*crosstalk* » cellule-cellule et la production de cytokines.

Il a été rapporté que l'expression du CD16 sur la surface des monocytes est augmentée pendant le 5^{ème} jour post-Infarctus (Tsujioka et al., 2009) et est nécessaire pour l'agrégation plaquettes-monocytes (Passacuale et al., 2011). De plus, la molécule CD16 est co-exprimée avec la molécule CD14 sur la surface des monocytes intermédiaires et non classiques et sont tous les deux impliqués dans la pathogénèse de l'infarctus du myocarde (Urbanski et al., 2017; Zeng et al., 2014).

Par ailleurs plusieurs médicaments, comme l'aspirine, ont un effet marqué pour établir des conditions anti-inflammatoires durant l'infarctus du myocarde (Nahrendorf et al., 2010). Son effet cardio-protecteur à faible dose est probablement dû non seulement à ses propriétés anti-inflammatoires, mais aussi à son effet anti-thrombotique (Cyrus et al., 2002; Morris et al., 2009; Undas et al., 2007). Il a été rapporté que sa capacité à réduire les états inflammatoires est principalement liée à son inhibition de la production des cytokines pro-inflammatoires ainsi que les molécules d'adhésion (Kopp and Ghosh, 1994).

A cet effet nous nous sommes assignés comme objectif d'évaluer l'effet *ex vivo* de l'aspirine sur les activités fonctionnelles globales des monocytes, ainsi que leur taux d'expression de CD16 pendant l'infarctus du myocarde.

Chapitre 1. Revue de la littérature

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1.	Infarctus du myocarde	3
1.2.	Monocytes	16
1.3.	Aspirine	35
1.4.	Problématique et objectifs	43

Chapitre 1. Revue de la littérature

1. Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1. Infarctus du myocarde

1.1.1. Généralités

L'infarctus du myocarde (IDM) correspond à une hypoxie myocardique suite au rétrécissement des artères coronaires qui alimentent le cœur en oxygène (Chadwick Jayaraj et al., 2019). Il s'agit le plus souvent d'une complication aiguë d'une maladie coronarienne préexistante liée à l'athérosclérose. En effet, il est la conséquence d'une thrombose occlusive totale ou partielle d'une artère coronaire qui survient après rupture d'une plaque d'athérome (**Figure 1.a**) (Crea and Liuzzo, 2013). Celle-ci contient une variété de leucocytes sanguins infiltrés dans la phase précoce de la maladie et sont principalement des phagocytes mononucléaires, des cellules spumeuses chargées en lipoprotéines de basse densité oxydées (LDL-ox), des cellules dendritiques, des lymphocytes T qui communiquent avec les divers types de cellules présents dans la paroi artérielle (**Figure 1.b**). Le recrutement des cellules inflammatoires et l'accumulation de lipides entraînent la formation d'un noyau riche en lipides. Suite à une érosion, ulcération, fissuration ou rupture de la plaque d'athérome, ces cellules produisent des médiateurs pro-inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène (ROS) amplifiant ainsi l'inflammation locale et provoquant des complications thrombotiques qui déclenche l'IDM (**Figure 1.c**) (Libby et al., 2011).

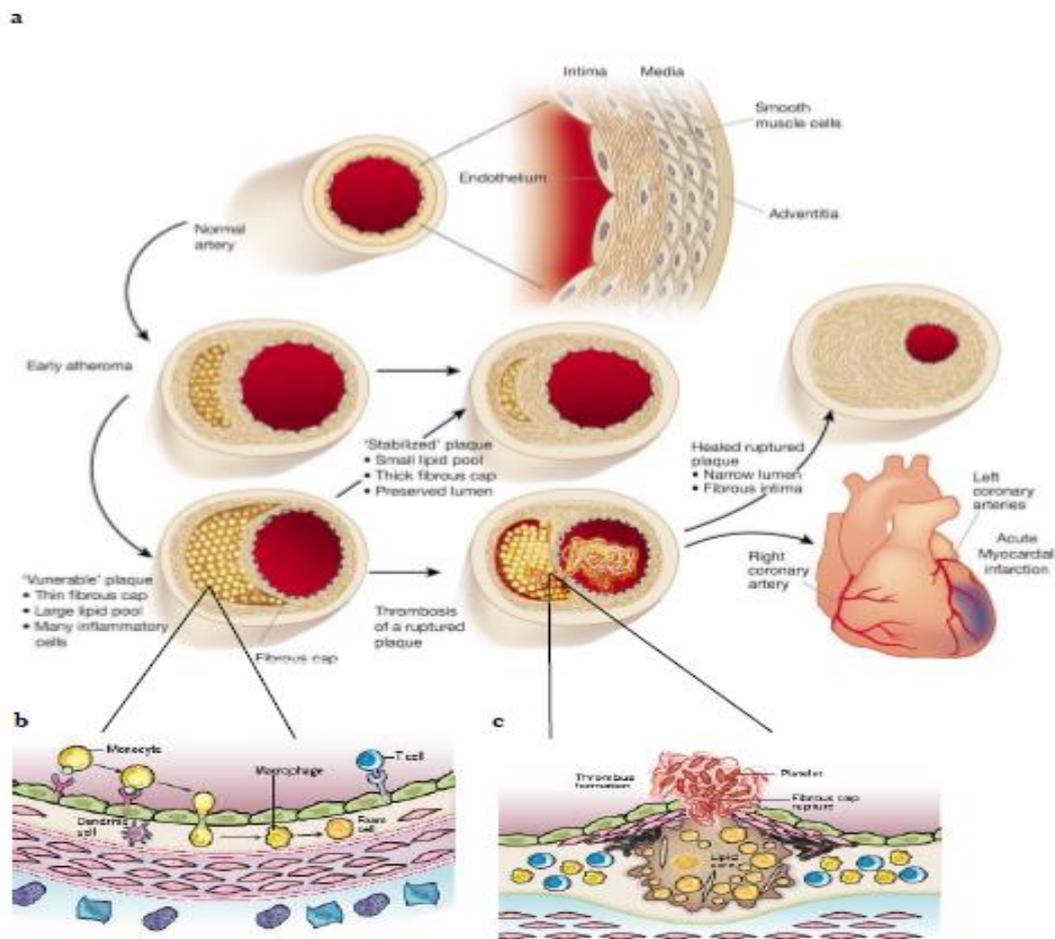


Figure 1. Infarctus du myocarde : de l'athérosclérose à la rupture de la plaque d'athérome (Libby, 2002; Libby et al., 2011). **a.** Cycle de vie de la plaque d'athérome : l'artère coronaire humaine saine a une structure trilaminaire typique (Intima, Media, Adventita). Dans la phase précoce de l'athérosclérose, le recrutement des cellules inflammatoire et l'accumulation des lipides entraînent la formation d'un noyau riche en lipides. Si les conditions inflammatoires prédominent et que les facteurs de risque tels que la dyslipidémie persiste, le noyau lipidique peut se développer et les protéinases sécrétées par les leucocytes activés peuvent dégrader la matrice extracellulaire tandis que les cytokines pro-inflammatoires telles que l'interféron- γ (IFN- γ) peuvent limiter la synthèse du nouveau collagène. Ces changements peuvent diminuer l'épaisseur de la chape fibreuse et la rendre vulnérable. Lorsque la plaque se rompt, une coagulation s'en suit par contact du sang avec le facteur tissulaire (FT). Les plaquettes activées par la thrombine générée à partir de la cascade de coagulation et par le contact avec le contenu du centre nécrotique provoquent la formation du thrombus. Un IDM peut se produire si l'occlusion de l'artère par le thrombus persiste (la zone bleue, en bas à droite). Par ailleurs, une thrombolyse endogène ou thérapeutique peut induire la résorption du thrombus. **b.** Composition cellulaire de la plaque d'athérome : elle contient des leucocytes principalement des macrophages (M ϕ s) issus des monocytes circulantes (MOs), ces M ϕ s se différencient en cellules spumeuses après absorption des particules lipidiques, elle contient aussi des cellules dendritiques (DC) et des lymphocytes T. **c.** Thrombose, complication ultime de l'athérosclérose.

1.1.2. Physiopathologie de l'infarctus du myocarde

La principale étiologie de l'IDM est l'athérosclérose; une maladie inflammatoire chronique avec une composante auto-immune (Jan et al., 2010; Matsuura et al., 2014b). Elle fait ainsi intervenir les cellules du système immunitaire inné (réponse inflammatoire) et adaptatif (réponse auto-immune) (Miteva et al., 2018).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1.2.1. Composante inflammatoire de l'athérosclérose

1.1.2.1.1. Oxydation et captation des lipoprotéines de basse densité

L'événement initiateur de l'athérosclérose est la dysfonction endothéliale (Davignon, 2004). L'augmentation de la perméabilité endothéliale favorise l'infiltration des lipoprotéines de basse densité (LDL) qui véhiculent le cholestérol. Celles-ci créent des liaisons entre leurs apolipoprotéines et les protéoglycanes de la matrice extracellulaire et se retrouvent piégées dans l'espace sous-endothélial (Linton et al., 2000). La diminution de la sécrétion des médiateurs vasodilatateurs par les cellules endothéliales comme l'oxyde nitrique (NO) entraîne une vasoconstriction, une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (VSMCs) et l'induction du stress oxydatif (Russo et al., 2002). Les LDL retenues sont soumises à l'oxydation du fait de la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou d'enzymes telles que les lipoxygénases ou la myéloperoxydase. Cette modification du LDL native lui fait perdre sa reconnaissance et son internalisation par les récepteurs des LDL (LDL-R ou récepteur de Brown/Goldstein) mais lui confère la capacité de se lier au récepteur scavenger (SR) des macrophages (Mφs) (SR-AI, SR-AII, Cluster de Différenciation (CD) 36, CD68) (Gao and Liu, 2017) (**Figure 2**).

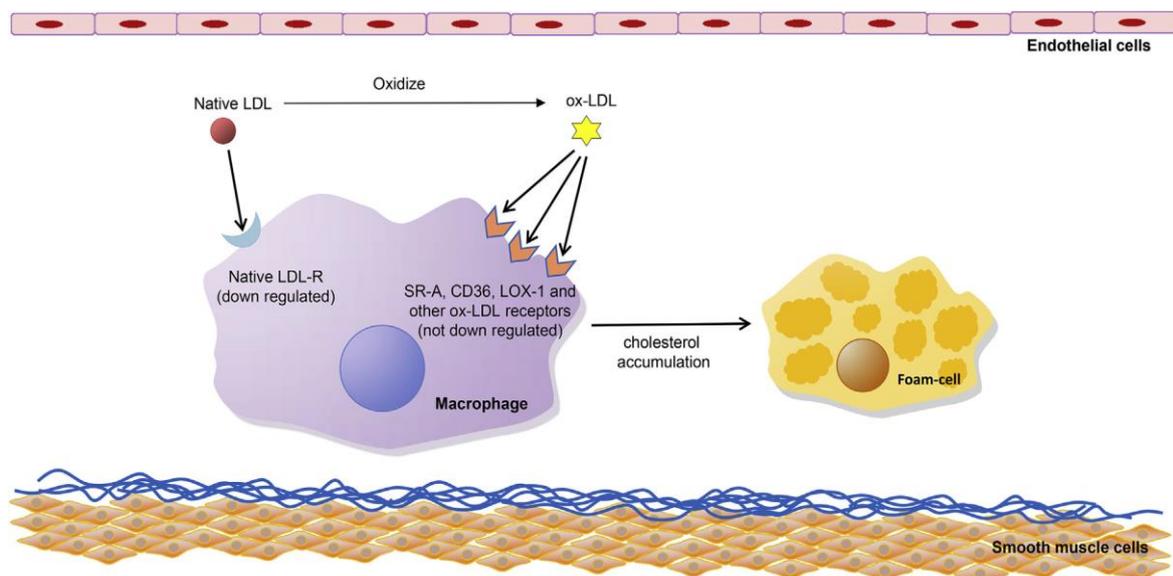


Figure 2. Mécanisme d'internalisation des LDL-ox par les macrophages (Gao and Liu, 2017). Les LDL natives peuvent difficilement induire la formation des cellules spumeuses en raison de la régulation négative des LDL-R. Les LDL-ox induisent une accumulation du cholestérol dans les Mφs grâce à une absorption rapide par les SR. LDL : lipoprotéine de basse densité, LDL-ox : lipoprotéine de basse densité oxydée, LDL-R : récepteur des lipoprotéines de basse densité, SR-A : Récepteur scavenger A, CD36 : cluster de différenciation 36, LOX-1 : récepteur de type lectine des lipoprotéines de basse densité oxydées.

1.1.2.1.2. Recrutement des monocytes et différenciation en macrophages

Les LDL-ox ont un effet pro-inflammatoire et favorisent l'activation des cellules endothéliales, les monocytes (MOs) et les Mφs. Cette activation se traduit par l'expression des molécules d'adhésion telles que *vascular adhesion molecule-1* (VCAM-1), *intercellular*

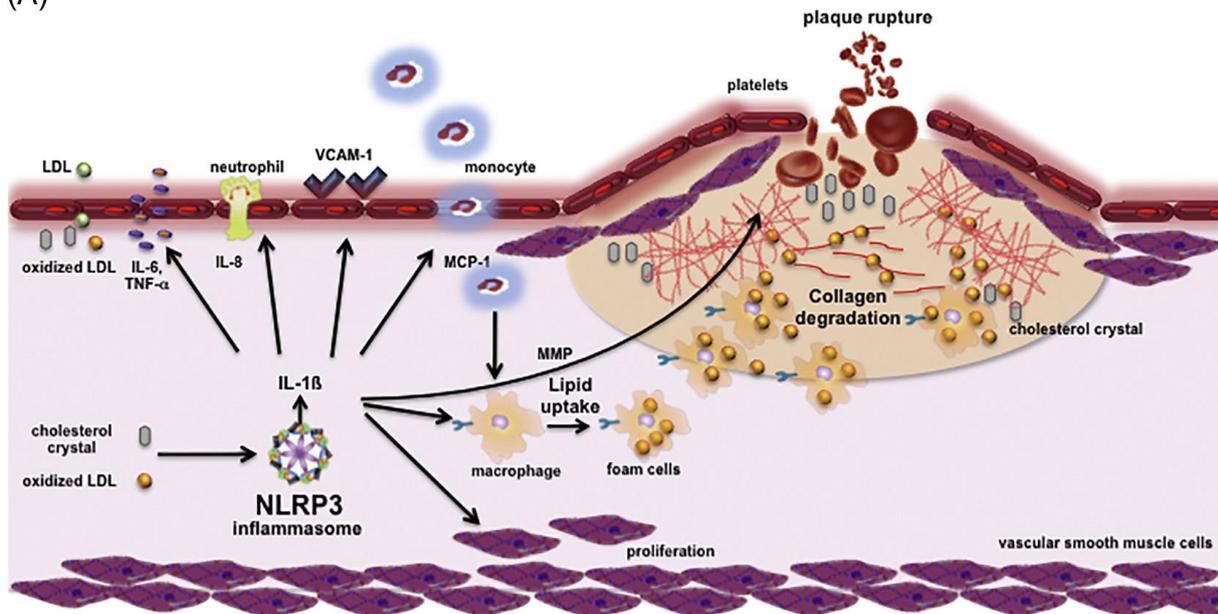
Chapitre 1. Revue de la littérature

adhesion molecule-1 (ICAM-1) et la sélectine P et par la production de chimiokines telles que la protéine-1 chimiotactique des MOs (MCP-1) (Hansson, 2014). Ainsi les MOs circulants s'immobilisent à la surface de l'endothélium, le traversent, puis se différencient en Mφs M1 (Tedgui and Mallat, 2006) et développent un métabolisme glycolitique qui favorise la signalisation pro-inflammatoire ce qui alimente et maintient le processus inflammatoire et conduit à la progression de l'athérosclérose (Groh et al., 2018). La différenciation des Mφs s'associe à une augmentation de l'expression des SRs à leur surface, ces récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR) comprennent SR-A, CD36 et LOX-1 et médient l'internalisation d'une large gamme de molécules notamment les LDL-ox. Ces Mφs engorgés de lipides se transforment en cellules spumeuses (Santiago-Fernández et al., 2019).

L'accumulation du cholestérol dans les Mφs provoque la formation de mirco-cristaux intracellulaires qui activent l'inflammasome NLRP3, ce dernier provoque le clivage du précurseur de l'interleukine (IL)-1 β en sa forme biologique active (Duewell et al., 2010a). L'inflammasome NLRP3 et son produit IL-1 β contribuent à l'athérogenèse à différents stades, IL-1 β induit l'expression de :

- ✓ Cytokines pro-inflammatoires notamment l'IL-6 et le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α (Loppnow and Libby, 1990; Ridker and Luscher, 2014).
- ✓ IL-8, qui attire les neutrophiles.
- ✓ VCAM-1 sur les cellules endothéliales, facilitant l'adhésion et l'infiltration ultérieure des MOs circulants.
- ✓ MCP-1 attirant les MOs circulants (Chen et al., 2014). Outre les effets pro-inflammatoires, l'IL-1 β induit la prolifération et la migration des VSMCs (Chistiakov et al., 2015), augmente la sensibilité des Mφs au dépôt lipidique, stimule la formation des cellules spumeuses (Li et al., 2014b) et augmente l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Libby, 2017; Wang et al., 2011) conduisant à la dégradation du collagène et à l'instabilité de la plaque (**Figure 3**).

(A)



(B)

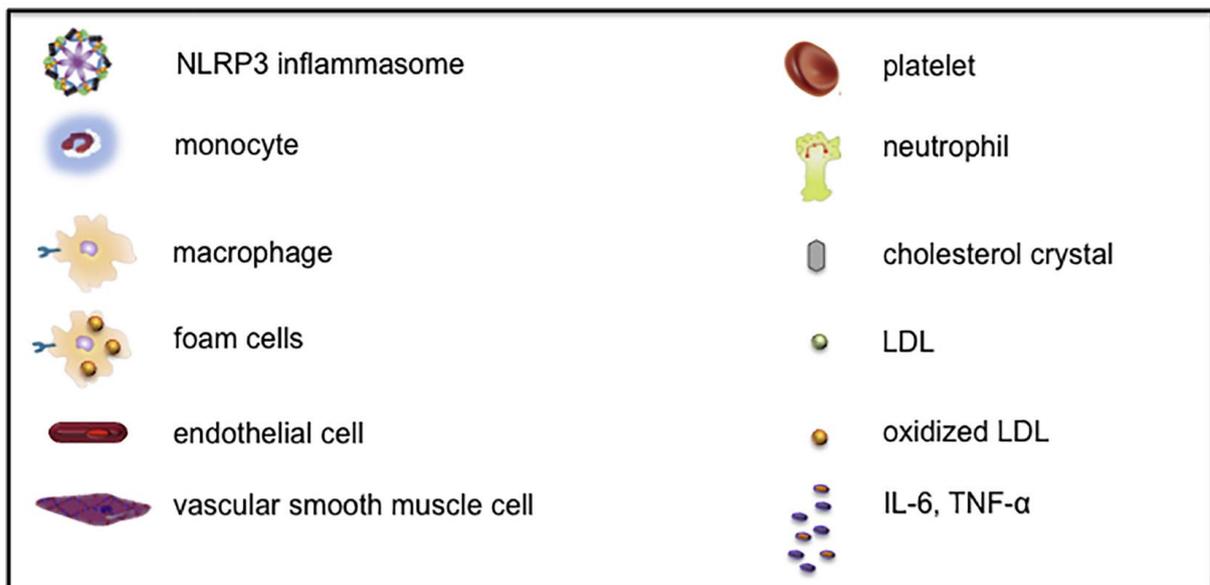


Figure 3. Rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'athérosclérose (Miteva et al., 2018). Les DAMPs comprenant les cristaux de cholestérol et les LDL-ox induisent une activation de NLRP3, ce qui conduit à la maturation et la libération d'IL-1 β . IL-1 β stimule la réaction inflammatoire en augmentant l'expression d'IL-6, TNF- α , IL-8, VCAM-1 et MCP-1, facilitant ainsi l'attraction et l'infiltration des neutrophiles et des MOs. De plus, IL-1 β induit la prolifération et la migration des VSMCs, facilite la formation des cellules spumeuses et stimule l'expression des MMPs et la dégradation ultérieure du collagène.

1.1.2.2. Composante auto-immune et système immunitaire adaptatif

Après une réponse immunitaire innée médiée par l'activation des MOs et des M ϕ s, une réponse immunitaire adaptative et auto-immune caractérisée par la présence des lymphocytes B et T est déclenchée (Wolf and Ley, 2019).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1.2.2.1. Lymphocytes B

Deux types de cellules B largement impliqués dans l'athérosclérose sont répertoriés (Sage et al., 2019): les cellules B1 ont pour origine principale le foie fœtal alors que les cellules B2 se différencient à partir de précurseurs de la moelle osseuse, cependant les deux atteignent la maturité hors de la moelle osseuse.

1.1.2.2.1.1. Lymphocytes B1

Les anticorps IgM naturels dérivés des cellules B1 peuvent se lier aux néo-épitopes des LDL-ox en reconnaissant le produit final du peptide ApoB100 modifié par glycation (Engelbertsen et al., 2015) et limitent ainsi leur absorption par les RS des Mφs et par conséquent limitent la formation des cellules spumeuses et l'activation endothéliale ce qui confère aux cellules B1 un effet athéro-protecteur (Sage et al., 2019). Outre leur production d'anticorps naturels, les lymphocytes B1 produisent l'IL-10. Cette cytokine diminue l'athérosclérose en inhibant la présentation antigénique et la production de médiateurs inflammatoires (Kyaw et al., 2012).

1.1.2.2.1.2. Lymphocytes B2

Les cellules B2 peuvent favoriser l'athérosclérose par la sécrétion des cytokines inflammatoires qui déclenchent ensuite l'activation des cellules Th1 et des MOs/Mφs ou par la sécrétion d'auto-anticorps IgG qui forment des complexes immuns avec les LDL-ox et promeuvent la réponse inflammatoire des Mφs. Les IgE issus après commutation de classe possèdent de fortes propriétés pro-athérogéniques en stimulant les Mφs et les mastocytes au niveau de plaque (Sage et al., 2019; Tsiantoulas et al., 2014). La déplétion des cellules B à l'aide d'anticorps anti-CD20 ciblant les cellules B2 conventionnelles s'est révélée protectrice dans l'athérosclérose expérimentale. Ces observations indiquent que les lymphocytes B2 aggravent la maladie par voie humorale autant que cellulaire (Kyaw et al., 2010).

1.1.2.2.2. Lymphocytes T

1.1.2.2.2.1. Lymphocytes Th1

La présentation des antigènes du soi modifié (LDL-ox) dans l'environnement inflammatoire de la plaque d'athérosclérose provoque la génération et l'activation des lymphocytes Th1 et la sécrétion d'interféron (IFN)-γ favorisant ainsi l'athérosclérose et amplifiant l'inflammation (Mallat et al., 2009). L'IFN-γ contribue à ce processus en favorisant l'infiltration des MOs, l'activation des Mφs, la formation de cellules spumeuses, la formation de lésions, l'accumulation de lipides et la déstabilisation de la plaque par altération de la fonction endothéliale, réduction de la teneur en collagène et amplification de l'infiltration des cellules inflammatoires (Tedgui and Mallat, 2006).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.1.2.2.2. Lymphocytes Th2

Les lymphocytes Th2 représentent une faible population dans les plaques humaines d'athérosclérose, leur rôle dans cette maladie reste controversé (Engelbertsen et al., 2013). La cytokine IL-4 influence considérablement la nature de la réponse immunitaire du fait qu'elle peut déclencher le développement des cellules Th2 sécrétrices d'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 et peut inhiber le développement des réponses Th1 par l'inhibition de l'IFN- γ , ce qui freine les effets pro-athérogènes des Th1 et confère une athéroprotection. Cependant, des études ultérieures sur des souris déficientes en IL-4 n'ont montré aucun effet sur le développement de l'athérosclérose induite par l'hypercholestérolémie (King et al., 2007). D'autres cytokines liées à la réponse Th2 telles que l'IL-5 et IL-33 présentent des propriétés anti-athérogènes par induction des cellules B1 et des M ϕ s anti-inflammatoires M2 respectivement (Cardilo- Reis et al., 2012; Silveira et al., 2015; Witztum et al., 2008).

1.1.2.2.3. Lymphocytes Treg

Les cellules Treg sont connues pour être des cellules immuno-régulatrices, leur propriété anti-athérogène a été démontrée avec la déplétion des cellules Treg qui accélère l'athérosclérose et leur expansion qui la fait réduire (Sasaki et al., 2009; Winkels et al., 2017). Ces cellules exercent leur effet athéro-protecteur par la sécrétion de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10 (Pinderski Oslund et al., 1999) et le facteur de croissance transformant (TGF- β) (Robertson et al., 2003). La déficience en IL-10 chez des souris est associée à une augmentation de la taille des lésions d'athérosclérose et le transfert murin de cette cytokine induit leur réduction (Mallat et al., 1999), de plus l'IL-10 est moins sécrétée chez les patients avec une plaque coronaire vulnérable (George et al., 2012). Par ailleurs, la neutralisation systémique et la déficience génétique du TGF- β accélère l'athérosclérose expérimentale et s'accompagne d'une infiltration accrue des M ϕ s M1 et des lymphocytes T et d'une réduction de la teneur en collagène rendant la plaque d'athérosclérose vulnérable (Grainger et al., 2000; Lutgens et al., 2002; Mallat et al., 2001).

1.1.2.3. Déstabilisation et rupture de la plaque d'athérosclérose : Infarctus du myocarde

Les VSMCs en collaboration avec les cellules endothéliales et les MOs activés sécrètent des MMPs en réponse aux divers signaux oxydatifs, inflammatoires et auto-immuns (**Figure 4A**) (Watanabe and Ikeda, 2004). Les MMPs, en équilibre avec leurs inhibiteurs tissulaires endogènes (TIMPs), modulent de nombreuses fonctions des cellules vasculaires, y compris l'activation, la prolifération, la migration et l'apoptose, ainsi que la formation des nouveaux vaisseaux et le remodelage de la structure vasculaire. En cas de déséquilibre, l'excès de production des MMPs provoque la déstabilisation et la rupture de la plaque mettant les constituants sous-endothéliaux (collagène, fibronectine, vitronectine...) au contact des

Chapitre 1. Revue de la littérature

plaquettes circulantes, ce qui met en jeu des mécanismes d'adhésion puis d'agrégation plaquettaire qui aboutissent à la formation du thrombus occlusif (**Figure 4B**) (Johnson, 2017). Ce thrombus pourrait conduire à l'occlusion brutale de l'artère coronaire perturbant l'apport du muscle cardiaque en oxygène et provoquant une ischémie qui pourrait évoluer en nécrose myocardique irréversible, il s'agit de l'IDM (Munger and Hawkins, 2004).

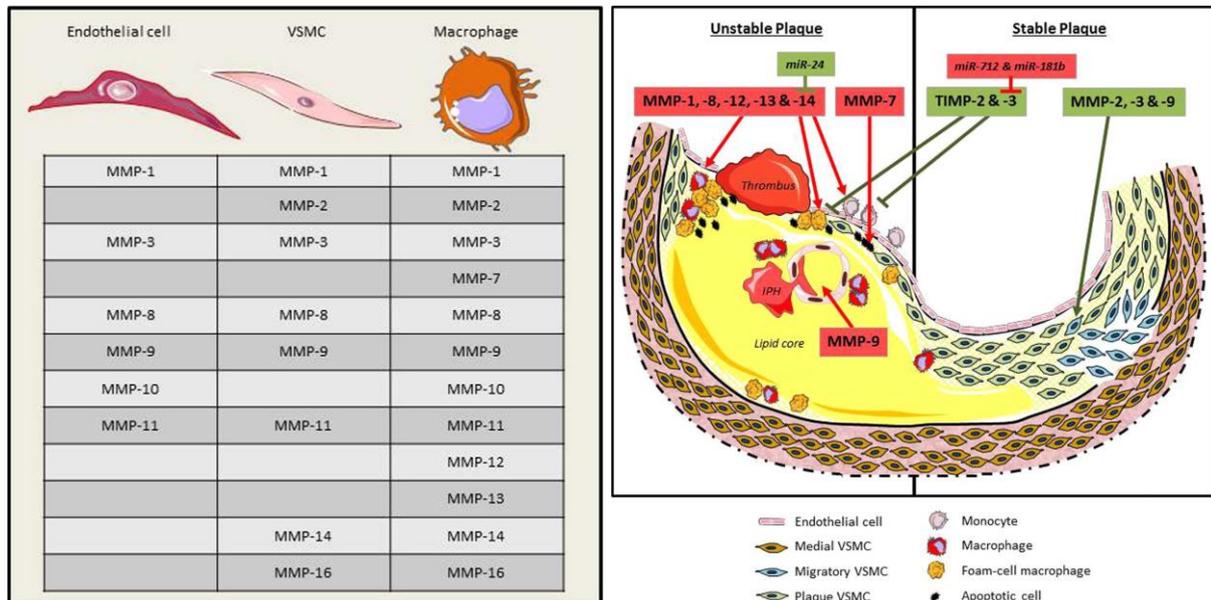


Figure 4 : (A) Source cellulaire des MMPs dans l'athérosclérose humaine (B) Rôles opposés des MMPs dans la progression et la stabilité de la plaque d'athérosclérose (Johnson, 2017). Modèle hypothétique des rôles potentiels bénéfiques et délétères des MMPs et des TIMPs pendant la progression et l'instabilité de la plaque d'athérosclérose. Les métalloprotéinases matricielles (MMP)-2, -3 et 9 facilitent la migration des cellules des muscles lisses vasculaires (VSMC) vers la plaque d'athérosclérose en développement où elles participent à la formation et à l'entretien de la coiffe fibreuse, favorisant ainsi la stabilité de la plaque. En opposition, MMP-1, MMP-8, MMP-12, MMP-13 et MMP-14 dégradent les protéines de la matrice extracellulaire, favorisent le recrutement des monocytes et des macrophages, et leur susceptibilité à l'apoptose autant que cellules spumeuses participant ainsi dans la formation du noyau lipidique, la thrombogénicité de la plaque et l'amincissement de la chape fibreuse. De même, le MMP-7 peut induire une apoptose des VSMCs et donc compromettre la stabilité de la plaque, tandis qu'un excès de MMP-9 dérivé des macrophages peut déclencher une hémorragie intra-plaque (IPH), probablement en déstabilisant la néovascularisation et contribuer par la suite à l'expansion et à l'instabilité de la plaque. Suite à l'expression de ces MMP délétères, la stabilité de la plaque est compromise et vulnérable à la rupture et à la formation de thrombus. Plus récemment, des microARN (miR) ont été identifiés, ils peuvent réguler l'expression et l'activité des MMPs et TIMPs en exerçant des effets directs sur la progression de la plaque d'athérosclérose.

1.1.3. Réponse immuno-inflammatoire lors d'un infarctus du myocarde

1.1.3.1. Effecteurs cellulaires de la réponse immunitaire post-infarctus

Quelques heures après l'IDM, les dommages tissulaires causés par l'ischémie et les molécules qui sont libérées par les cellules nécrotiques déclenchent rapidement une réponse inflammatoire où un recrutement dynamique de plusieurs centaines de milliers de cellules myéloïdes telles que les neutrophiles, les MOs/Mφs, les DC et les lymphocytes se fait chaque jour dans le myocarde infarcté (Boufenzler et al., 2015; Nagai et al., 2014; Nahrendorf and

Chapitre 1. Revue de la littérature

Swirski, 2013; Nahrendorf et al., 2007). L'infiltration des neutrophiles en réponse aux motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) et aux cytokines pro-inflammatoires atteint un pic à J1 post-IDM. Les MOs circulants provenant de la moelle osseuse mais aussi de la rate avec les Mφs dominant par la suite l'infiltration tissulaire où ils contribuent fortement à la phase précoce pro-inflammatoire de l'IDM mais aussi à la phase réparatrice en assurant la phagocytose, la protéolyse, l'angiogenèse, le remodelage et la cicatrisation (**Figure 5**) (Zlatanova et al., 2016).

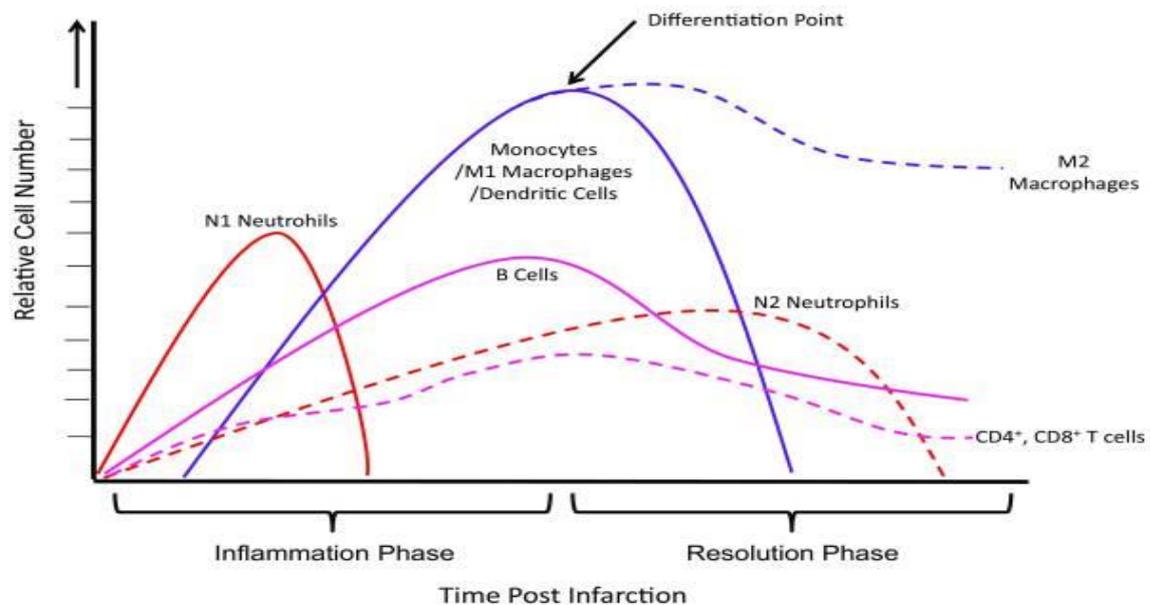


Figure 5. Dynamique temporelle des cellules immunitaires post-IDM (Jung et al., 2019).

1.1.3.1.1. Monocytes/Macrophages

1.1.3.1.1.1. Monocytes

Après un IDM, une expansion des MOs circulants (Nahrendorf et al., 2007; Swirski et al., 2009) se produit avec comme source majeure la moelle osseuse et la rate (Ismahil et al., 2014; Leuschner et al., 2012; Swirski et al., 2009). Leur recrutement dans le myocarde infarci est biphasique :

- a) 1^{ère} phase (1-7 jours): Phase inflammatoire caractérisée :
 - ❖ Au 3^{ème} jour par un pic des MOs classiques CD16⁻ qui assurent la phagocytose des débris nécrotiques.
 - ❖ Du 4^{ème} au 7^{ème} jour par l'accumulation des MOs intermédiaires CD16⁺ marqué par un pic au 5^{ème} jour (Tsujioka et al., 2009). Les MOs intermédiaires sont connus pour avoir des activités pro-inflammatoires plus larges que celles des MOs non classique (Gerszten and Tager, 2012), ils sécrètent plus de ROS, TNF- α et IL-1 β (Zawada et al., 2011). Un afflux de ces MOs intermédiaires dans la zone endommagée est considéré comme essentiel pour le processus de cicatrisation très précoce, mais leur persistance

Chapitre 1. Revue de la littérature

au-delà de la phase de réparation tissulaire initiale pourrait prolonger les effets indésirables liés à l'inflammation à plus long terme dans les zones myocardiques éloignées saines. Il est ainsi admis que les MOs intermédiaires soient de mauvais pronostic pour les patients présentant un IDM (Elchinova et al., 2018).

- b) 2^{ème} phase : phase de prolifération : caractérisée par la présence de populations comparables de CD16⁻ et CD16⁺.

1.1.3.1.1.2. Macrophages

Après un IDM, les Mφs se développent au site de l'infarctus et changent considérablement leur phénotype dans le cœur murin, comme les MOs ils présentent une hétérogénéité remarquable et une plasticité fonctionnelle importante (ter Horst et al., 2015). La phase pro-inflammatoire post IDM est initiée et élaborée par les Mφs M1 où ils assurent la phagocytose des débris nécrotiques dans la zone infarctée, ils sécrètent aussi de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires telles que TFN- α , IL-1 et IL-6, des ROS, du NO par l'activation de la NO synthase inducible (iNOS) et des (MMPs)-1, -2, -7, -9, et 12. Ensemble ils forment un microenvironnement pro-inflammatoire (O'Rourke et al., 2019; Peet et al., 2019). La phase réparatrice est médiée par les Mφs M2 et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et des facteurs de croissance comme le TGF- β . Ces médiateurs stimulent la production médiée par les fibroblastes des constituants de la matrice extracellulaire, la prolifération cellulaire et l'angiogenèse, favorisant le remodelage et la réparation tissulaire (O'Rourke et al., 2019; Peet et al., 2019).

1.1.3.2. Effecteurs moléculaires de la réponse immunitaire post-infarctus

Quelques heures après l'IDM, l'ischémie myocardique provoque la mort des différents constituants du myocarde (cardiomyocytes, cellules endothéliales, fibroblastes...etc) et déclenche rapidement une réponse inflammatoire grâce à l'action concertée de plusieurs processus, y compris l'activation de la cascade du complément (Timmers et al., 2012), la production des ROS (Muntean et al., 2016) et les DAMPs qui servent de ligands pour les récepteurs de l'immunité innée définis comme les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRRs) incluant les récepteurs de type Toll (TLRs), les récepteurs lectines de type C (CLRs) et les récepteurs de type nucleotid-binding oligomerization domain (NOD)-protein 3 (NLRP3) (van Hout et al., 2016). Ceux-ci entraînent la libération d'une variété de médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines et les chimiokines qui induisent le recrutement de cellules inflammatoires dans la zone infarctée et augmentent la réponse pro-inflammatoire post-IDM (**Figure 6**) (Ong et al., 2018).

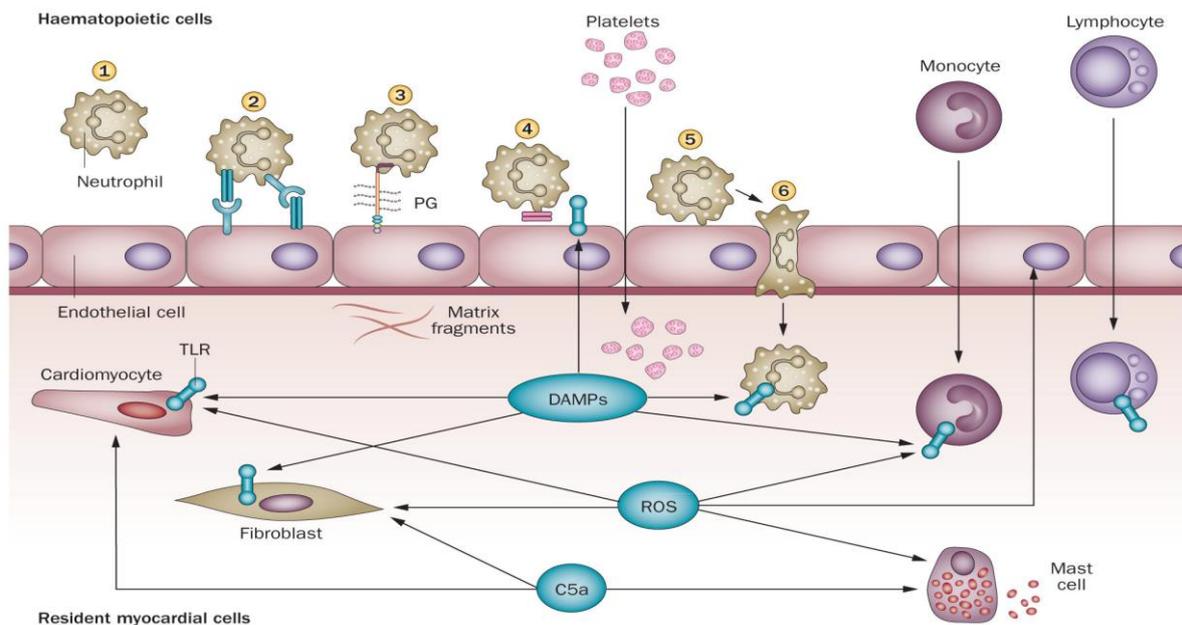


Figure 6. Réponse inflammatoire post-infarctus (Frangogiannis, 2014a). Dans le myocarde infarcté, les cardiomyocytes mourants et la matrice endommagée libèrent des DAMPs qui activent la signalisation TLR dans les cellules myocardiques déclenchant ainsi une réaction inflammatoire. L'activation de la cascade du complément et la génération des ROS aident également à initier cette réaction inflammatoire. Les cardiomyocytes mourants et ceux encore en survie, les cellules endothéliales, les fibroblastes cardiaques et les mastocytes résidents, les monocytes, les plaquettes et les neutrophiles nouvellement recrutés participent à la réponse inflammatoire post-infarctus. Cependant, leurs contributions relatives restent floues. Les leucocytes sont recrutés en plusieurs étapes *via* une cascade d'adhésion : (1) Capture des leucocytes circulants par les cellules endothéliales activées, (2) Roulement médié par des interactions impliquant les sélectines, (3) Les leucocytes roulants sont activés par des chimiokines liées au PG sur la surface endothéliale, (4) Les leucocytes activés expriment les intégrines et adhèrent aux cellules endothéliales, (5) Renforcement de l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales, (6) Transmigration des cellules dans la zone infarctée. Abréviations : C5a : facteur de complément 5a, DAMPs : motifs moléculaires associés aux dommages, PG : protéoglycane, ROS : espèces réactives de l'oxygène, TLR : récepteurs de type Toll.

1.1.3.2.1. Les chimiokines

Les chimiokines jouent un rôle critique dans la locomotion et le trafic des leucocytes dans la réponse inflammatoire post-ischémie (Frangogiannis, 2007). L'expression des chimiokines CXC (pour deux cystéines séparées par un acide aminé) telles que l'IL-8 est rapidement augmentée dans la zone infarctée et permet le recrutement massif des neutrophiles (Shetelig et al., 2018). S'ensuit l'augmentation de l'expression de la chimiokine CC (pour deux cystéines adjacentes) pour exemple MCP-1 qui permet l'attraction des MOs avec des activités phagocytaires pour éliminer les débris de la matrice extracellulaire et les cellules nécrotiques (Dewald et al., 2005).

Les chimiokines pourraient également recruter des cellules mononucléaires anti-inflammatoires et réparatrices dans le myocarde lésé. Par ailleurs, la signalisation de la chimiokine CC de type 5 est une voie moléculaire importante dans le contrôle de la réponse inflammatoire post-infarctus par le recrutement des lymphocytes Tregs prévenant la

Chapitre 1. Revue de la littérature

dégradation excessive de la matrice et atténuer les remodelages indésirables (Dobaczewski et al., 2010).

1.1.3.2.2. Les cytokines

Après un IDM, un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées par les cellules cardiaques résidentes et les cellules inflammatoires circulantes. Elles jouent un rôle essentiel dans l'amplification de la réponse pro-inflammatoire en contribuant au recrutement des cellules inflammatoires dans la zone IDM (Neri et al., 2015a).

1.1.3.2.2.1. IL-1 β

L'IL-1 β est la principale cytokine médiatrice de la réponse pro-inflammatoire post-IDM. L'engagement du récepteur 1 de l'IL-1 β (IL-1R1) conduit à la formation d'un complexe protéique; cette plate-forme de signalisation recrute séquentiellement la protéine de différenciation myéloïde 88 (MYD88), kinase-1 associée à IL-1R, et -4 initiant la cascade qui mène finalement à l'activation et à l'induction de facteur nucléaire kappa-chaîne légère-activateur des cellules B activées (NF- κ B) d'une large gamme de cytokines pro-inflammatoires, chimiokines et molécules d'adhésion (O'Neill, 2008). Elle est ainsi impliquée dans le recrutement et l'activation des leucocytes notamment les MOs (Bujak et al., 2008; Saxena et al., 2013), tout en retardant l'activation des myofibroblastes (Saxena et al., 2013). Le rôle de l'IL-1 β dans la pathogénèse de l'IDM reste controversé suggérant un effet pléiotropique (Frangogiannis, 2015). En effet, dans un modèle expérimental d'IDM, la neutralisation de l'IL-1 β par des anticorps spécifiques a fait augmenter significativement l'incidence de la rupture de la plaque (Hwang et al., 2001) à l'inverse, la déficience de la signalisation de l'IL-1 (Bujak et al., 2008) ou le traitement avec des antagonistes d'IL-1 atténuent les remodelages tissulaires défavorables (Abbate et al., 2008; Murtuza et al., 2004; Suzuki et al., 2001).

1.1.3.2.2.2. IL-6

La sécrétion de l'IL-6 est augmentée dans le myocarde infarci, elle active et dirige le trafic des cellules immunitaires et peut moduler la signalisation de la réponse inflammatoire et réparatrice via la cascade Janus kinase (JAK)/Transducteur du signal et activateur de transcription (STAT) (Fischer and Hilfiker-Kleiner, 2009). La signalisation de l'IL-6 à court terme peut protéger et préserver le tissu cardiaque en réponse à des dommages aigus alors qu'une signalisation à long terme ou une surproduction de protéine récepteur de l'IL-6 (IL-6R) joue un rôle causal dans l'IDM (Fontes et al., 2015). Dans l'IDM expérimental, la déficience en IL-6 n'a pas affecté la fonction cardiaque et le remodelage tissulaire (Fuchs et al., 2003), d'autres cytokines de la famille de l'IL-6 pourraient compenser cette déficience en activant la signalisation JAK/STAT et en maintenant la phosphorylation de STAT3. Contrairement à ces résultats, le traitement avec un anticorps anti-récepteur de l'IL-6 a atténué le remodelage

Chapitre 1. Revue de la littérature

indésirable dans un modèle murin d'IDM (Kobara et al., 2010). Dans un autre IDM expérimental, une suppression altérée de la signalisation du récepteur IL-6/STAT3 a été associée à une inflammation prolongée augmentant l'incidence de la rupture cardiaque (Hilfiker-Kleiner et al., 2010). Malgré ces résultats expérimentaux très mitigés, Des études cliniques ont été menées ciblant l'IL-6 dans un contexte clinique thérapeutique.

1.1.3.2.2.3. TNF- α

En tant que médiateur hautement pléiotropique, le TNF- α est capable d'exercer divers effets sur tous les types de cellules impliqués dans les lésions et la réparation tissulaire dans la zone IM. Il contribue ainsi à la réponse inflammatoire locale en induisant la synthèse des chimiokines et des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et les leucocytes et favorise aussi la dégradation du collagène de la matrice extracellulaire par une activité accrue des métalloprotéinases (Maekawa et al., 2002). Le TNF- α peut également protéger les cardiomyocytes de l'apoptose (Kurrelmeyer et al., 2000), de plus des effets divergents transduits par les récepteurs TNF 1 et 2 pourraient réguler le remodelage du cœur infarci (Hamid et al., 2009). L'échec des stratégies anti-TNF chez des patients atteints d'insuffisance cardiaque chronique pourrait refléter les actions pléiotropiques de la cytokine ce qui a découragé la conception d'approches thérapeutiques ciblant cette voie pendant l'IDM (Mann et al., 2004).

1.1.3.2.2.4. IL-10

Considérée comme une importante cytokine anti-inflammatoire et immunosuppressive, l'IL-10 serait un puissant désactivateur des MOs et supprimeur de divers médiateurs pro-inflammatoires et pourrait par conséquent avoir un rôle protecteur après une ischémie myocardique (Frangogiannis et al., 2000; Yao et al., 2008). Dans un modèle expérimental d'IDM, les souris déficientes en IL-10 présentaient une réponse inflammatoire étendue caractérisée par un recrutement massif des neutrophiles, des taux plasmatiques élevés de TNF- α et une expression tissulaire élevée d'ICAM-1 (Yang et al., 2000). L'IL-10 joue aussi un rôle important dans la formation de la matrice extracellulaire en modulant l'expression des métalloprotéinases et de leurs inhibiteurs probablement via l'activation du transducteur du signal et activateur de transcription 3 (STAT3) et la suppression de p38 MAP kinase (Krishnamurthy et al., 2009), elle peut également induire la polarisation des M ϕ s cardiaques vers le phénotype M2 essentiels à un microenvironnement favorable à la réparation tissulaire (Jung et al., 2017).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.2. Monocytes

1.2.1. Définition

Les MOs humains ont été définis à l'origine par leur morphologie distinctive au début du siècle précédent par Paul Ehrlich et Ilya Metchnikoff (Guilliams et al., 2018). Ils représentent un des membres du système des phagocytes mononucléaires (MPS), qu'ils partagent avec les Mφs et les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) (Guilliams et al., 2014).

Chez l'homme, les MOs représentent environ 10% des leucocytes mononucléés circulants. Ils sont facilement accessibles et donc largement étudiés, soit *ex vivo* après stimulation, soit après une maturation en Mφs en présence de macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Guilliams et al., 2013).

Les MOs représentent également des cellules accessoires et forment un pont reliant l'inflammation et la défense innée contre les micro-organismes aux réponses immunitaires adaptatives. Dans des conditions pathologiques, les MOs acquièrent des fonctions effectrices inflammatoires mais peuvent également développer des propriétés régulatrices essentielles à l'homéostasie et la réparation tissulaire (Jakubzick et al., 2017).

1.2.2. Ontogénie et destins cellulaires

1.2.2.1. Origine des monocytes fœtaux et post-nataux

Chez la souris à partir du jour embryonnaire (E) 8,5, les MOs apparaissent initialement dans le foie fœtal à partir de progéniteurs érythromyéloïdes (EMPs) tardifs émergeant du sac vitellin. Ensuite à E10,5, les cellules souches hématopoïétiques immatures (CSHs) qui proviennent de l'aorte dorsale embryonnaire au niveau de la région aorte-gonade-mésonephros (AGM) transitent par différents organes hématopoïétiques. En effet, elles colonisent et établissent une hématopoïèse définitive dans le foie fœtal où le système immunitaire sera majoritairement développé, puis ensemencent la moelle osseuse mais ne sont pleinement fonctionnelles que plusieurs jours après la naissance, de sorte que les CSHs du foie et de la rate continuent à fournir des MOs pendant la période périnatale jusqu'à l'établissement de CSHs de type adulte (Hoeffel and Ginhoux, 2018).

Pendant la période post-natale, Les MOs sont produits à partir des CSHs *via* des progéniteurs qui sont dotés d'un potentiel de lignage progressivement restreint qui finit par s'engager dans la production des MOs. En effet, les CSHs se différencient d'abord en deux grands progéniteurs communs : un lymphoïde et l'autre myéloïde (CMP) capable de produire les MOs, les neutrophiles, les DC, les érythrocytes et les mégacaryocytes (Akashi et al., 2000; Manz et al., 2002). Les progéniteurs comme les progéniteurs granulocyte-MO (GMP) peuvent produire des MOs et des neutrophiles alors que les progéniteurs MO-DC (MDP) produisent des MOs ainsi que des DC conventionnels et plasmacytoïdes (cDC et pDC) (Akashi et al., 2000; Auffray et al., 2009a; Fogg, 2006; Yáñez et al., 2017). Ces derniers génèrent par la suite

Chapitre 1. Revue de la littérature

d'autres beaucoup plus restreints, s'ensuit dès lors leur différenciation en précurseurs pro-MOs puis en MOs prêts à quitter la moelle osseuse pour rejoindre la circulation sanguine (Wolf et al., 2019). Chez l'adulte, la rate contient également un réservoir de MOs qui peuvent être rapidement recrutés en réponse à une blessure ou une inflammation (Swirski et al., 2009).

1.2.2.1.1. Régulation extrinsèque

La différenciation des MOs sanguins nécessite l'action de deux grands types de facteurs, les uns font partie de la famille de facteur stimulant les colonies (CSF) capable d'engendrer des colonies de cellules hématopoïétiques et d'autres sont dits synergiques et apportent un effet indirect (Bidri and Arock, 1996).

1.2.2.1.1.1. Facteurs stimulant les colonies

Parmi le plus important de ces facteurs de croissance est le Facteur-1 stimulant les colonies (Csf-1) également connu sous le nom de facteur stimulant les colonies de Mφs (M-CSF). Chez l'homme, le M-CSF seul n'a pratiquement aucune activité CSF ; pour être stimulant, de faible concentration de GM-CSF semblerait être nécessaire. Il agit plus comme un facteur de survie ou d'activation des MOs et des Mφs que comme un facteur de croissance (Auffray et al., 2009b). D'autres facteurs comme le facteur stimulant les colonies de granulocytes/Mφs (GM-CSF) ou l'IL-3 sont aussi indispensables pour le développement des MOs. L'action du GM-CSF est extrêmement proche à celle d'IL-3, probablement due à leur chaîne de transduction β qui est commune (Nicola and Metcalf, 1991). Ils agissent aussi bien sur la plupart des progéniteurs, que sur les cellules matures des lignées granulomonocytaires leur conférant ainsi une action très polymorphe (Bidri and Arock, 1996).

1.2.2.1.1.2. Facteurs synergiques

Pendant la monocytopoïèse, l'IL-1 agit plus précocement que l'IL-3. En revanche, son action reste très brève et a besoin d'être relayée à un autre facteur pour donner lieu à la formation de colonies. L'IL-1 induit aussi la synthèse de GM-CSF par les cellules stromales comme les cellules endothéliales et les lymphocytes T. De plus, l'IL-6 a également une action dans les temps précoces du développement des MOs, en étant synergique avec l'IL-3 et le GM-CSF (Bidri and Arock, 1996).

1.2.2.1.2. Régulation intrinsèque

La monocytopoïèse est contrôlée par l'expression et la suppression de facteurs de transcription spécifiques à des moments précis de la voie de développement des MOs. Ces derniers mettent en place des programmes spécifiques de lignage qui dépendent de : leur niveau d'expression, leur timing d'apparition, la collaboration et la compétition entre eux (Terry and Miller, 2014).

Chapitre 1. Revue de la littérature

En plus de son rôle dans la génération de CMPs dans la myélopoïèse précoce, le facteur de transcription PU.1 joue un rôle important dans la différenciation des MOs à différents stades de l'engagement, en entrant dans des interactions antagonistes avec différents facteurs de transcription (Scott et al., 1994). En effet, une expression élevée de PU.1 antagonise les régulateurs clés d'autres voies de développement telles que GATA-1, GATA-2 et CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α) qui respectivement ferme la voie de développement des mégacaryocytaire/érythroïde, des mastocytes et des granulocytes (Rekhtman et al., 1999; Zhang et al., 1997, 1999). En revanche, une expression à des niveaux faibles ou égaux de PU.1 peuvent entraîner des lectures coopératives ou une collaboration avec d'autres facteurs de transcription (Graf and Enver, 2009). Par exemple, la combinaison de C/EBP α et PU.1 est nécessaire ectopiquement pour induire le destin des M ϕ s dans les cellules B (Xie et al., 2004), les cellules T (Laiosa et al., 2006) et les fibroblastes (Feng et al., 2008).

D'autres facteurs de transcription pour déterminer le sort des MOs sont impliqués. Par exemple, interferon consensus sequence binding protein (ICSBP)/le facteur 8 régulateur de l'IFN (IRF-8) peut également conduire à la différenciation monocyttaire, au détriment de la différenciation granulocytaire des progéniteurs déficients en ICSBP/IRF-8. Ce résultat a fait supposer l'implication en conjonction de PU.1 (Tamura et al., 2000). De même, le facteur 4 de type Krueppel (KLF4) peut induire le destin des M ϕ s et en tant que facteur qui agit secondairement à l'action de PU.1, KLF4 peut sauver sélectivement la différenciation des MOs à partir des progéniteurs déficients en PU.1, tandis que la déficience en KLF4 fausse la différenciation des progéniteurs myéloïdes vers le sort granulocytaire (Feinberg et al., 2007).

1.2.2.2. Différenciation en macrophages

Pendant l'homéostasie et l'inflammation, les MOs circulants quittent le flux sanguin et migrent dans les tissus où ils se différencient en M ϕ s tissulaires sous l'effet de plusieurs facteurs de croissance locaux, des cytokines pro-inflammatoires et des produits microbiens (Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

L'hypothèse selon laquelle tous les M ϕ s résidents dans les tissus proviennent uniquement de la différenciation des MOs circulants a été réfutée pour différences morphologiques et fonctionnelles entre ces cellules (Epelman et al., 2014). Il est maintenant bien établi que la plupart des M ϕ s tissulaires sont des cellules à longue durée de vie dérivées des EMPs pendant une onde hématopoïétique transitoire émergeant dans le sac vitellin. Le développement de ces M ϕ s à partir des EMPs se fait au moins par deux voies distinctes : la première est indépendante du facteur de transcription c-Myb et donne naissance à des M ϕ s primitifs du sac vitellin sans passer par les MOs, la seconde nécessite l'expression de c-Myb et se fait suite à

Chapitre 1. Revue de la littérature

la différenciation des MOs fœtaux eux même dérivés des EMPs ayant coloniser le foie fœtal (Hoeffel and Ginhoux, 2018).

Ainsi, les Mφs du cerveau appelés cellules microgliales dérivent exclusivement des progéniteurs du sac vitellin, indépendamment des CSHs et des MOs. D'autres Mφs tissulaires sont dérivés des MOs mais avec des origines temporelles diverses. Par exemple, les Mφs alvéolaires des poumons et les cellules de Kupffer du foie proviennent initialement des progéniteurs du sac vitellin mais sont ensuite remplacés par des MOs dérivés du foie fœtal. En revanche, les Mφs du cœur, du pancréas, de l'intestin et du derme dérivent premièrement des MOs du foie fœtal puis sont remplacés par les MOs dérivés de la moelle osseuse, après la naissance ou plus tard dans la vie de manière significative ou presque entièrement selon le type tissulaire (Ginhoux et al., 2016; Wolf et al., 2019).

1.2.2.3. Différenciation en cellules dendritiques

L'habilité des MOs à se différencier en DCs immatures caractérisées par une faible expression du CMH-II a été initialement démontrée *in vitro* après culture des MOs en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Les DCs dérivées des MOs (mo-DCs) immatures peuvent ensuite maturer après traitement au LPS, le TNF, l'INF ou le CD40L (Ardavin et al., 2001). La maturation des DCs est un processus complexe accompagné par l'augmentation de l'expression du CMH-II et des molécules de costimulation, ainsi que des changements dans le traitement de l'antigène et la capacité de présentation, le comportement de migration et la capacité d'induire et de moduler les réponses des cellules T, NK et B (Palucka et al., 1999). La différenciation des MOs en DCs est contrôlée par le facteur de transcription IRF4 et favorisée par l'activation du récepteur d'aryl d'hydrocarbure (AHR) (Goudot et al., 2017).

Dans les modèles murins, les mo-DCs apparaissent au cours d'une réponse inflammatoire mais sont aussi présentes dans les muqueuses de la peau et de l'intestin dans un état physiologique normal. Ce schéma s'applique aussi aux humains où ces mo-DCs se trouvent à l'état d'équilibre dans la peau humaine mais aussi dans des conditions inflammatoires (Goudot et al., 2017). L'analyse transcriptomique montre que les DCs d'ascite partagent des signatures de gènes avec les mo-DCs générées *in vitro*, soutenant l'idée que ces DCs seraient donc des mo-DCs tissulaires (Segura et al., 2013).

1.2.3. Classification des monocytes humains

1.2.3.1. Expression du CD14

Le CD14 est un marqueur de différenciation myéloïde exprimé principalement sur les MOs et les Mφs, bien que de faibles niveaux soient également exprimés sur les neutrophiles. Le CD14 peut être sous forme de glycoprotéine ancrée au glycosylphosphatidylinositol (GPI) de

Chapitre 1. Revue de la littérature

la membrane cellulaire ou sous forme de deux isoformes solubles qui peuvent être générées par clivage à la surface de la cellule ou libérées à partir de pools intracellulaires (Shive et al., 2015). D'un point de vue structurel, le CD14 membranaire est sous forme de solénoïde avec trois sites de N-glycosylation occupés par des oligosaccharides essentiels à la sécrétion et au bon fonctionnement des protéines (da Silva et al., 2017).

En raison de l'absence d'un domaine cytoplasmique et de l'incapacité de GPI à activer directement les voies de signalisation (Lee et al., 1993), l'association des récepteurs de type Toll (TLRs) au CD14 est nécessaire pour activer les voies de signalisation intracellulaires et le plus important d'entre eux est le TLR4 (Poltorak, 1998). Ainsi, le CD14 associé au TLR4 se lie aux LPS retrouvés au niveau des parois cellulaires des bactéries gram négatif par l'intermédiaire de la protéine de liaison au LPS (LBP), le glucide structural et le lipide A du LPS sont pratiquement les mêmes pour ces bactéries et représentent la cible pour la fixation du CD14 (Arroyo-Espliguero, 2004). Ensuite, le TLR4 active plusieurs voies de signalisation intracellulaire, la plus importante étant la voie TLR4/NF- κ B (Guha and Mackman, 2001) conduisant à la synthèse et à la libération de peptides antimicrobiens, de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires et d'autres molécules de co-stimulation qui fournissent un lien avec immunité adaptative (Barnes and Karin, 1997).

Bien que caractérisé pour son association au TLR4 en réponse au LPS, le CD14 participe également à l'activation de plusieurs TLR extracellulaires et endosomiques (da Silva et al., 2017).

1.2.3.2. Expression du CD16

Le CD16 ou Fc γ RIII est un récepteur transmembranaire de type I contenant deux domaines extracellulaires de type immunoglobuline (Ig) et ont une faible affinité pour les anticorps IgG (Stern-Ginossar and Mandelboim, 2010). Chez l'homme, le CD16 est exprimé sous deux formes distinctes : CD16a et CD16b et présentent une homologie de 96% dans la portion extracellulaire du récepteur. Le CD16a est exprimé sur les cellules NK, les MOs, les M ϕ s et les trophoblastes placentaires sous forme de protéine transmembranaire ancrée au polypeptide (Nagarajan et al., 1995). Le poids moléculaire de ce récepteur varie entre 50 et 80 kDa, cette variation est probablement due à la glycosylation du récepteur ainsi qu'à la présence de deux allotypes ; soit avec un résidu phénylalanine ou valine en position 158 (Dorion-Thibaudeau et al., 2014). Le CD16b est exprimé sur les neutrophiles sous une forme ancrée au GPI (Nagarajan et al., 1995).

Chez l'homme, seuls les MOs CD16⁺ ont la capacité d'exercer la cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC) (Romano et al., 2015). Cela est de même chez la souris (Biburger et al., 2011). Une déficience en Fc γ RIV, l'homologue murin du CD16 humain (Mechetina et al., 2002) présentent des défauts dans plusieurs modèles d'ADCC (Nimmerjahn et al., 2010).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Dans une étude récente, il a été démontré que l'engagement de CD16 sur les MOs par l'anticorps lié aux cellules cibles a activé les β 2-intégrines et a induit la sécrétion de TNF- α . A son tour, cela a induit l'expression du TNFR sur les cellules cibles, les rendant sensibles à la mort cellulaire médiée par le TNF- α . Le traitement avec des agonistes TLR, des DAMPs ou des cytokines, tels que l'IFN- γ , a encore amélioré l'ADCC. Les MOs dépourvus de CD16 n'ont pas exercé d'ADCC mais ont acquis cette propriété après que l'expression de CD16 a été induite soit par stimulation cytokinique ou par transfection transitoire (Yeap et al., 2016).

L'engagement du CD16 sur les MOs peut aussi induire la phagocytose cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCP) qui servira à éliminer les pathogènes après une opsonisation spécifique par les anticorps (Aderem and Underhill, 1999). Dans l'ADCP, les récepteurs CD16 agrégés deviennent phosphorylés *via* les tyrosine kinases de la famille Src sur leur motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine (ITAM) à partir de la sous-unité γ associée, formant un site d'accueil pour Syk et déclenchant une cascade de signalisation impliquant la protéine kinase C (PKC), la PI3K et la génération du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2), du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) et du diacylglycérol (DAG). Ceux-ci conduisent à un remodelage du cytosquelette d'actine qui permet d'engloutir la cible (Tay et al., 2019).

1.2.3.3. Sous-ensembles des monocytes humains

L'énorme hétérogénéité dans la taille, la morphologie, la production de cytokines, la fonction phagocytaire et l'adhésion cellulaire des MOs humains a été décrite pour la première fois en 1989 (Passlick et al., 1989), ce qui a ouvert la porte à plusieurs tentatives pour définir des sous-groupes et pour enfin arriver à une nomenclature qui sépare trois sous-ensembles de MOs en fonction de l'intensité d'expression du CD14 et du CD16 (Ziegler-Heitbrock et al., 2010). Ainsi les MOs classiques ($CD14^{++}CD16^{-}$) expriment fortement le CD14 face à une absence de CD16 et représentent entre 80 à 95 % des MOs circulants, les MOs intermédiaires ($CD14^{++}CD16^{+}$) sont plutôt caractérisés par l'acquisition d'une faible expression de CD16 et représentent 2 à 8 % des MOs totaux, alors que les MOs non-classiques ($CD14^{+}CD16^{++}$) avec une proportion de 2 à 11% co-expriment faiblement le CD14 et fortement le CD16 (Sampath et al., 2018).

Bien que cette classification ait été utile pour délimiter certains aspects biologiques des MOs, il a été en même temps techniquement difficile d'associer l'expression de CD16 à la fonctionnalité cellulaire en termes de production de cytokines. En effet, plusieurs études ont montré que les MOs classiques produisent les niveaux les plus élevés de la cytokine anti-inflammatoire (IL-10) (Cros et al., 2010; Smedman et al., 2012; Wong et al., 2011). Quant aux MOs intermédiaires, ils ont été décrits comme la principale source de cytokines pro-inflammatoires telles que le l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α (Rossol et al., 2012; Tolouei Semnani et

Chapitre 1. Revue de la littérature

al., 2014), cependant une autre étude a révélé que ces mêmes MOs pourraient être d'importants producteurs d'IL-10 après stimulation des TLRs (Skrzeczyńska-Moncznik et al., 2008). La question de savoir si ces cellules peuvent produire simultanément des cytokines pro- et anti-inflammatoires ou s'il existe différentes cinétiques de sécrétion de ces médiateurs n'est pas encore élucidé. En revanche, les MOs non-classiques produiraient d'avantages de TNF- α et d'IL-1 β en réponse au LPS et seraient les plus inflammatoires (Wong et al., 2012).

De plus, l'analyse de l'expression des molécules de surface sur les sous-populations de MOs a révélé une expression différentielle des TLRs, des RS et des molécules de co-stimulation. Les MOs intermédiaires et non classiques expriment d'avantage de TLR 2, 4, 5, de molécules co-stimulantes CD80, CD86 et HLA-DR que les MOs classiques suggérant leur rôle dans la présentation de l'antigène. D'un autre côté, une expression plus élevée des RS comme le CD36 et le CD163 sur les MOs classiques laisse à penser que ces cellules ont une fonction phagocytaire prédominante (Mukherjee et al., 2015).

Il est important de mentionner que des redondances et des chevauchements fonctionnels importants entre les sous-populations ont été notés dans plusieurs études et des résultats contradictoires dans la littérature ont rendu plus difficile l'attribution des fonctions immunitaires précises aux différents sous-types de MOs à l'état d'équilibre (Merah-Mourah et al., 2020).

1.2.4. Caractéristiques fonctionnelles des monocytes

1.2.4.1. La dichotomie oxyde nitrique synthase inductible/Arginase

1.2.4.1.1. Oxyde nitrique synthases

Les NO synthases (NOS) sont des oxydoréductases qui dégradent la L-arginine en NO et en L-citrulline. Sur le plan structurel, ces enzymes sont des protéines homodimériques où chaque monomère est constitué de deux domaines : Le domaine C-terminal portant une activité réductase contient la flavine-adenine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN) ainsi que les sites de liaison au nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Alors que le domaine N-terminal possède une activité oxygénase et comporte les sites de liaison à la L-arginine et à la tétrahydrobioptérine (BH₄), en plus de l'hème. Les deux domaines sont reliés par un site central qui lie la calmoduline ce qui facilite le transfert d'électrons depuis le NADPH vers les flavines, puis des flavines jusqu'à l'hème (Alderton et al., 2001). Ces NOS requièrent la présence de la calmoduline et de plusieurs cofacteurs notamment le NADPH, la BH₄, l'hème, la FAD et la FMN pour être complètement actives. Chimiquement en présence d'oxygène moléculaire, la L-Arginine est hydroxylée par l'hème du domaine oxygénase en N^ω-hydroxy-L-arginine (NOHA) grâce aux électrons provenant du NADPH. La NOHA est oxydée à son tour pour donner le NO et la citrulline (Stuehr, 1999) (**Figure 7**).

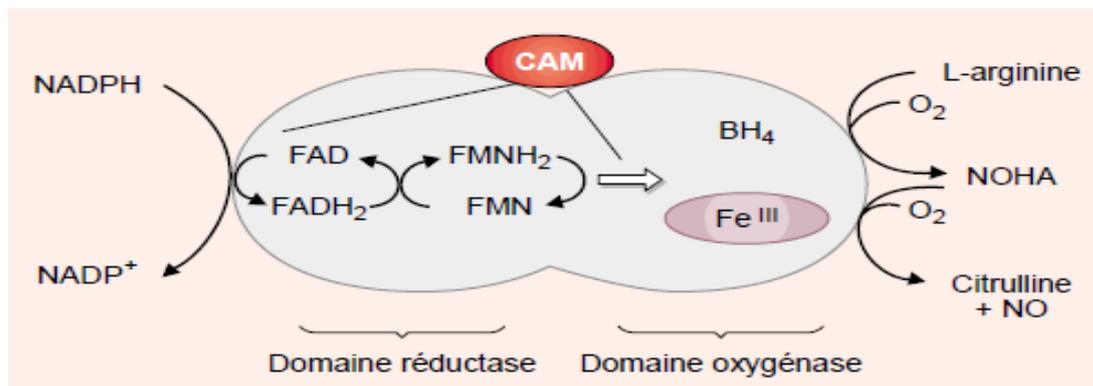


Figure 7. Structure et fonction des NOS. Le NADPH se fixe au domaine réductase des NOS où une 1^{ère} oxydation s'opère. Les deux électrons ainsi libérés transitent par FAD puis FMN aboutissant de la sorte au domaine oxygénase, qui possède les sites de fixation de BH₄ et de l'hème. Ce flux d'électrons n'est possible que si la calmoduline (CAM) est couplée à l'enzyme, ce qui rend l'activité des NOS constitutives dépendante du calcium alors que l'isoforme inductible possède une grande affinité au calcium. La L-arginine est hydroxylée par l'hème du domaine oxygénase en NOHA grâce aux deux électrons libérés suite à l'oxydation du NADPH et à la présence de l'oxygène moléculaire. NOHA est oxydée à son tour pour donner du NO et la citrulline. Cette double oxydation peut être inhibée par le NO en se fixant à l'atome de fer hémique.

Il existe trois isoformes de NOS : la NOS1 ou NOS neuronale (nNOS) isolée pour la première fois dans les neurones (Bredt and Snyder, 1990), la NOS2 mise en évidence dans les Mφs stimulés par le LPS et l'IFN-γ (Xie et al., 1992) et la NOS3 isolée dans les cellules endothéliales (Palmer et al., 1987). Une autre terminologie est aussi utilisée regroupant les NOS1 et 3 sous le terme de NOS constitutives (cNOS) et les iNOS représentées par la NOS2. La synthèse du NO par les cNOS dépend des ions de calcium intracellulaires et de la liaison de ces enzymes à la calmoduline. C'est donc la fixation du complexe calcium-calmoduline qui conditionne la réaction de synthèse de NO par les cNOS (Forstermann and Sessa, 2012). L'iNOS quant à elle n'est exprimée qu'après stimulation et possède une affinité très élevée pour la calmoduline, elle s'y lie à de très faibles concentrations de calcium ce qui la rend ainsi indépendante de la présence de calcium (Forstermann and Sessa, 2012) allant même jusqu'à suggérer la calmoduline comme étant une sous-unité d'iNOS (Cho et al., 1992). Physiologiquement, les NOS1 et NOS3 produisent des concentrations de NO de l'ordre du pM au nM, tandis que NOS2 produit une plus grande quantité de NO de l'ordre du μM.

1.2.4.1.1.1. Expression et régulation de l'oxyde nitrique synthase inductible

Chez l'homme, le gène qui code iNOS est localisé sur le chromosome 17, cette enzyme est exprimée sur de multiples tissus et types cellulaires. L'induction d'iNOS est médiée par l'IFN-γ en particulier en combinaison avec le LPS où ils interagissent en synergie mais elle peut également être activée par d'autres cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, le TNF et l'IFN-α ou -β (Bronte and Zanovello, 2005).

Chapitre 1. Revue de la littérature

La régulation de l'expression d'iNOS peut être d'ordre transcriptionnel impliquant la modulation de l'activité du promoteur et la stabilité des transcrits matures (ARNm) (Rao, 2000). Par exemple, l'activité du promoteur d'iNOS peut être réprimée par des récepteurs nucléaires comme les récepteurs aux glucocorticoïdes qui forment des complexes avec STAT1 α , AP-1 et NF- κ B provoquant leur transrépression. AP-1 peut aussi inhiber l'activité du promoteur d'iNOS en se fixant sur une séquence Silencer dite AP-1-like. Le suppresseur de tumeur p53 et le TGF- β répriment également l'expression d'iNOS (Pautz et al., 2010). La régulation de la stabilité des ARNm d'iNOS dépend des séquences 3'-UTR, les analyses de ces séquences chez l'humain ont révélé la présence des éléments riches en AU (ARE). Ces ARE médient la désintégration de l'ARNm principalement par le recrutement de l'exosome dans les ARNm favorisant ainsi leur dégradation rapide. Cependant, l'exosome semble avoir besoin de certaines protéines de liaison pour reconnaître les ARNm contenant ARE (Pautz et al., 2010). D'autres mécanismes post-transcriptionnels régulant la production du NO dérivée d'iNOS ont été décrits comme la disponibilité de son substrat, la L-arginine. En effet, d'autres enzymes comme les arginases entrent en compétition pour le même substrat (Bronte and Zanovello, 2005) et une déplétion d'arginine par ces enzymes sera associée à une diminution de l'activité d'iNOS (Lee et al., 2003). De plus, la nitration d'iNOS pourrait être associée à une diminution de son activité et pourrait être considérée comme un niveau supplémentaire de régulation de l'activité d'iNOS (Lanone et al., 2002).

L'expression d'iNOS et la production de NO peuvent être associées à des dérèglements immunitaires à l'origine de maladies auto-immunes et de maladies inflammatoires chroniques comme dans les M ϕ s au cours de la sclérose en plaque (De Groot et al., 1997) ou encore la maladie de Crohn (Singer et al., 1996).

1.2.4.1.1.2. Production d'oxyde nitrique

Le NO est un radical de petit poids moléculaire d'environ 30 kDa qui assure de multiples activités biologiques (Pavanelli et al., 2010). Il est produit par différentes cellules du système immunitaire notamment les MOs et les M ϕ s et les cellules qui sont impliquées dans les réponses immunitaires telles que les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les VSMCs, les fibroblastes... etc. Il peut exercer son effet sur la cellule cible de manière autocrine ou paracrine grâce à sa propriété lipophile qui lui permet de diffuser à travers la membrane. Ne possédant pas de récepteur cellulaire, le NO ne peut pas déclencher une cascade de signalisation classique messenger/récepteur cellulaire. Néanmoins, il est considéré comme une molécule essentielle dans la signalisation cellulaire en interagissant avec les molécules cibles (Aribi et al., 2015).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Le NO produit particulièrement par iNOS dans les MOs et les Mφs activés est impliqué dans l'inflammation, l'invasion microbienne et la cytotoxicité (Guzik et al., 2003). Par exemple, Il agit comme un médiateur de l'inflammation en augmentant l'activité enzymatique de COX ce qui favorise la production des eicosanoïdes pro-inflammatoires (Salvemini et al., 2013) et exerce également une immunité contre diverses bactéries, virus, champignons et parasites (Shreshtha et al., 2018). Le NO se combine aussi avec l'O₂⁻ pour former du ONOO⁻ qui accentue davantage l'effet cytotoxique du NO par l'oxydation des LDL (Botti et al., 2005), les dommages à l'ADN provoquant l'accumulation des mutations et l'oncogenèse (Kundu and Surh, 2008) et la nitration des protéines sur les résidus tyrosines qui est souvent utilisée comme biomarqueur des situations pathologiques associées à l'inflammation (Jones, 2012).

1.2.4.1.2. Activité de l'arginase

L'arginase est une métalloenzyme présente dans les cellules humaines sous deux isoformes : l'arginase 1 (Arg1) dans le cytosol et l'arginase 2 (Arg2) dans les mitochondries. Les deux hydrolysent la L-arginine pour produire de la L-ornithine et de l'urée grâce à un mécanisme impliquant un hydroxyde et deux ions de manganèse (Mortier et al., 2017). L-ornithine est le précurseur de la proline et des polyamines importantes pour la production de collagène et la réparation des tissus (Caldwell et al., 2015).

En fonction de leur état d'activation et de leur orientation inflammatoire, les Mφs sont classés en deux phénotypes distincts : M1 dits « classiques » et M2 dits « alternatifs ». Le métabolisme de l'arginine est un paramètre métabolique qui discrimine remarquablement ces deux populations de Mφs (Mills et al., 2000). En effet, les Mφs se différencient en M1 en réponse aux stimuli microbiens comme le LPS et aux cytokines de type Th1 tels que l'IFN-γ et produisent de grandes quantités de NO *via* iNOS (Sica and Mantovani, 2012). A l'opposé, les Mφs peuvent être polarisés en M2 par les cytokines de type Th2 tels que l'IL-4 et l'IL-13 ou l'IL-10, ces cytokines induisent l'expression de niveaux élevés d'Arg1 qui entrent en compétition avec iNOS pour le pool d'arginine et préviennent la génération de NO (Gordon and Martinez, 2010).

L'activité de l'arginase induit une déplétion de l'arginine dans le milieu extracellulaire et par conséquent bloque la synthèse du NO par les NOS. La suppression de ce substrat par l'arginase inhibe également l'expression d'iNOS en réprimant la traduction ainsi que la stabilité de la protéine iNOS (El-Gayar et al., 2003; Lee et al., 2003). De plus, l'arginase peut inhiber la production du NO médiée par iNOS par la génération d'urée (Prabhakar et al., 1997). Ce qui suggère que l'arginase régule négativement la production du NO *via* de multiples mécanismes. En revanche, NORA un intermédiaire formé lors de la catalyse de la L-arginine par les NOS est connu pour être un puissant inhibiteur de l'arginase (Boucher et al., 1994).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Ces interactions régulatrices réciproques suggère un effet antagoniste de ces deux systèmes enzymatiques l'un envers l'autre.

1.2.4.1.3. Switch entre les voies métaboliques de la L-arginine

Pendant la réponse inflammatoire, les MOs et les Mφs activés sont soumis à un stress oxydatif caractérisé par l'expression des niveaux élevés d'iNOS et de l'isoforme phagocytaire de la NADPH oxydase (NOX)-2. iNOS et NOX2 produisent respectivement des niveaux nocifs et cytotoxiques de NO et d'O₂⁻ importants à l'éradication des agents pathogènes (Satriano, 2004). Cette réponse inflammatoire est suivie d'une phase de résolution et de réparation qui commence dans les 3 à 5 jours. Au cours de cette phase, l'expression de l'arginase est augmentée et conduit à la synthèse de la proline et des polyamines. La proline est nécessaire à la formation du collagène et la restauration de la matrice extracellulaire tandis que les polyamines sont importantes pour la prolifération cellulaire. L'équilibre entre la consommation de L-arginine par iNOS et l'arginase contrôle les événements cytotoxiques et le processus de guérison médiés respectivement par iNOS et l'arginase (Caldwell et al., 2018).

1.2.4.2. Production de peroxyde d'hydrogène

Le système enzymatique primaire qui génère des ROS pendant le début de l'inflammation est la NOX (Brandes et al., 2014).

Dans les MOs humains au repos, le complexe NOX n'est pas assemblé et ses composants sont situés dans le cytosol et la membrane. Les composants membranaires comprennent le cytochrome b558 composé de gp91^{phox} et p22^{phox} et les composants cytosoliques comprennent p47^{phox}, p67^{phox} et Rac1. Lors de l'activation, les composants cytosoliques se transloquent vers la membrane où ils s'associent aux composants de la membrane, le complexe enzymatique nouvellement formé catalyse activement la production d'H₂O₂ et d'O₂⁻ (Cathcart, 2004). Le H₂O₂ exerce plusieurs activités à différents niveaux :

❖ Phagocytose

Pendant la phagocytose, le H₂O₂ et les radicaux hydroxyyles attaquent la membrane cellulaire microbienne et endommagent également l'ADN bactérien. De plus, le H₂O₂ peut interagir avec la MPO pour acidifier le pH du phagolysosome ce qui dissout les parois cellulaires et tue l'agent pathogène (2012).

❖ Inflammation

Le H₂O₂ peut également agir comme une molécule de signalisation intracellulaire ou locale pour favoriser l'inflammation. En effet, le H₂O₂ peut moduler la fonction des protéines en induisant des modifications chimiques réversibles des résidus thiols protéiques qui entraînent des changements conformationnels affectant la liaison à l'ADN, l'activité

Chapitre 1. Revue de la littérature

enzymatique ou la formation de complexes protéiques. Le NF- κ B/Rel est l'un des complexes sensibles à l'oxydoréduction par le H₂O₂ (Wittmann et al., 2012). L'activation Redox-dépendante de NF- κ B peut se produire par plusieurs voies distinctes notamment l'activation des MAPKs par l'oxydation des cystéines catalytiques des phosphatases inactivatrices de MAPKs (Kamata et al., 2005; Son et al., 2011) ou par l'induction des Syk kinases qui à leur tour induisent la phosphorylation des résidus tyrosine des inhibiteurs I κ B (Takada et al., 2003). De plus, la liaison des leucocytes à VCAM-1 stimule NOX2 des cellules endothéliales entraînant la production de H₂O₂ qui active localement les MMPs, ces dernières dégradent la matrice et les récepteurs des cellules endothéliales des jonctions cellulaires facilitant la migration transendothéliale des leucocytes au site de l'inflammation (Alexander and Elrod, 2002; Cook-Mills, 2006).

En revanche, le H₂O₂ peut également agir comme un régulateur négatif de l'activation de NF- κ B par oxydation de la cystéine en position 62 de p50 ce qui inhibe la liaison de cette sous-unité à l'ADN (Matthews et al., 1992) ou par l'inactivation du complexe enzymatique IKK par oxydation des résidus cystéines (Korn et al., 2001).

Les ROS notamment le H₂O₂ sont des effecteurs critiques qui participent à plusieurs événements cellulaires régulés par Redox et dont le résultat final est la résolution de l'inflammation. Cependant, une génération excessive de ROS entraîne une inflammation chronique, des lésions inflammatoires des tissus, une défaillance d'organe et le développement d'une variété de maladies inflammatoires chroniques (Vazquez-Medina, 2018).

1.2.4.3. Phagocytose et destruction bactérienne « Bacterial Killing »

La phagocytose est un processus complexe exercé par des cellules immunitaires spécialisées telles que les MOs. Elle représente l'un des principaux mécanismes de défense non spécifiques qui contribuent à l'élimination des micro-organismes, des agents pathogènes et des débris cellulaires et pourrait également être nécessaire au développement embryonnaire et au remodelage tissulaire (Döring et al., 2015).

Différents récepteurs peuvent conduire à la phagocytose d'agents pathogènes et les éléments du cytosquelette assemblés au site de la phagocytose diffèrent selon le récepteur employé et la nature de l'agent pathogène internalisé. De plus, les conséquences inflammatoires de l'internalisation des pathogènes varient considérablement. Ainsi, la phagocytose médiée par le récepteur du complément est non-inflammatoire, celle médiée par les récepteurs Fc est fortement pro-inflammatoire alors que l'absorption des cellules apoptotiques est anti-inflammatoire (Aderem, 2003). La reconnaissance du LPS par les MOs active les récepteurs TLR4 et conduit à l'activation de multiples voies de signalisation telles

Chapitre 1. Revue de la littérature

que le NF- κ B, la MAPK et la PI3K (Wang et al., 2018). La voie de signalisation PI3K est impliquée dans la régulation de l'extension des pseudopodes qui nécessite une vague de remodelage lipidique pour former le phagosome (Kortholt et al., 2010) et son inhibition bloque la phagocytose par la modification de la polymérisation de l'actine aux sites d'absorption (Allen, 2005).

Dans le phagosome, la destruction du pathogène peut se faire par deux différents mécanismes. Le premier dépend de la présence de l'oxygène et la génération des ROS comme le H₂O₂ et les radicaux hydroxyles qui attaquent les membranes cellulaires et endommagent également l'ADN bactérien, la MPO contenue dans les lysosomes des MOs interagit avec le H₂O₂ en présence de chlore pour générer l'acide hypochloreux rendant le pH du phagolysosome acide et bactéricide (2012). Le second mécanisme est indépendant de l'oxygène et se fait *via* des granules lysosomales contenant des enzymes protéolytiques. Les granules primaires, secondaires et tertiaires fusionnent avec la membrane du phagosome pour libérer leur contenu, chaque type de granule possède une gamme différente de molécules cytotoxiques pour différentes cibles microbiennes. Ainsi, les primaires sécrètent les protéinases et le lysozyme, les secondaires déposent de la lactoferrine et des défensines quant aux tertiaires elles contiennent de la gélatinase, de l'acétyltransférase et du lysozyme (2012).

Le processus de phagocytose prend fin avec l'apprêtement des peptides antigéniques et leur présentation aux cellules de l'immunité adaptative (Niedergang and Chavrier, 2004).

1.2.4.4. Production des cytokines

L'activation des voies de signalisation TLR provient des domaines Toll/IL-1 récepteur (TIR) cytoplasmiques partagés dans tous les TLRs (Akira et al., 2006; Janssens and Beyaert, 2003), des protéines adaptatrices contenant le domaine TIR telles que MyD88, protéine adaptatrice contenant le domaine TIR (TIRAP), molécule adaptatrice apparentée au TRIF (TRAM) et adaptateur à domaine TIR inducteur d'interféron β (TRIF), modulent les voies de signalisation TLR (Akira and Takeda, 2004). A des exceptions près, la signalisation à travers les TLRs nécessite MyD88 pour la production de cytokines inflammatoires. Cependant, il existe une voie indépendante de MyD88 déclenchée après signalisation *via* TLR3 ou TLR4 qui conduit à la production d'interférons de type I (Akira and Takeda, 2004; McGettrick, 2004; Takeda and Akira, 2004).

Ainsi, dans l'activation du TLR4 par le LPS, TIRAP contenant un domaine TIR assure la médiation spécifique de la voie dépendante de MyD88 tandis que TRAM est recruté pour établir un lien entre TLR4 et TRIF dans la voie indépendante de MyD88 (Akira and Takeda, 2004).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.2.4.4.1. Voie dépendante de MyD88

Après engagement du TLR4, MyD88 forme un complexe appelé myddosome avec les membres 1 et 4 de la famille des kinases associées au récepteur d'IL-1 (IRAK) (Lin et al., 2010). Pendant la formation du myddosome, IRAK4 active IRAK1 qui est ensuite autophosphorylé sur plusieurs sites ce qui induit l'interaction de TRAF6 avec le complexe. L'association de IRAK4-IRAK1-TRAF6 provoque un certain changement conformationnel dans un ou plusieurs de ces facteurs conduisant à leur désengagement du complexe récepteur. Le complexe IRAK4-IRAK1-TRAF6 interagit de nouveau au niveau de la membrane avec un autre complexe préformé composé de kinase 1 activée par les isotypes de TGF- β (TAK1) et deux adaptateurs appelés TAK1-binding protein 1 (TAB1) et 2 (TAB2). Cette interaction induit la phosphorylation de TAB2 et TAK1 qui se transloquent ensuite avec TRAF6 et TAB1 vers le cytosol. TAK1 est ensuite activé dans le cytoplasme et permet l'activation d'IKK (Akira, 2003; Kawasaki and Kawai, 2014). IKK dans sa forme inactive séquestre le NF- κ B dans le cytoplasme, son activation par TAK1 entraîne la dégradation d'I κ B et la libération de NF- κ B qui est maintenant prêt à se déplacer au noyau pour induire l'expression des gènes pro-inflammatoires. TAK1 active également les MAPK telles qu'ERK1/2, p38 et JNK ce qui conduit à l'activation du facteur de transcription AP-1 (Akira, 2003; Kawasaki and Kawai, 2014).

1.2.4.4.2. Voie indépendante de MyD88 ou voie TRIF dépendante

L'engagement du TLR4 induit également l'activation des TRIFs ce qui permet le recrutement de TRAF6 et TRAF3. TRAF6 recrute la kinase RIP-1 qui active le complexe TAK1 conduisant à l'activation de NF- κ B et MAPK et à l'induction de cytokines inflammatoires. En revanche, TRAF3 recrute les kinases TBK1 et IKKi pour la phosphorylation d'IRF3. Par la suite, l'IRF3 forme un dimère et se déplace dans le noyau à partir du cytoplasme où il induit l'expression des gènes d'IFN de type I (Akira et al., 2006; Kawai and Akira, 2010). **(Figure 8)**.

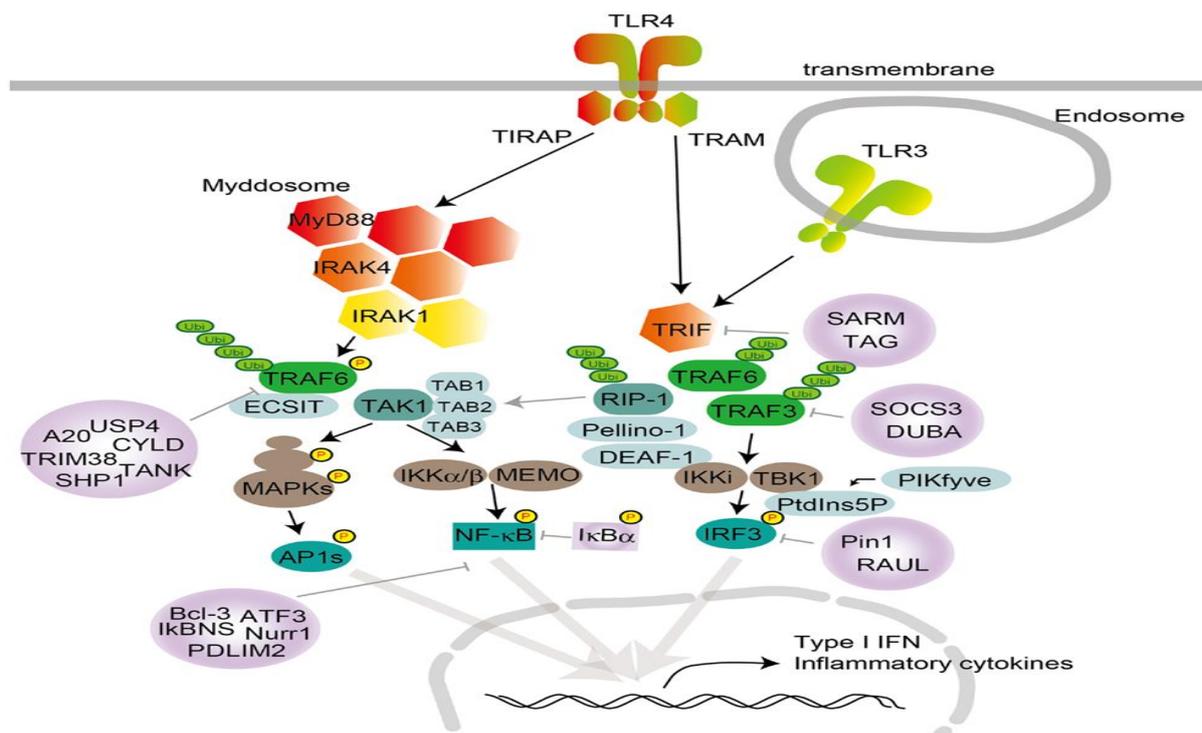


Figure 8. Signalisation TLR4 (Kawasaki and Kawai, 2014). TLR4 est localisé à la surface cellulaire. La formation d'un homo- ou hétéro-dimère initie la signalisation vers les deux principales protéines adaptatrices en aval, MyD88 et TRIF. TIRAP conduit le signal de TLR4 vers MyD88 et TRAM assure la médiation du signal de TLR4 vers TRIF. L'engagement TLR induit la formation du Myddosome formé de MyD88, IRAK1 et IRAK4. IRAK1 activé induit à son tour l'activation de TRAF6. L'activation de TAK1 conduit à l'activation du complexe IKK-NF-κB et des MAPKs. L'activation des MAPKs conduit à l'activation du facteur de transcription AP-1. L'engagement TLR induit également l'activation TRIF après le recrutement de TRAF6 et de TRAF3. TRAF6 recrute RIP-1, qui active le complexe TAK1 et par la suite les MAPKs. TRAF3 recrute les kinases TBK1 et IKKi pour la phosphorylation d'IRF3 induisant l'expression des gènes d'IFN de type I.

1.2.5. Immuno-métabolisme des monocytes

1.2.5.1. Dynamique du calcium intracellulaire

Le Ca^{2+} est un messager secondaire omniprésent qui contrôle plusieurs processus dans les cellules immunitaires (Vig and Kinet, 2009).

A l'état de repos, la concentration intracellulaire des ions Ca^{2+} libres est généralement de l'ordre du nanomolaire, mille fois inférieure à celle du milieu extracellulaire et lors d'une stimulation elle peut atteindre des valeurs de l'ordre du micromolaire. Ces variations de Ca^{2+} intracellulaires constituent un système d'amplification particulièrement efficace et expliquent pourquoi le Ca^{2+} est universellement utilisé comme second messager (Bagur and Hajnóczky, 2017). Il existe deux possibilités d'augmenter le Ca^{2+} intracellulaire ; la première possibilité est qu'il y ait un influx à partir du milieu extracellulaire *via* les canaux calciques de la membrane plasmique. Les ions Ca^{2+} se déplacent selon le gradient électro-physiologique. La deuxième possibilité est une libération des réserves calciques intracellulaires constituées par exemple par le réticulum endoplasmique activé par l'inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP3). Ou encore par

Chapitre 1. Revue de la littérature

la mitochondrie où l'efflux de Ca^{2+} se fait à travers l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) et de l'échangeur $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX) (Clapham, 2007).

En revanche, La faible concentration de Ca^{2+} cytosolique est maintenue par l'extrusion vers :

- ❖ Le milieu extracellulaire grâce à la pompe calcique ATP-dépendante de la membrane plasmique (PMCA) et aux échangeurs de cations NCX.
- ❖ Le reticulum endoplasmique grâce à la pompe sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA).
- ❖ Les protéines liant le Ca^{2+} (CaBPs). Certaines de ces protéines possèdent une activité enzymatique intrinsèque telles que la calcineurine ou la calpaïne alors que d'autres servent de lien entre le Ca^{2+} et la protéine porteuse de l'activité catalytique telles que la calmoduline ou la troponine C (Bagur and Hajnóczky, 2017).

Le changement dans la concentration du Ca^{2+} cytosolique est crucial pour la fonction des MOs notamment leur réponse aux stimuli pro-inflammatoires tels que les chimiokines et le LPS, la chimiotaxie, la phagocytose et la production de cytokines. La dynamique du Ca^{2+} des MOs est altérée dans des conditions pathologiques comme le cas de la formation des cellules spumeuses au cours de l'athérosclérose (Sivaramakrishnan et al., 2012).

1.2.5.2. Cholestérol cellulaire total

Le cholestérol est le lipide de la famille des stérols le plus répandu dans l'organisme. En plus d'être un composant structural des membranes, le cholestérol sert également de précurseur pour la biosynthèse de plusieurs composés comme les acides biliaires, la vitamine D et plusieurs stéroïdes (Cerqueira et al., 2016).

Toutes les cellules de l'organisme y compris les cellules immunitaires sont capables de synthétiser le cholestérol. Le premier substrat de cette synthèse est l'acétyl-CoA qui peut être produit dans la mitochondrie par glycolyse ou par β -oxydation des acides gras. L'acétoacétyl thiolase condense deux molécules d'acétyl-CoA dans le cytosol pour former une molécule d'acétoacétyl-CoA. Une troisième molécule d'acétylCoA est ensuite ajoutée pour former une molécule d'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) *via* HMG-CoA synthase. HMG-CoA est réduit en mévalonate par l'HMG-CoA-Reductase. Le mévalonate subit ensuite une série de condensations qui aboutit à la formation du farnésyl-pyrophosphate. La condensation de deux farnésyl-pyrophosphates par la squalène synthase produit le squalène qui est ensuite époxydé par la squalène oxydase puis cyclisé par la 2,3-oxydosqualène cyclase en lanostérol. A partir du lanostérol, 19 réactions sont encore nécessaires pour conduire à la formation des dérivés comme le desmostérol et le 7-dehydrocholestérol puis finalement au cholestérol (Cerqueira et al., 2016). En plus de la biosynthèse endogène, les MOs avec leurs récepteurs aux LDL

Chapitre 1. Revue de la littérature

peuvent s'approvisionner en cholestérol (Fernandez-Ruiz et al., 2016).

Le maintien de l'homéostasie du cholestérol intracellulaire nécessite la mise en place d'un équilibre entre les régulations de la synthèse endogène et de l'import/export par les MOs. Ces mécanismes sont contrôlés par le taux intracellulaire du cholestérol *via* une régulation transcriptionnelle et post transcriptionnelle des nombreuses protéines impliquées. Pour cela, deux facteurs de transcription dont les actions sont opposées y sont principalement impliqués. Le *liver X Receptor alpha* (LXR α) est activé lorsque les cellules accumulent excessivement le cholestérol, il induit l'expression des transporteurs membranaires adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 (ABCA1) et adenosine triphosphate-binding cassette transporter G1 (ABCG1) stimulant l'efflux et inhibant l'import du cholestérol (Feeney et al., 2013). Tandis que la *Sterol Regulatory Element Binding Protein* (SREBP2) est activée lorsque le taux de cholestérol est bas, elle induit la production de la HMG-CoA réductase et les LDL-R favorisant la synthèse endogène et l'import du cholestérol (Brown and Goldstein, 1997; Feeney et al., 2013).

Par ailleurs, la teneur en cholestérol dont la majorité est membranaire modifie la rigidité de la membrane cellulaire et par conséquent la diffusion des lipides et des protéines. Ainsi il a été démontré que le cholestérol cellulaire joue un rôle important dans la réponse chimiotactique des MOs. En effet, l'augmentation de la teneur en cholestérol renforce la chimiotaxie des MOs en augmentant l'expression de CCR2 qui par la suite exacerbe davantage l'inflammation (Saha et al., 2018). Le cholestérol cellulaire modifie également la distribution du CD44 –ligand de la sélectine E- remodelant ainsi la dynamique de capture des MOs à partir de la circulation sanguine (Saha et al., 2017a). De plus, la teneur en cholestérol cellulaire régit la déformabilité cellulaire en conséquence de la phosphorylation de PKC, qui orchestre directement en aval plusieurs voies de signalisation importantes. Les changements dans la déformabilité cellulaire peuvent avoir des conséquences importantes dans la réponse immunitaire des MOs notamment l'interaction avec l'endothélium vasculaire, la transmigration dans les tissus et la phagocytose (Saha et al., 2017b).

1.2.5.3. Métabolisme du glucose intracellulaire

Le glucose est la principale source d'énergie pour les cellules immunitaires notamment les MOs. Il est transformé en ATP par la glycolyse ou la phosphorylation oxydative (OXPHOS) mitochondriale (Calder et al., 2007).

La glycolyse s'est révélée être impliquée dans un certain nombre de processus immunitaires (O'Neill et al., 2016). En effet, Les signaux pro-inflammatoires induisent un changement métabolique dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes entraînant une régulation positive de la glycolyse d'une manière similaire à l'effet Warburg décrit dans les cellules cancéreuses (Pålsson-McDermott and O'Neill, 2020). Cette observation est plutôt surprenante

Chapitre 1. Revue de la littérature

car la glycolyse n'est pas le moyen le plus efficace pour produire de l'ATP, elle génère à partir d'une molécule de glucose que deux molécules d'ATP tandis que l'OXPPOS génère 36 molécules d'ATP. En revanche, la glycolyse peut être rapidement activée *via* l'induction d'enzymes impliquées dans cette voie alors que l'OXPPOS nécessite une biogenèse mitochondriale qui est un processus plus complexe et probablement plus lent. Ainsi, les cellules qui doivent produire rapidement de l'ATP privilégieront la glycolyse (O'Neill et al., 2016). Cette dépendance à la glycolyse est observée dans les MOs activés par le LPS (Pence and Yarbro, 2019), les Mφs activés de façon innée ou classique (Rodríguez-Prados et al., 2010), les cellules NK activés (Donnelly et al., 2014), les cellules B activées (Doughty et al., 2006) et les cellules T effectrices y compris les Th1 (Michalek et al., 2011) et Th17 (Shi et al., 2011). Quant à l'OXPPOS, elle favorise en général un phénotype anti-inflammatoire comme le cas des M2 alternativement activés et les Treg (Pålsson-McDermott and O'Neill, 2020).

Le processus de la glycolyse implique l'activation du facteur induit par l'hypoxie (HIF)-1 α , qui est un facteur de transcription crucial pour l'induction des enzymes impliquées dans la glycolyse (Tannahill et al., 2013). De plus, la pyruvate kinase (PK)-M2 augmente l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α et la transcription des enzymes glycolytiques clés et de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β (Luo et al., 2011; Pålsson-McDermott et al., 2015). Cette reprogrammation métabolique médiée par HIF-1 α orchestre la différenciation des cellules immunitaire vers un phénotype inflammatoire. De plus, un rôle pro-inflammatoire de PKM2 dans les MOs et les Mφs inflammatoires a également été démontré dans la maladie coronarienne athérosclérotique humaine, soulignant davantage la contribution de cette enzyme glycolytique dans l'inflammation (Shirai et al., 2016).

1.2.6. Expression de la molécule de co-stimulation CD40 et voie signalétique

Le CD40 fait partie de la superfamille des récepteurs de TNF, c'est une glycoprotéine de 50 kDa exprimée à la surface de nombreuses cellules notamment les MOs et dont l'expression est induite par le GM-CSF, l'IL-3 et l'IFN- γ (Alderson et al., 1993).

L'engagement du CD40 dans les MOs et les Mφs induit la production de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines telles que IL-1 α/β , IL-6, IL-8, IL-12, le TNF- α et la protéine inflammatoire des Mφs (MIP)-1 α connue pour son activité chimiotactique (Kiener et al., 1995a; Stout and Suttles, 1996a). L'activation du CD40 dans ces mêmes lignées cellulaires entraîne également une régulation positive des molécules de co-stimulation (Kiener et al., 1995a), la génération de NO (Tian et al., 1995a), l'échappement à l'apoptose (Kiener et al., 1995a) et l'induction de la production de MMPs (Malik et al., 1996). De plus, l'importance de l'activation du CD40 dans les Mφs pendant la défense de l'hôte a été confirmée chez les souris déficientes en CD40L qui présentaient des fonctions défectueuses des Mφs (Stout et al., 1996a).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Le CD40 seul est incapable d'initier sa propre activité intrinsèque et doit être associé à des protéines adaptatrices pour la transduction du signal. Les facteurs associés aux récepteurs de TNF (TRAFs) représentent une famille de protéines capables de se lier à la queue cytoplasmique du CD40 et selon le type cellulaire et la protéine TRAF engagée, plusieurs cascades de signalisation peuvent être induites (Bishop et al., 2007; Lievens et al., 2009). Ainsi, une analyse du rôle des interactions CD40-TRAF dans la production des cytokines inflammatoires par les MOs/Mφs activés *via* leur récepteur CD40 a révélé une exigence critique du recrutement de TRAF6 qui induit l'activation des voies signalétiques pro-inflammatoires Src/ERK1/2 et IKK/NF-κB (Mukundan et al., 2005).

L'axe CD40-CD40L est impliqué dans les réponses immunitaires tant humorales que cellulaires et apparaît comme un acteur majeur dans un large spectre de maladies inflammatoires et auto-immunes chroniques (Chatzigeorgiou et al., 2009).

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.3. Aspirine

1.3.1. Chimie de l'aspirine

L'aspirine est un prototype de médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS), et fait partie de la famille des salicylates qui ont en commun l'acide salicylique comme agent actif. L'acide salicylique est composé d'un cycle benzénique et de deux radicaux, un hydroxyle et un carboxyle. Dans l'acide acétylsalicylique ou l'aspirine (ASA), le groupe hydroxyle du salicylate est transformé en groupe acétyle par estérification. Les propriétés pharmacologiques de l'ASA restent similaires à celles des salicylates mais d'autres actions biologiques lui sont attribuées en raison de la présence du groupe réactif d'acétate (Cadavid, 2017) (**Figure 9**).

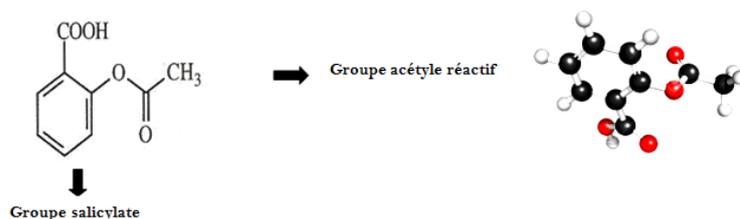


Figure 9. Structure chimique et moléculaire de l'aspirine.

1.3.2. Propriétés pharmacologiques

1.3.2.1. Propriétés dépendantes des cyclooxygénases

1.3.2.1.1. Inhibition des cyclooxygénases

Les cyclooxygénases (COXs) sont des enzymes qui catalysent la conversion de l'acide arachidonique (AA) en prostanoïdes. Il existe trois isoformes de COX dont la COX-1 qui est exprimée de manière ubiquitaire et constitutive dans la plupart des tissus et la COX-2 qui est exprimée de manière inductible en réponse à des stimuli inflammatoires et prolifératifs comme les cytokines et les facteurs de croissance ou des ROS (Rouzer and Marnett, 2009).

L'inhibition de l'activité de la COX-1 et -2 par le groupe acétyle actif de l'ASA est attribuée à la modification covalente des résidus de sérine (Ser) du site actif (Ser 529 dans COX-1 et Ser 516 dans COX-2) (Loll et al., 1995; Lucido et al., 2016). Cette acétylation entraîne une inhibition irréversible par blocage stérique du site actif et bloque la voie du métabolisme de l'AA réduisant ainsi la production des prostanoïdes (Patrono, 2015).

1.3.2.1.1.1. Inhibition de la COX-1 plaquettaire et effet anti-thrombotique

Dans les plaquettes humaines, COX-1 catalyse la conversion de l'AA en prostaglandine (PG)-H₂ qui est le précurseur direct de la PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, de la prostacycline (PGI₂) et du thromboxane A₂ (TXA₂) (Moncada and Vane, 1979). Le TXA₂ représente le dérivé majeur de

Chapitre 1. Revue de la littérature

l'AA dans les plaquettes humaines, il est formé par l'isomérase spécifique appelée TXA₂ synthase et agit comme un agoniste plaquettaire, un vasoconstricteur et un mitogène des VSMCs (Dorn, 1997; FitzGerald, 1991). De plus l'ASA à faible dose inhibe l'agrégation plaquettaire dépendante de TXA₂ par la suppression de 95% de l'activité de la COX-1 plaquettaire et réduit le risque de formation du thrombus occlusif (Patrono et al., 2005) (**Figure 10**).

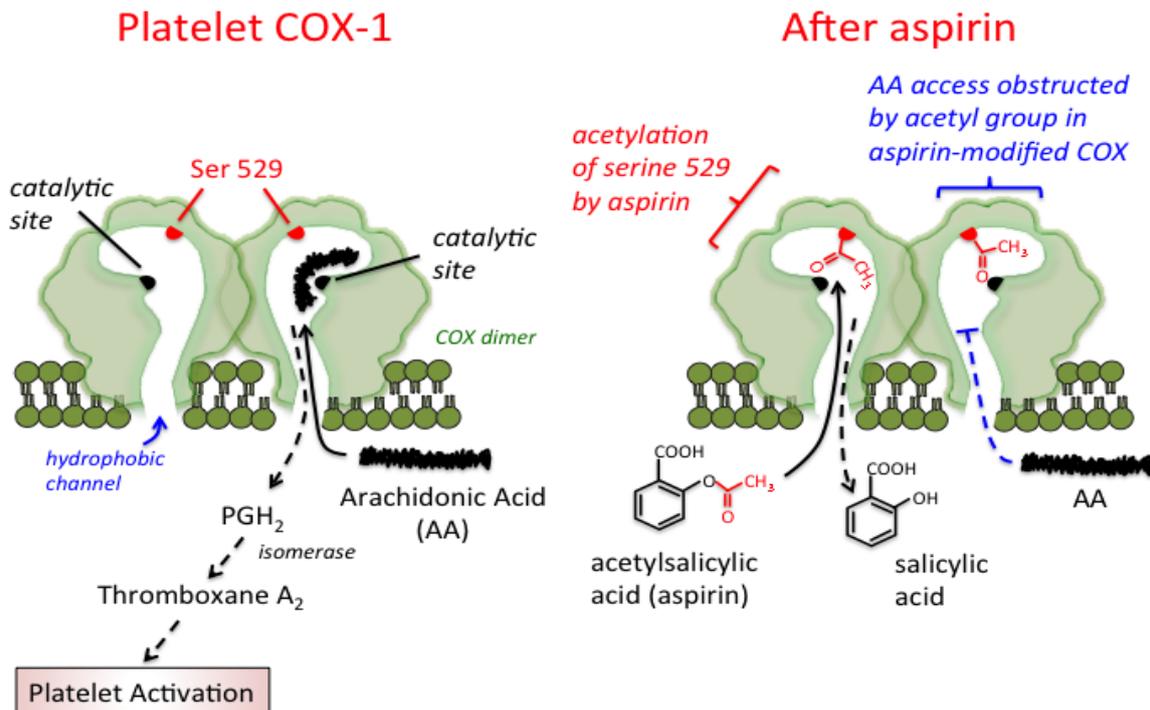


Figure 10. Inhibition de la cyclooxygénase (COX)-1 des plaquettes par l'aspirine (Fitzgerald and FitzGerald, 2013). Les enzymes COX-1 et -2 existent sous forme de dimères. En l'absence d'aspirine (ASA) (panneau de gauche), l'acide arachidonique (AA) qui est formé par la décomposition de phospholipase A2 des phospholipides membranaires accède au site actif de COX *via* un canal hydrophobe. Le métabolisme de l'AA par COX produit une prostaglandine intermédiaire PGH₂ qui dans les plaquettes est décomposée par les isomérases tissulaires en thromboxane A₂. Comme le montre le panneau de droite, l'ASA inhibe irréversiblement l'activité de COX par acétylation d'un résidu sérine dans le site actif de COX (Ser 529 dans COX-1 et Ser 516 dans COX-2). Cela produit un blocage stérique qui empêche le métabolisme de l'AA. L'ASA agit par le même mécanisme pour bloquer la COX-2 dans d'autres tissus.

1.3.2.1.1.2. Inhibition de la COX-2 et effet anti-inflammatoire

Dans le cadre de la réponse inflammatoire chronique ou des lésions tissulaires excessives, le système immunitaire élabore des mécanismes de contrôle de cette réponse, grâce à la production de médiateurs lipidiques pro-résolvants notamment les lipoxines sécrétées par les neutrophiles et les Mφs (Fierro and Serhan, 2001; Serhan and Savill, 2005) et produits à partir d'AA ou d'acides gras polyinsaturés oméga-3 (AGPI) sous l'action des lipoxygénases (LO)-5, -15 et -20 (Serhan, 2008).

Chapitre 1. Revue de la littérature

L'acétylation de la COX-2 par l'ASA inhibe la production des PGs et réoriente son activité catalytique vers la production d'acide 15-hydroxyl-eicosatétraénoïque. Les épi-lipoxines déclenchées par l'ASA (ATLs) telles que 15-épi-lipoxine A4 se forment lorsque l'acide 15R-hydroxyl eicosatétraénoïque est métabolisé par la LO-5 (Serhan et al., 2000a). Ces produits biologiquement actifs sont des médiateurs lipidiques pro-résolvants très similaires à ceux produits de manière endogène et se lient au même récepteur conférant à l'ASA certaines propriétés spéciales dans la réponse inflammatoire mais aussi dans la résolution de l'inflammation et la restauration de l'homéostasie tissulaire (Sharma-walia and Chandrasekharan, 2015).

Les ATLs exercent leurs effets anti-inflammatoires par le biais de signaux générés après s'être liées au récepteur de lipoxine A4 couplé aux protéines G de haute affinité (ALX)/récepteur de peptide formyle 2 (FPR2).

- ❖ Leur liaison à leur récepteur empêche d'autres ligands proinflammatoires de se lier comme la protéine sérum amyloïde A (SAA) (Serhan et al., 2000b).
- ❖ Elles atténuent l'accumulation de NF- κ B et de la protéine activatrice (AP)-1 dans le noyau en inhibant la formation de l'anion peroxy-nitrite (ONOO⁻) formé à partir du superoxyde (O₂⁻) et le NO libérés dans le site de l'inflammation. Ces facteurs de transcription jouent un rôle important dans le contrôle de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation comme la sélectine E, le TNF- α , l'IL-8 et l'IL-1 β (Jozsef et al., 2002).
- ❖ Les ATLs peuvent aussi compromettre le recrutement des leucocytes lors d'une réponse inflammatoire à médiation immunitaire *via* l'interaction avec leurs récepteurs spécifiques des lipoxine A4. Ainsi, elles régulent négativement l'interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales en produisant du NO antiadhésif (Paul-Clark et al., 2004). Elles sont aussi considérées comme de puissants antagonistes de l'adhésion et la transmigration des neutrophiles médiées par le TNF- α (Goh et al., 2001) et peuvent bloquer la phosphorylation de la protéine spécifique des leucocytes (LSP)-1 et altérer la phosphorylation et l'activation des composants de la cascade des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK)-p38 connue pour favoriser la chimiotaxie des neutrophiles (Ohira et al., 2004).

De plus, les lipoxines peuvent avoir des effets divergents sur la voie de la phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase (PI3K) et AKT selon le type cellulaire ; elles peuvent ainsi contrôler la prolifération des cellules immunitaires et des cellules cancéreuses en inhibant les voies favorisant la croissance comme PI3K et AKT (Greene et al., 2011), ou stimuler une activation rapide des voies PI3K/AKT et extracellular signal-regulated kinase (ERK)/Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) qui jouent un rôle important

Chapitre 1. Revue de la littérature

dans l'inhibition de l'apoptose dans les Mφs au cours de la résolution de l'inflammation (Prieto et al., 2010). Elles contribuent aussi à l'infiltration des neutrophiles pendant la phase de résolution de l'inflammation en augmentant leurs niveaux de calcium cytosolique (Luscinskas et al., 1990) qui favorisent l'assemblage des éléments du cytosquelette et qui aident les neutrophiles à déployer leurs pseudopodes et à initier la migration transendothéliale (Dixit and Simon, 2012). En même temps, elles contrôlent leur prolifération en bloquant la myéloperoxydase (MPO) (El Kebir et al., 2009).

1.3.2.1.1.3. Exigences posologiques pour un effet anti-thrombotique et/ou anti inflammatoire

L'acétylation de la COX-1 plaquettaire est un processus saturable et permanent pendant toute la durée de vie des plaquettes et ne peuvent pas synthétiser de nouvelles enzymes en raison d'absence de noyau, cela permet l'utilisation d'ASA à faible dose pour un effet antiplaquettaire sélectif (Patrignani et al., 2014). De plus, l'ASA est un inhibiteur plus puissant d'environ 150 à 200 fois de l'isoforme constitutive COX-1 plaquettaire que l'isoforme inducible COX-2 qui est exprimée par les cytokines, les stimuli inflammatoires et certains autres facteurs de croissance. Cela explique les différentes exigences posologiques de l'ASA en tant qu'anti-thrombotique (COX-1) et anti-inflammatoire (COX-2) (Schrör, 1997) (**Figure 11**).

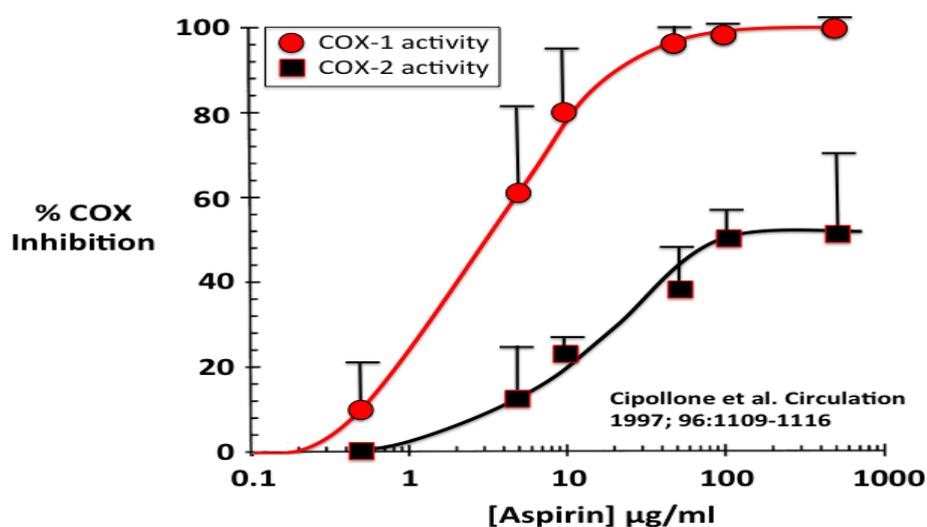


Figure 11. Inhibition de COX-1 plaquettaire vs COX-2 monocyttaire (Cipollone et al., 1997). Inhibition sélective de l'activité COX-1 plaquettaire par rapport à l'activité COX-2 monocyttaire mesurée *in vitro* après l'ajout d'aspirine à des échantillons de sang total prélevés sur des sujets humains sains. COX : cyclooxygénase.

L'ASA serait donc un AINS qui à fortes doses (1 g) pourrait exercer un effet anti-inflammatoire *via* l'inhibition de la COX et des voies de signalisation pro-inflammatoires dont le NF-κB (Morris et al., 2009) et qui à faibles doses (75 mg) pourrait exercer un effet anti-thrombotique et une action cardioprotectrice et ce forcément par l'inhibition irréversible de la

Chapitre 1. Revue de la littérature

COX-1 plaquettaire et la production de thromboxane A2 considérés comme de puissants promoteurs de l'agrégation plaquettaire (Hennekens et al., 2006).

En revanche, une étude ultérieure a montré que la prise journalière pendant 10 jours de l'ASA à faibles doses (75 mg au même titre que celles prescrites pour un effet cardio-protecteur) par des individus avec une inflammation aiguë provoquée pouvait réduire les réponses immunitaires innées *via* la 15-épi-lipoxine A4 générée suite à l'acétylation de la COX-2. Ces lipoxines auraient empêché l'accumulation des leucocytes et des Mφs indépendamment de l'expression génique régulée par le NF-κB aux sites de lésion tissulaire, probablement en déclenchant le NO antiadhésif atténuant ainsi l'interaction leucocytes/cellules endothéliales et la migration des leucocytes extravasculaires subséquente (Morris et al., 2009).

1.3.2.2. Propriétés indépendantes des cyclooxygénases : Inhibition de NF-κB

Les protéines NF-κB sont des activateurs transcriptionnels présents dans la cellule sous forme d'homo ou d'hétérodimères. Cette famille compte cinq protéines : p50 (NF-κB1), p52 (NF-κB2), p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105 et p100 sont les précurseurs respectifs de p50 et p52. Le dimère transactivateur le plus répondu est le p50/p65 (Sun et al., 2013).

Le dimère NF-κB régule de multiples aspects des fonctions immunitaires innées et adaptatives et sert de médiateur pivot des réponses inflammatoires (Oeckinghaus and Ghosh, 2009). Il existe sous une forme inactive dans le cytoplasme de la plupart des cellules où il est lié à une protéine inhibitrice de la famille IκB, cette famille de protéines comprend cinq membres : IκBα, IκBβ, IκBε, et les précurseurs p105 et p100 qui ont donc une double fonction (Sun, 2011). Le NF-κB est activé en réponse à un certain nombre de stimuli ce qui provoque la phosphorylation des protéines IκB par un complexe kinase composé de trois sous-unités : deux sous-unités catalytiques à activité sérine/thréonine kinase (IKKα et IKKβ) et une sous-unité régulatrice nommée NF-κB essential modulator (NEMO)/IKKγ. Cette phosphorylation conduit à l'ubiquitinylation des IκB puis leur dégradation par le protéasome 26S et permet la translocation de NF-κB du cytoplasme vers le noyau où il se lie à l'ADN et régule la transcription de gènes spécifiques (Lobry and Weil, 2007). La plupart de ces gènes sont connus pour être impliqués dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Il s'agit notamment de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8 et TNF-α et les molécules d'adhésion cellulaire telles que VCAM-1 et ICAM-1 (Liu et al., 2017a).

L'activation de NF-κB implique deux voies de signalisation principales ; les voies canoniques et non canoniques (ou alternatives) (Lawrence, 2009). La voie dite canonique induite par les signaux classiques tels que le TNFα, l'IL-1, lipopolysaccharide bactérien (LPS), le récepteur des lymphocytes T et B implique NEMO et les kinases IKKα et IKKβ et aboutit à

Chapitre 1. Revue de la littérature

la dégradation complète des inhibiteurs I κ B libérant des dimères de type p50/p65 et p50/c-Rel. La voie alterne induite par des molécules comme la lymphotoxine β , B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF) et le ligand de CD40 implique les protéines kinases Nck interacting kinase (NIK) et IKK α et conduit à la dégradation partielle du précurseur p100 libérant ainsi des dimères de type p52/RelB et p52/RelA (Liu et al., 2017a; Lobry and Weil, 2007).

Les agents anti-inflammatoires comme l'ASA et les salicylates de sodium inhibent spécifiquement l'activité *in vitro* et *in vivo* d'IKK β . Le mécanisme d'inhibition de l'ASA et des salicylates de sodium est dû à la liaison de ces agents à l'IKK β pour réduire la liaison de l'ATP sous un phénomène de compétition. Cela empêche la phosphorylation et/ou la protéolyse d'I κ β et empêche par la suite l'activation par NF- κ B des gènes impliqués dans la pathogenèse de la réponse inflammatoire (Kopp and Ghosh, 1994; Yin et al., 1998).

1.3.2.3. Propriétés anti-oxydantes

L'ASA peut exercer ses propriétés anti-oxydantes par diverses voies :

- ❖ En l'utilisant comme piège chimique pour le radical hydroxyle considéré comme le plus sévère des ROS pour réduire les dommages tissulaires causés par l'hypoxie/réoxygénation (Colantoni et al., 1998).
- ❖ En éliminant les radicaux libres pour protéger l'intégrité de la paroi vasculaire et protéger les cellules endothéliales contre les effets délétères du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Aruoma and Halliwell, 1988; Podhaisky et al., 1997; Woollard et al., 1990).
- ❖ En protégeant les particules lipidiques contre la peroxydation (Steer et al., 1997; Wu et al., 2002).
- ❖ En stimulant l'expression ainsi que l'activité enzymatique de la protéine de défense anti-oxydante hème oxygenase (HO)-1 dans les cellules endothéliales. Une expression accrue de HO-1 entraîne une dégradation de l'hème et une accumulation de fer, de bilirubine et de monoxyde de carbone (CO), suivie d'une sensibilité réduite des tissus aux dommages. Parmi ces métabolites, la bilirubine agit comme un antioxydant direct tandis que le CO peut exercer des effets vasodilatateurs et antiplaquettaires expliquant les actions anti-oxydantes et anti-athérogéniques spécifiques de l'ASA (Grosser et al., 2003).

1.3.2.4. Propriétés anti-pyrétiques

L'inflammation entraîne la production de pyrogènes endogènes tels que l'interleukine-1 β et viennent au contact de l'hypothalamus, sans même pénétrer dans le système nerveux central, ils activent les cellules endothéliales des organes circonvolutés et produisent par la suite de grandes concentrations de PGE₂ (Lawrence, 1998).

Chapitre 1. Revue de la littérature

Les PGE₂ pénètrent dans l'hypothalamus et activent les cellules hypothalamiques en se fixant sur leurs récepteurs spécifiques EP-3 (Ushikubi et al., 1998) induisant ainsi la production du neurotransmetteur adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et l'augmentation de la température par contraction involontaire des muscles et vasoconstriction périphérique pour limiter la déperdition de chaleur (Flier et al., 1994). L'action antipyrétique de l'ASA passe par l'inhibition de la production des PGs.

1.3.3. Effets immuno-modulateurs de l'aspirine sur les monocytes/macrophages

L'ASA peut inhiber les réponses immunitaires innées médiées par les MOs/Mφs et influencer par conséquent les réponses immunitaires adaptatives. Elle est connue pour ses effets anti-inflammatoires par son mécanisme d'action inhibiteur typique de la COX. De plus, d'autres de ses effets sont exercés *via* la biosynthèse de médiateurs lipidiques pro-résolvants ou ATLS mais aussi par des mécanismes COX-indépendants tels que l'inhibition de la voie de transcription NF-κB (Hussain et al., 2012).

Plusieurs études expérimentales *in vivo* et *in vitro* sur différents modèles expérimentaux ont apporté la preuve que l'ASA peut inhiber le recrutement tissulaire des MOs/Mφs en empêchant leur processus d'adhésion. En effet, il a démontré que l'ASA supprime l'expression des molécules d'adhésion induite par le TNF-α telles que VCAM-1 et les E sélectines à la surface des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine par l'inhibition de NF-κB (Weber et al., 1995). De même, l'adhérence *in vitro* des MOs humains aux cellules endothéliales de la veine saphène est réduite par un mécanisme NO-indépendant sous l'effet de l'ASA (Fricchione et al., 1998). D'autres études *in vitro* ont apporté la preuve que l'ASA peut également atténuer les interactions entre les cellules endothéliales et les leucocytes y compris les MOs/Mφs ce qui réduit leur migration extravasculaire et l'accumulation des Mφs. Ceci, néanmoins, s'est avéré être dû à un mécanisme antiadhésif déclenché par l'ASA et induit par les ATLS, au lieu de l'inhibition de NF-κB (Morris et al., 2009). L'ASA réduit aussi l'expression des molécules d'adhésion et par conséquent la capacité migratoire des MOs dans des conditions inflammatoires après ligature de l'artère fémorale de modèles animaux (Hoefler et al., 2005). Elle interfère également dans la chimiotaxie des MOs/Mφs où il a été rapporté une inhibition *in vitro* de 90% des mouvements des MOs par l'ASA (Voisard et al., 2001).

De nombreux mécanismes effecteurs de l'immunité innée induits par les MOs/Mφs sont provoqués *via* l'expression génétique d'une gamme diversifiée de cytokines et de chimiokines inflammatoires. L'ASA peut inhiber la production des cytokines dérivées des MOs/Mφs par leurs mécanismes COX-indépendants. Une étude expérimentale sur des Mφs murins stimulés au LPS a montré que l'ASA à des doses thérapeutiques entraîne une diminution de l'accumulation d'ARNm de TNF-α et la sécrétion de protéines subséquente (Shackelford et al.,

Chapitre 1. Revue de la littérature

1997). De plus, un certain nombre de gènes dans les Mφs sont régulés par la voie de NF-κB, parmi ces gènes figurent le facteur de stimulation des colonies granulocytes/Mφs (GM-CSF), MCP-1, IL-1, IL-6, FT et iNOS (Baeuerle and Henkel, 1994; Lowenstein et al., 1993; Xie et al., 1993, 1994). L'ASA peut agir comme un suppresseur à l'expression de ces gènes par inhibition de cette voie de transcription. Cette hypothèse a été confirmée par des études où l'ASA et les salicylates inhibaient la transcription du gène du FT et d'iNOS dans les MOs/Mφs (Aeberhard et al., 1995; Oeth and Mackman, 1995; Xie et al., 1994). L'ASA peut ainsi exercer certains de ses effets anti-inflammatoires à travers la suppression des médiateurs inflammatoires dérivés des MOs/Mφs. Aussi, la production du NO par les lignées cellulaires de Mφs murins stimulés par le LPS est fortement atténuée sous l'effet de l'ASA (Cho, 2007). De même, l'ASA peut diminuer l'expression du gène inductible de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) dans les Mφs péritonéaux de souris (Liu et al., 2017b). En plus de réguler négativement la production des cytokines, l'ASA peut également réduire l'immunogénicité des Mφs et donc la fonction de présentation de l'antigène en diminuant l'expression de la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)–II et les molécules de co-stimulation (Javeed et al., 2011). L'ASA peut aussi provoquer une suppression immunitaire innée en induisant l'apoptose des MOs (Schroecksadel et al., 2005). Pour finir, il a été démontré dans une étude in vivo que l'ASA diminue l'expansion des MOs CD14^{high}CD16⁺ dans des conditions pro-inflammatoires (Layne et al., 2016a) (**Figure 12**).

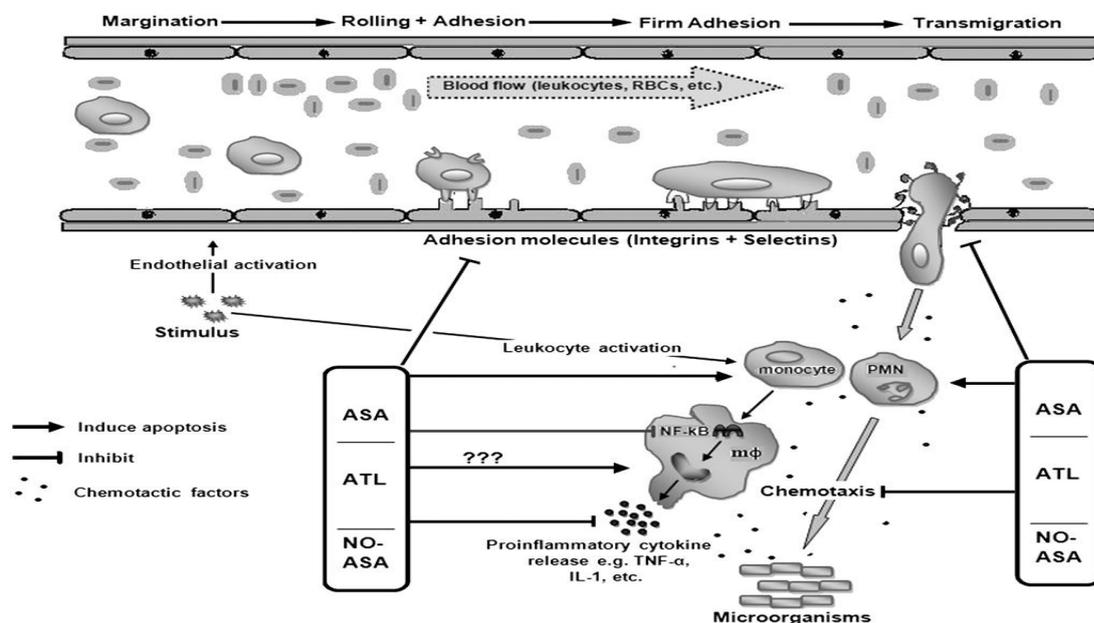


Figure 12. Aspects immunosuppresseurs de l'aspirine et de ses dérivés à différentes étapes de la réaction inflammatoire. L'ASA et ses dérivés peuvent entraver la cascade de recrutement des leucocytes en inhibant leur adhésion, leur transmigration et leur chimiotaxie ainsi que l'inhibition de la libération de cytokines pro-inflammatoires. L'ASA induit l'apoptose des PMN et des monocytes, mais son potentiel apoptotique contre les Mφs reste à élucider (???). Abréviations : ASA : aspirine, ATL : épi-lipoxines déclenchées par l'aspirine, Mφ : macrophages, PMN : neutrophiles.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.3.4. Aspirine et infarctus du myocarde

L'ASA à faible dose est largement utilisée comme moyen préventif primaire et secondaire contre les événements vasculaires notamment l'IDM. Cependant, les avantages et les bénéfices de son utilisation en prévention primaire sont moins établis qu'en prévention secondaire (Godley and Hernandez-Vila, 2016).

L'ASA inhibe irréversiblement la synthèse des TXs et persiste pendant toute la durée de vie des plaquettes (8 à 10 jour). Seulement 10% du pool plaquettaire est régénéré quotidiennement et donc malgré la courte demi-vie de l'ASA qui est de 15 à 20 minutes, l'ASA à faibles doses peut inhiber complètement la COX-1 plaquettaire lors d'une administration quotidienne répétée. L'inhibition de la biosynthèse des TXs et par conséquent l'agrégation plaquettaire est le principal mode d'action par lequel l'ASA prévient la thrombose vasculaire (Maree and Fitzgerald, 2007).

Cependant, l'ASA à faible doses pourrait également réguler négativement la production par les plaquettes activées des médiateurs pro-inflammatoires et pro-athérogènes tels que le ligand du CD40 soluble (sCD40L) *via* la génération des TXA₂ (Enomoto et al., 2010). De plus, l'acétylation non sélective de l'ASA peut toucher les protéines membranaires des plaquettes et ainsi altérer leur conformation et diminuer la fluidité membranaire (Winocour et al., 1992).

Il s'est ainsi révélé que dans l'IDM, l'ASA avait des effets bénéfiques majeurs sur la morbidité et la mortalité (Fuster et al., 1993, 1988), et de multiples méta-analyses ont confirmé le rôle central que l'ASA joue dans la réduction des événements cardiovasculaires et de la mortalité chez les patients qui y sont atteints (1994, 2009).

1.4. Problématique et objectifs

1.4.1. Problématique

L'IDM correspond à une complication aiguë d'une maladie coronarienne préexistante liée à l'athérosclérose. La réponse inflammatoire post-infarctus fait intervenir plusieurs effecteurs cellulaires du système immunitaire et plus particulièrement les MOs qui sont immédiatement recrutés au site infarcté à partir du sang périphérique. Ces cellules présentent une hétérogénéité remarquable et une plasticité fonctionnelle importante. Leur infiltration tissulaire est bi-phasique assurant ainsi la phagocytose des débris nécrotiques et le processus inflammatoire importants pour la résolution de l'inflammation et la cicatrisation.

D'un autre côté, plusieurs médicaments notamment l'ASA est connue pour son effet marqué pour établir des conditions anti-inflammatoires durant l'IDM. Son effet cardio-protecteur est probablement dû non seulement à ses propriétés anti-inflammatoires, mais aussi à son effet anti-thrombotique.

Chapitre 1. Revue de la littérature

1.4.2. Objectifs

Prenant en compte les deux axes cités ci-dessus, nous nous sommes assignés comme objectif d'évaluer l'effet de l'ASA sur les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des monocytes circulants juste après l'IDM.

1.4.3. But

Montrer que l'ASA pourrait d'une part immunomoduler l'expression du CD40 et les activités fonctionnelles des MOs et d'autre part favoriser leur basculement vers le phénotype « classique » au cours de l'IDM.

Chapitre 3. Résultats

2. Chapitre 2. Matériels et méthodes

2.1. Conception de l'étude et échantillons cellulaires

Les expériences de cette étude ont été réalisées sur des MOs prélevés chez des patients volontaires admis à l'hôpital pour un IDM avec élévation du segment ST (STEMI) et chez des contrôles sains qui correspondent aux patients dans l'âge et le genre. Au moment du prélèvement sanguin après l'IDM, les patients ne présentaient aucun changement dans le rythme nyctéméral et le nombre des agranulocytes notamment les MOs circulants. Les critères d'exclusion correspondaient essentiellement à la présence des troubles métaboliques particulièrement graves comme le diabète, d'autres maladies inflammatoires, les cancers ou l'insuffisance rénale ou hépatique. Tous les participants ont donné leur consentement éclairé par écrit et le protocole de l'étude a été approuvé par le comité d'éthique de l'université de Tlemcen.

Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMCs) ont été obtenues par centrifugation sur gradient de densité à partir du sang total. Ensuite, les MOs ont été isolés des PBMCs grâce à leur particularité d'adhérence au plastique. Les surnageants et les lysats de ces cellules ont été récupérés après leur stimulation au LPS en l'absence ou en présence de différentes doses d'ASA. Le taux de production de NO, d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-10 et d'IFN- γ ont été mesurés à partir des surnageants et les lysats ont été utilisés pour mesurer l'activité de l'arginase, la production d'H₂O₂ et le taux du glucose intracellulaire (i Glu), des ions de Ca²⁺ intracellulaire libre (i Ca²⁺) et la teneur totale du cholestérol cellulaire (t_{cc} CHOL). La phagocytose et la destruction bactérienne ont été mesurées sur une culture de MOs en présence de *Staphylococcus aureus* (S. aureus) et d'ASA. L'activité d' i NOS a été mesurée à partir du taux de production de NO et de la concentration relative des protéines totales. Les niveaux d'expression de CD14, CD16 et CD40 à la surface des MOs traités par l'ASA ont été évalués par immunofluorescence directe à l'aide de *Fluor Cell Imaging Station*. Chaque expérience a été répétée indépendamment au moins 4 fois. La conception de cette étude est résumée dans la **figure 13**.

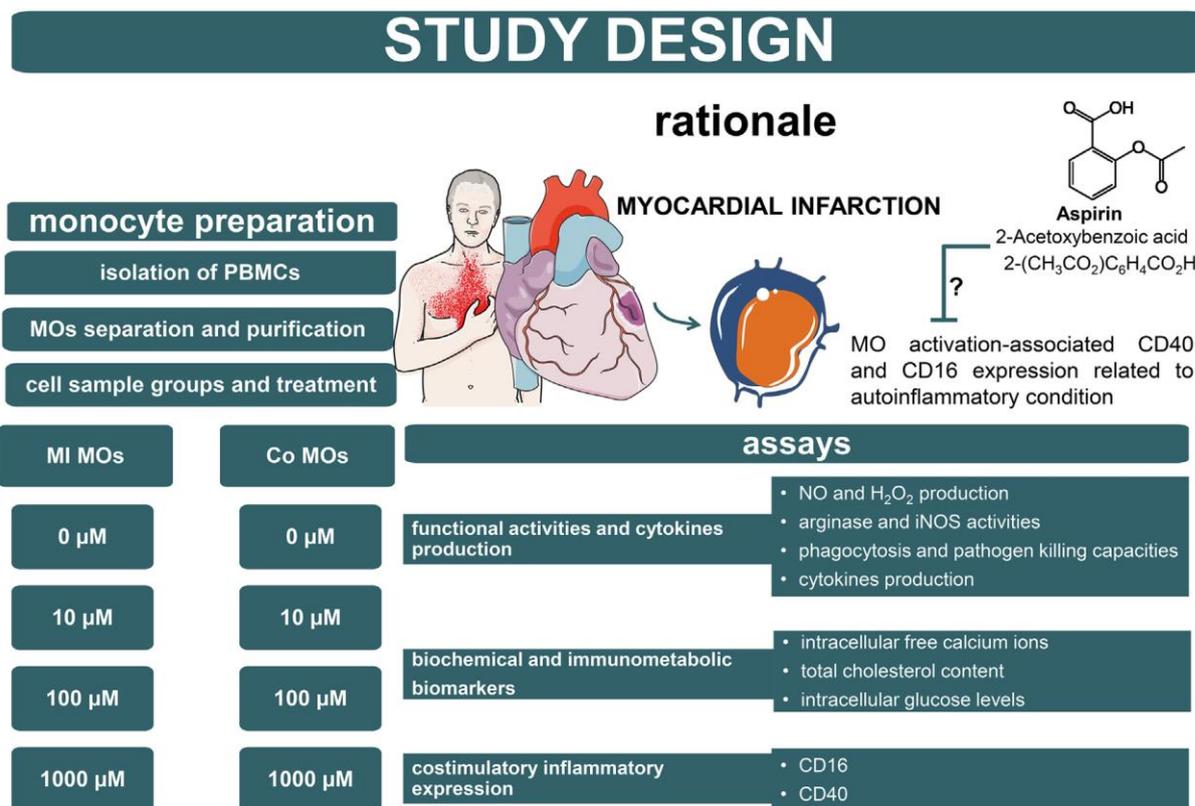


Figure 13. Organigramme de l'étude.

2.2. Isolement des monocytes et culture cellulaire

Afin d'isoler les PBMCs des patients présentant un STEMI et des contrôles sains, le sang périphérique a été prélevé dans des tubes contenant de l'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) - un anticoagulant -. Un diluât a été obtenu en mélangeant le sang recueilli avec un volume qui lui est égal de solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Le sang dilué est déposé délicatement sur un demi-volume d'histopaque (1,077 g ml⁻¹; Sigma-Aldrich, Munich, Allemagne) puis centrifugé à 400 x g pendant 30 minutes. Après centrifugation sur gradient de densité, les PBMCs se ressemblent en un anneau opaque surnageant au dessus de l'histopaque. Celui-ci peut être prélevé délicatement pour la quantification de la viabilité cellulaire évaluée par microscopie optique (Zeiss, Allemagne) à l'aide du test d'exclusion au bleu Trypan (TBET) (Strober, 2015).

Ensuite, ces PBMCs ont été mises en culture dans des plaques de 24 puits à fond plat dans le milieu RPMI 1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamycine et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF ou *FBS pour fetal bovine serum*) et incubées pendant deux heures à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ (Richardson and Fedoroff, 1997). Ce temps d'incubation est suffisant pour permettre aux MOs d'adhérer au plastique. Ainsi par cette particularité, les MOs ont pu

Chapitre 3. Résultats

être isolés et les cellules non adhérentes ont été éliminées (Wahl et al., 2005). La pureté des MOs dépassait les 90% et a été vérifiée avec *Fluor Cell Imaging Station* (Thermo Fisher Scientific, MA USA) en utilisant des anticorps de souris anti-CD14 humain couplés à la phycoérythrine (PE) (clone MEM-18, Sigma-Aldrich) (Pabst et al., 2008; Zhou et al., 2012).

2×10^5 de MOs adhérents ont été stimulés pendant 24 heures à 37 °C et 5% de CO₂ avec du LPS à raison de 10 ng/mL et traités simultanément avec différentes doses d'ASA : 0 μM, 10 μM, 100 μM et 1000 μM (Du et al., 2016). Enfin, les surnageants des cultures recueillis après incubation ont été conservés à -80 °C.

2.3. Lyse des monocytes

Afin de déterminer la concentration des protéines totales, le taux d'⁴⁵Ca²⁺, la tccCHOL, le taux d'³Glu et pour évaluer l'activité d'arginase, les MOs ont été lysés avec du Triton X-100 à 0,1% pendant 30 min. La réaction a été stoppée avec un mélange de Tris-HCl (25 mM, pH = 7,4) et MnCl₂ (5 mM) (Nouari et al., 2016).

2.4. Dosage des protéines totales

La concentration des protéines totales a été mesurée à partir des lysats cellulaires. En utilisant un kit commercial (Thermo Fisher Scientific Inc., Middletown, USA), les protéines présentes dans le lysat interagissent avec les ions cuivre pour former un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie à 540 nm.

2.5. Evaluation du burst oxydatif

Le burst oxydatif ou burst respiratoire a été estimé en mesurant le taux de production de NO et d'H₂O₂ au niveau des MOs (Aribi, 2018).

2.5.1. Dosage du monoxyde d'azote

Le taux de NO produit dans les surnageants des cultures de MOs a été déterminé après 24 heures d'incubation en mesurant l'accumulation des métabolites oxydatives (NO_x, nitrite et nitrate), par une réaction colorimétrique de Griess, en utilisant l'acide trichloracétique (TCA), chlorure de Vanadium (III) et le réactif de Griess, comme décrit précédemment (Aribi et al., 2015; Guevara et al., 1998).

L'Absorbance a été lue à 540 nm et la concentration de NO a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage ayant des concentrations allant de 0 à 150 μmol/L de nitrite de sodium (NaNO₂⁻).

Chapitre 3. Résultats

2.5.2. Dosage du peroxyde d'hydrogène

La production d' H_2O_2 a été quantifiée dans les lysats cellulaires à 610 nm par la méthode colorimétrique de Pick et Keisari (Pick and Keisari, 1980) modifiée ultérieurement (Aribi, 2018). Le test est basé sur l'oxydation du rouge phénol par l' H_2O_2 via la peroxydase.

Une solution tamponnée de rouge phénol (PRS) a été utilisée, celle-ci contient un tampon PAB pour *peroxide assay buffer* (5,0 mM K_2HPO_4 , 1,0 mM KH_2PO_4 , 140 mM NaCl, 0,5 mM glucose ajusté à pH 7,4), 0,28 mM (0,1 g/L) de rouge phénol et 8,5 U/L (50 μ g/mL) de peroxydase de raifort (HRPO, EC 1.11.1.7). La solution PRS a été préparée immédiatement avant la réalisation du test en ajoutant du rouge phénol et de l'HRPO à 2,1 mL de PAB à une concentration finale de 0,46 mM et 0,046 U/mL, respectivement. Les lysats cellulaires ont été ajoutés au mélange préparé avec un ratio de 1-4, puis incubés pendant 30 min à 37 °C (Pericone et al., 2000). Pour stopper la réaction, 10 μ L de NaOH avec une normalité de 1 ont été ajoutés. La quantité d' H_2O_2 produite a été quantifiée à partir d'une courbe standard préparée en utilisant des dilutions de 30% d' H_2O_2 .

2.6. Evaluation de l'activité d'iNOS

L'activité iNOS a été déterminée en normalisant chaque concentration de NO en milligrammes de protéines. Elle a été exprimée en nanomoles par milligramme de protéines par 30 min.

2.7. Evaluation de l'activité de l'arginase

L'activité de l'arginase a été mesurée en utilisant une technique spectrophotométrique basée sur la détermination de la production d'urée après l'ajout de L-arginine (Corraliza et al., 1994; Geyer and Dabich, 1971; Wynn et al., 2011). Brièvement, 50 μ L de solution d'arginine (0,5 M à pH 9,7) ont été ajoutés à un volume égal de lysats activés par la chaleur, le tout a été ensuite incubé à 37°C pendant 1 heure. Afin de stopper la réaction enzymatique, 400 μ L d'un mélange d'acides composé de 1 volume à 96% d' H_2SO_4 , 3 volumes à 85% d' H_3PO_4 et 7 volumes d'eau distillée ont été ajoutés (Zhang et al., 2013). La quantité d'urée générée par l'arginase a été quantifiée à 600 nm avec un kit commercial (UREA/BUN—COLOR, BioSystems, S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Espagne). Une unité d'activité d'arginase a été définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la formation de 1 μ mol d'urée/min.

2.8. Test de phagocytose et destruction bactérienne

Pour ce test, des souches de *S. aureus* (ATCC) 25923 ont été utilisées. Les bactéries ont été cultivées dans un bouillon BHIB pendant une nuit à 37 °C. La densité optique à 600 nm (OD600) a été ajustée à 1 correspondant à 10^9 CFU/mL.

Chapitre 3. Résultats

La phagocytose et la capacité bactéricide intracellulaire ont été évaluées comme décrit en détail (Aribi, 2018; Aribi et al., 2015). Les résultats de la phagocytose ont été déterminés en utilisant le pourcentage de diminution du nombre de bactéries extracellulaires viables et le pourcentage de destruction bactérienne intracellulaire a été calculé comme suit :

% destruction bactérienne = $100 \times \left(\frac{NW_{t0} - NW_{t1}}{NW_{t0}} \right)$ où N_{t0} et N_{t1} correspondent respectivement au nombre de bactéries intracellulaires viables à t_0 et t_1 .

2.9. Dosage du calcium intracellulaire libre

Le taux d' Ca^{2+} a été déterminé par spectrophotométrie. Le dosage s'appuie sur la méthode d'Ortho-crésol phtaléine complexon (OCP). En milieu alcalin, l'OCP réagit avec le Ca^{2+} pour former un complexe coloré dont l'absorbance est mesurée à 560 nm (Gitelman, 1967). La concentration d' Ca^{2+} a été exprimée en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines.

2.10. Dosage de la teneur totale du cholestérol cellulaire

La $_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ a été mesurée par spectrophotométrie à 500 nm sur des lysats cellulaires par réaction enzymatique (Luo et al., 2010; Song et al., 2013), en utilisant un kit commercial (BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelone, Espagne). La $_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ a été exprimée en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines.

2.11. Dosage du glucose intracellulaire

Les concentrations d' $_{\text{i}}\text{Glu}$ ont été évaluées par spectrophotométrie avec un kit commercial (BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelone, Espagne), selon les instructions du fabricant. Ce processus est basé sur l'oxydation du glucose en gluconate par l'enzyme glucose oxydase (GOD) et l' H_2O_2 produit a été détecté à 500 nm avec un accepteur chromogène d'oxygène, le phénol, la 4-aminophénazone (4-AP) en présence de peroxydase (POD). Les concentrations d' $_{\text{i}}\text{Glu}$ ont été exprimées en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de protéines.

2.12. Dosage des cytokines

Le taux de production de l'IL-1 β , de l'IL-6, de l'IL-10, du TNF- α et de l'IFN- γ au niveau des surnageants de cultures de MOs ont été évalués après 24 heures par une technique immuno-enzymatique ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) quantitative de type sandwich, selon les instructions préconisées par les kits commerciaux respectifs (BD Biosciences co., San Diego, USA). L'absorbance a été mesurée à 450 nm avec un lecteur de microplaques ELISA (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). Les limites de détection (LOD) étaient de 0,3 pg/mL pour l'IL-1 β , 1 pg/mL pour l'IL-6, l'IL-10 et le TNF- α et de 8 pg/mL pour l'IFN- γ .

Chapitre 3. Résultats

2.13. Imagerie cellulaire et tests d'immunofluorescence

Le taux d'expression du CD14, CD16 et CD40 sur les MOs activés par le LPS et l'IFN- γ ont été déterminés par immunofluorescence directe.

Pour cela, 2×10^5 de MOs stimulés avec 10 ng/mL de LPS et 10 ng/mL d'IFN- γ , en l'absence ou en présence des différentes doses d'ASA ont été mis en culture dans des *chamber slide* pendant 24 heures à 37 °C et 5% de CO₂. Après 24 heures d'incubation, les cellules ont été lavées 2 fois avec 200 μ L de PBS puis fixées avec 100 μ L de solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 15 minutes à température ambiante et ensuite bloquées avec du PBS contenant 5% de SVF pendant 1 heure. Les anticorps de souris anti-CD14 humain conjugué au PE (clone MEM-18 par Sigma-Aldrich), anti-CD16 humain couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (clone 3G8 par BD) et anti-CD40 humain conjugué au FITC (clone HI40a par Sigma Aldrich), dilués respectivement à 1: 750, 1: 200 et 1: 500 dans une solution de blocage ont été ajoutés à raison de 200 μ L chacun. La fluorescence a été visualisée et évaluée par le microscope à fluorescence *Fluoid Cell Imaging Station* et l'intensité de la fluorescence a été calculée en utilisant le logiciel ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) (Jackson and Krasnodembskaya, 2017; Schneider et al., 2012).

Pour ne pas confondre entre la fluorescence de l'anticorps anti-CD16 et de l'anticorps anti-CD40 - les deux couplés au FITC - et pour vérifier simultanément la pureté des MOs avec l'expression du CD14. Chaque culture de MOs a été analysée soit pour le CD14 et le CD16 en même temps soit pour le CD14 et le CD40 ensemble.

2.14. Analyses statistiques des données

Toutes les expériences ont été répétées au moins quatre fois. Les données ont été présentées sous forme de valeurs \pm erreur standard de la moyenne. Après vérification de la distribution des données et avec le logiciel SPSS software version 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), les analyses statistiques ont été effectuées avec un test non paramétrique de Mann-Whitney U et le test de Kruskal–Wallis avec des comparaisons par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni. Une valeur de p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Chapitre 3. Résultats

3. Chapitre 3. Résultats

Dans la présente étude, nous avons évalué l'effet *ex vivo* de l'ASA sur l'hétérogénéité fonctionnelle et phénotypiques des MOs en circulation après un IDM. Pour cela, les MOs des patients admis pour un IDM et des contrôles sains ont été stimulés au LPS et traités simultanément à différentes doses d'ASA pendant 24 heures.

3.1. Effet de l'aspirine sur la production du monoxyde d'azote et du peroxyde d'hydrogène

Le NO et l'H₂O₂ produits par les MOs ont été évalués en tant que biomarqueurs du burst respiratoire. Comme le montre la figure 14, en absence de traitement à l'ASA, la production de NO a été significativement supérieure dans les MOs d'IDM par rapport aux MOs des contrôles ($p = 0,01$ par le test de Mann-Whitney U). Dans les MOs d'IDM, le traitement par l'ASA à 10 μ M, 100 μ M et 1000 μ M a significativement diminué le taux de production de NO par rapport aux MOs non traités ($p = 0,010$, $p = 0,005$ et $p = 0,016$ par le test de Mann-Whitney U, respectivement). En revanche, aucune différence significative n'a été révélée dans la production de NO dans les MOs des contrôles.

La valeur de p était de 0,003 en utilisant le test de Kruskal-Wallis pour les MOs d'IDM. Enfin, il n'y a pas d'effet significatif de l'ASA sur la production d'H₂O₂ par les MOs des patients avec IDM et des contrôles.

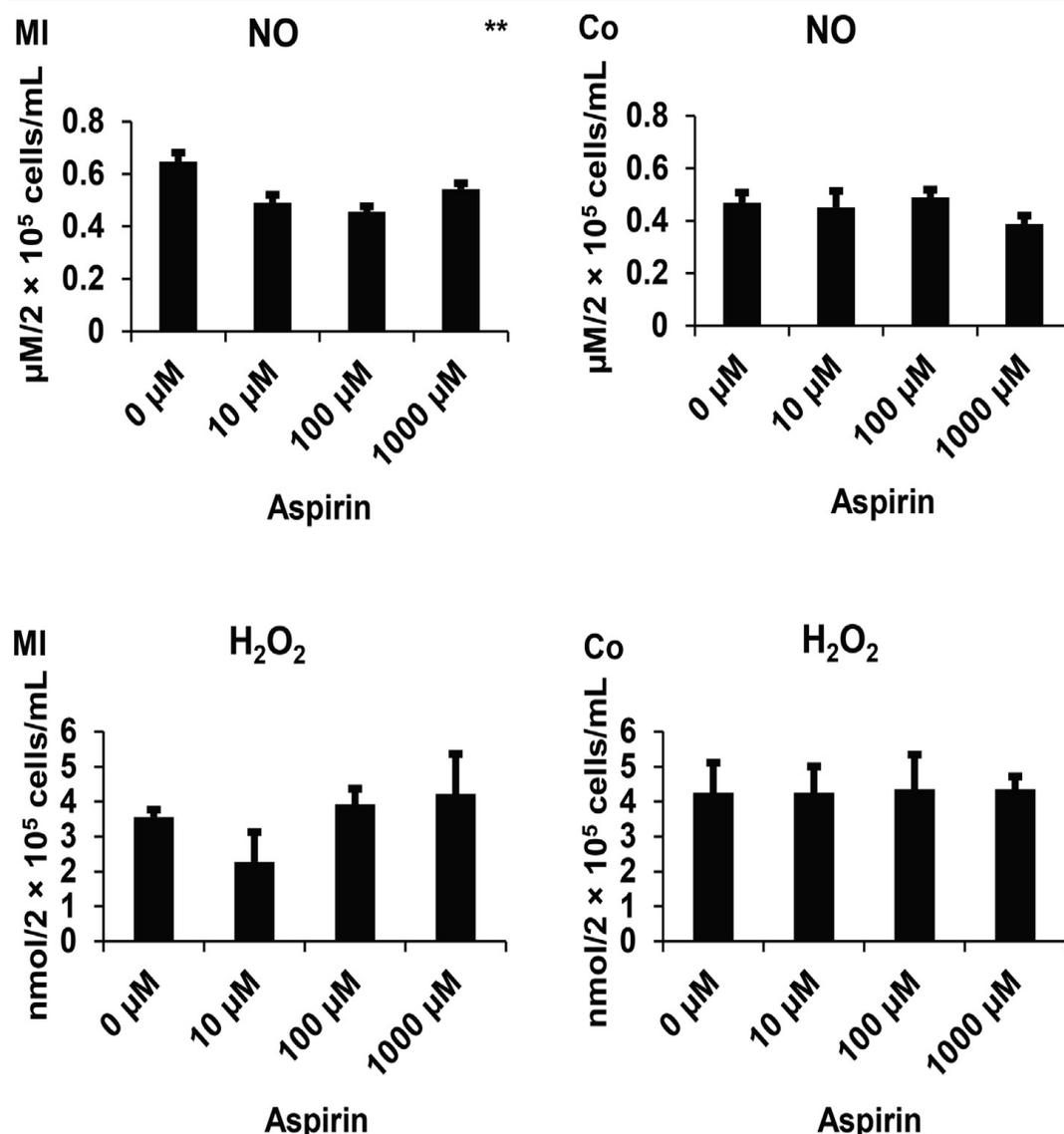


Figure 14. Effet de l'aspirine sur la production du monoxyde d'azote et du peroxyde d'hydrogène par les monocytes des patients présentant un infarctus du myocarde et des contrôles sains. Les astérisques représentent des différences significatives : ** $p < 0,01$ par le test de Kruskal–Wallis avec des comparaisons par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs \pm erreur standard de la moyenne (SEM) de six expériences indépendantes réalisées dans chaque groupe de trois patients avec infarctus du myocarde et 3 contrôles sains ($n = 18/\text{groupe}$). Co : contrôles, H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène, MI : infarctus du myocarde, MOs : monocytes NO : oxyde nitrique.

3.2. Effet de l'aspirine sur les activités d'iNOS et d'arginase

D'après les résultats présentés dans la figure 15, en absence de traitement à l'ASA, l'activité d'iNOS dans les MOs des patients avec IDM était supérieure à celle des MOs des contrôles ($p < 0,01$ par le test de Mann-Whitney U). De plus, le traitement par l'ASA à 1 000 µM a significativement diminué l'activité d'iNOS par rapport aux MOs d'IDM non traités ($p = 0,004$ par le test de Mann-Whitney U). Aussi, une augmentation significative a été observée dans l'activité de l'arginase entre les MOs d'IDM non traités par l'ASA et les MOs traités à 100

Chapitre 3. Résultats

μM ($p = 0,016$ par le test de Mann-Whitney U). Pour les activités d'iNOS et d'arginase, la différence n'était pas statistiquement significative dans les MOs des contrôles.

Avec le test de Kruskal-Wallis, la valeur de p était inférieure à 0,01 pour les activités d'arginase et d'iNOS des MOs d'IDM.

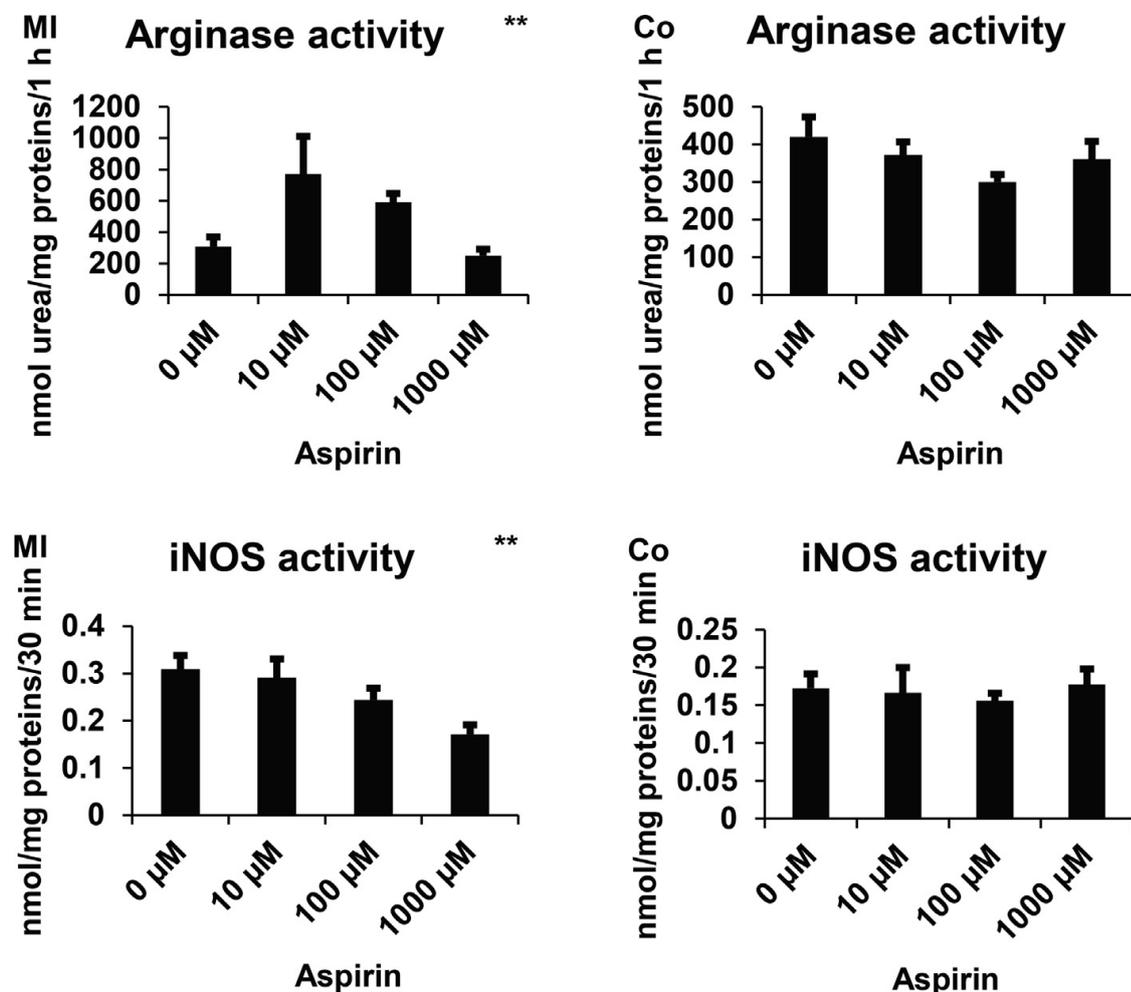


Figure 15. Effet de l'aspirine sur les activités d'arginase et d'iNOS des monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains. Les astérisques indiquent des différences significatives : ** $p < 0,01$ par le test de Kruskal-Wallis avec des comparaisons par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs \pm erreur standard de la moyenne (SEM) de six expériences indépendantes réalisées dans chaque groupe de trois patients avec infarctus du myocarde et trois contrôles sains ($n = 18/\text{groupe}$). Co: contrôles, iNOS: oxyde nitrique inducible synthase, MI: infarctus du myocarde, MOs: monocytes.

3.3. Effet de l'aspirine sur la capacité phagocytaire et la destruction bactérienne

Les résultats de la figure 16 ont montré qu'en absence de traitement à l'ASA, la capacité phagocytaire était significativement supérieure dans les MOs des patients avec IDM que dans les MOs des contrôles ($p = 0,019$ par le test de Mann-Whitney U). De plus, le traitement par l'ASA a induit une augmentation significative de la capacité phagocytaire à la

Chapitre 3. Résultats

fois dans les MOs d'IDM et des contrôles (pour toutes les comparaisons avec les MOs non traités par l'ASA, $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U).

Aussi, le potentiel de destruction des agents pathogènes a augmenté dans les MOs d'IDM de manière significative et progressive avec l'augmentation des doses de l'ASA, c'est-à-dire de 10 μM à 1000 μM (pour toutes les comparaisons avec les MOs d'IDM non traités par l'ASA, $p = 0,02$ par le test Mann-Whitney U). Par contre, dans les MOs des contrôles, le traitement par l'ASA à 10 μM et 100 μM a significativement diminué la capacité de destruction des agents pathogènes par rapport aux MOs non traités ($p < 0,05$ par le test Mann-Whitney U), cette activité a légèrement diminué à la dose de 1000 μM , mais la différence n'a pas atteint un niveau significatif ($p > 0,05$ par le test Mann-Whitney U).

Pour la capacité phagocytaire et la destruction bactérienne dans les MOs d'IDM et des contrôles, le test de Kruskal-Wallis a donné une valeur de p inférieure à 0,01.

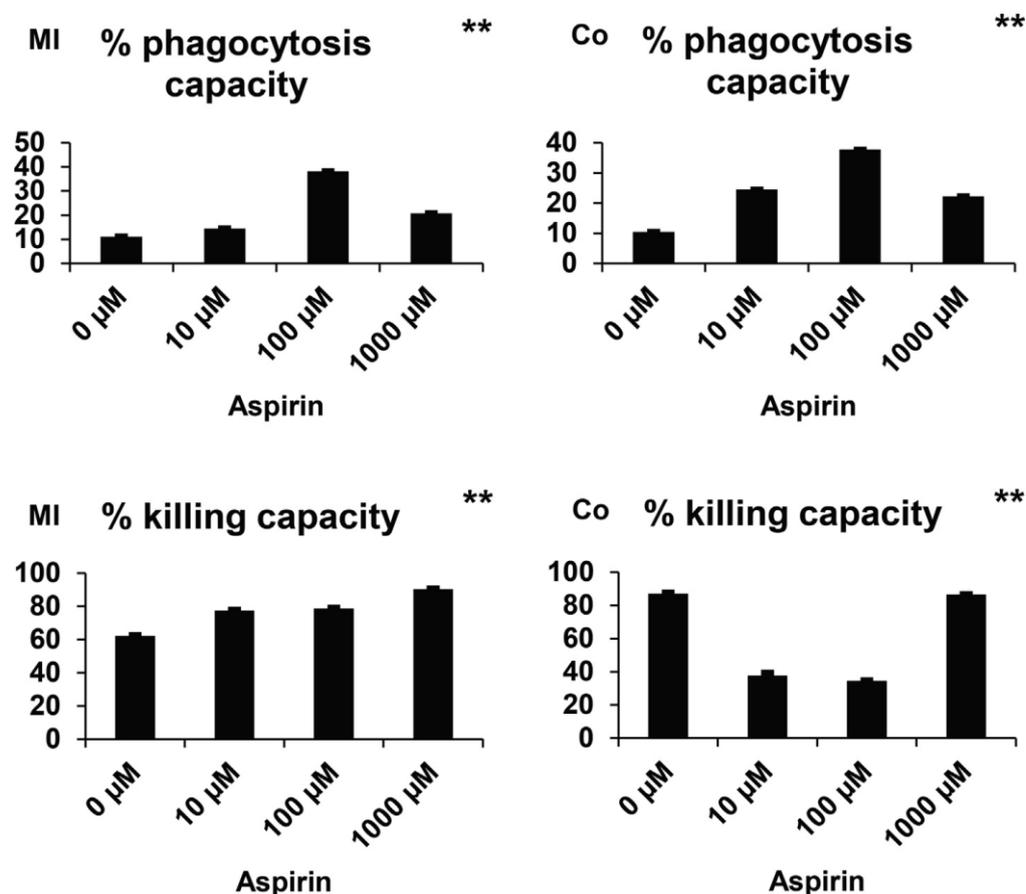


Figure 16. Effet de l'aspirine sur la capacité phagocytaire et bactéricide des MOs des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains. Les astérisques indiquent des différences significatives : ** $p < 0,01$ par le test de Kruskal–Wallis avec comparaisons par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs \pm erreur standard de la moyenne (SEM) de quatre expériences indépendantes réalisées dans chaque groupe de trois patients avec infarctus du myocarde et trois contrôles sains ($n = 12/\text{groupe}$). Co: contrôles, MI: infarctus du myocarde, MOs : monocytes.

Chapitre 3. Résultats

3.4. Effet de l'aspirine sur le taux de calcium intracellulaire

La figure 17 montre que dans les MOs d'IDM, l'ASA à la dose de 100 μM a induit une augmentation significative du taux d' $_{\text{if}}\text{Ca}^{2+}$ (en comparaison avec les MOs non traités par l'ASA, $p = 0,036$ par le test de Mann-Whitney U). Cependant, la plus petite et la plus grande dose d'ASA ne semblent pas avoir de changements dans le taux d' $_{\text{if}}\text{Ca}^{2+}$ ($p > 0,05$ par le test Mann-Whitney U). Par conséquent, l'effet de l'ASA sur l' $_{\text{if}}\text{Ca}^{2+}$ semble être dose-dépendant. De plus, il n'y avait pas de différence significative dans le taux d' $_{\text{if}}\text{Ca}^{2+}$ dans les MOs des contrôles.

Pour toutes les comparaisons en utilisant le test de Kruskal-Wallis, la valeur de p était inférieure à 0,05 pour les MOs d'IDM.

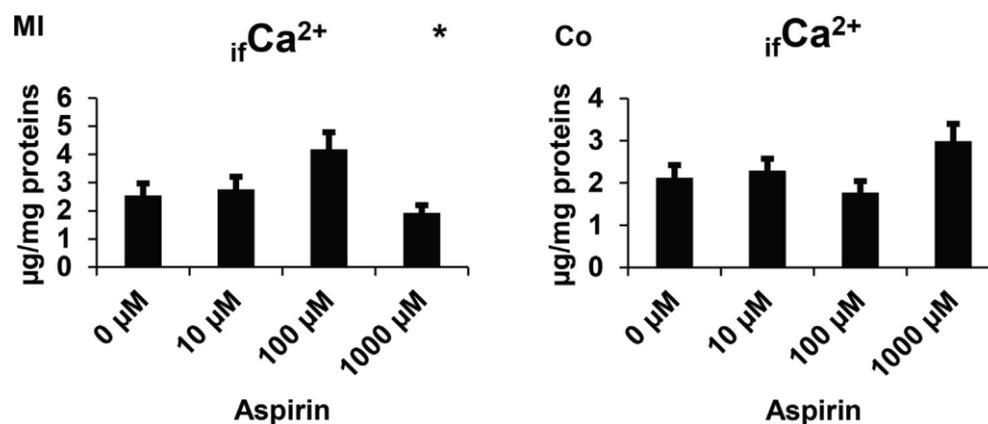


Figure 17. Effet de l'aspirine sur le taux du calcium intracellulaire des monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains. Les astérisques indiquent des différences significatives : * $p < 0,05$ par le test de Kruskal–Wallis avec comparaisons par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs \pm erreur standard de la moyenne (SEM) de six expériences indépendantes réalisées dans chaque groupe de trois patients avec infarctus du myocarde et trois contrôles sains ($n = 18/\text{groupe}$). Co: contrôles, $_{\text{if}}\text{Ca}^{2+}$: ions de calcium intracellulaire libre, MI: infarctus du myocarde, MOs: monocytes.

3.5. Effet de l'aspirine sur la teneur totale du cholestérol intracellulaire

Nous voyons sur la figure 18 qu'en absence de traitement à l'ASA, la $_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ a été significativement supérieure dans les MOs d'IDM par rapport aux MOs des contrôles ($p < 0,01$ par le test de Mann-Whitney U). De plus dans les MOs d'IDM, l'ASA a progressivement augmenté la $_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ et la différence était significative à la dose de 1000 μM par rapport aux MOs non traités ($p < 0,01$ par le test de Mann-Whitney U). Par ailleurs dans les MOs des contrôles, le traitement par l'ASA à la dose de 100 μM a entraîné une diminution significative de la $_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ par rapport aux MOs non traités ($p = 0,037$ par le test Mann-Whitney U).

Pour toute comparaison en utilisant le test de Kruskal-Wallis, les valeurs de p étaient inférieures à 0,01 et 0,05 pour les MOs de l'IDM et des contrôles, respectivement.

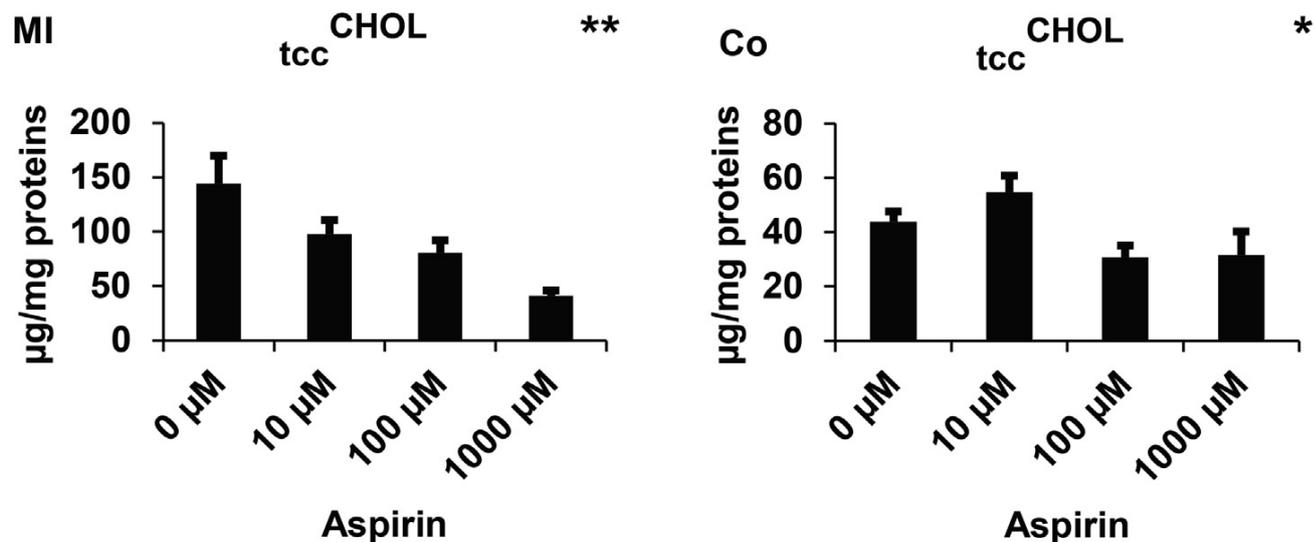


Figure 18. Effet de l'aspirine sur la teneur totale du cholestérol intracellulaire des monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains. Les astérisques indiquent des différences significatives : * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par le test de Kruskal–Wallis avec comparaisons par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs \pm erreur standard de la moyenne (SEM) de six expériences indépendantes réalisées dans chaque groupe de trois patients avec infarctus du myocarde et trois contrôles sains ($n = 18/\text{groupe}$). Co: contrôles, MI: infarctus du myocarde, MOs: monocytes, tccCHOL : teneur totale du cholestérol intracellulaire.

3.6. Effet de l'aspirine sur le taux du glucose intracellulaire

Comme le montre la figure 19, en absence de traitement à l'ASA, l' i Glu était supérieur dans les MOs d'IDM par rapport aux MOs des contrôles ($p = 0,01$ par le test de Mann-Whitney U). De plus dans les MOs d'IDM et des contrôles, aucun changement significatif n'a été révélé entre les MOs non traités et les MOs traités par l'ASA à 10 μM et 100 μM . Cependant, la dose de 1000 μM a induit une diminution significative du taux d' i Glu dans les MOs de l'IDM et une augmentation significative dans les MOs des contrôles par rapport aux MOs non traitées ($p < 0,01$ et $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U pour les MOs d'IDM et des contrôles, respectivement).

En utilisant le test de Kruskal-Wallis, la valeur de p était inférieure à 0,05 pour les deux groupes.

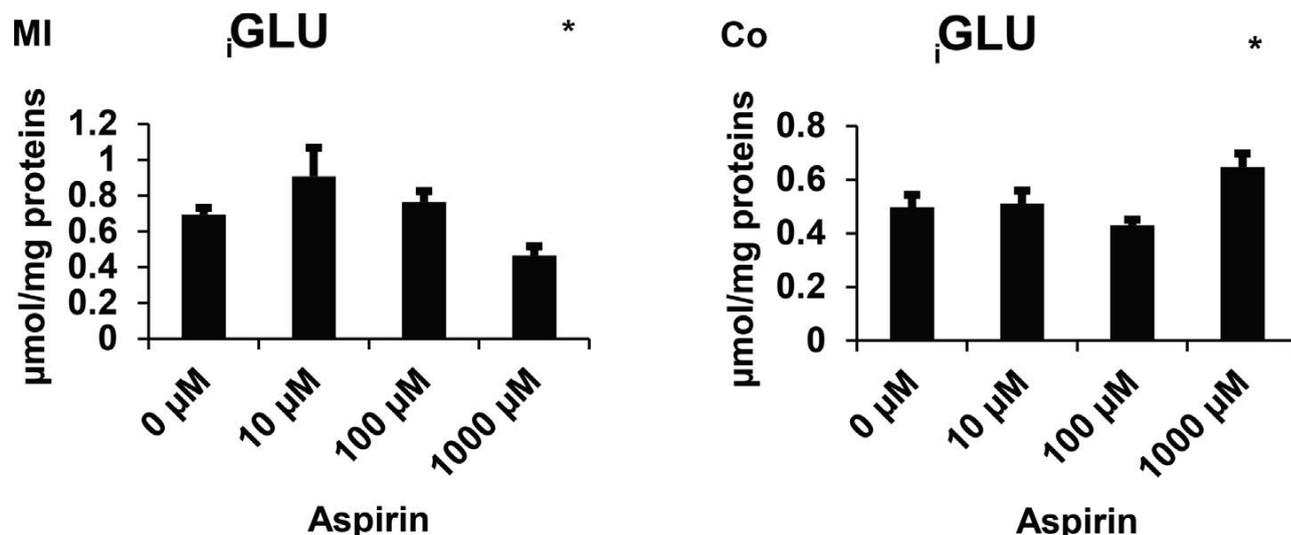


Figure 19. Effet de l'aspirine sur le taux du glucose intracellulaire des monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains. Les astérisques indiquent des différences significatives : * $p < 0,05$ par le test de Kruskal–Wallis avec comparaisons par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs \pm erreur standard de la moyenne (SEM) de cinq expériences indépendantes réalisées dans chaque groupe de trois patients avec infarctus du myocarde et trois contrôles sains ($n = 15/\text{groupe}$). Co : contrôles, iGLU : glucose intracellulaire, MI: infarctus du myocarde, MOs: monocytes.

3.7. Effet de l'aspirine sur la production des cytokines pro- et anti-inflammatoires

Les résultats de la figure 20 ont montré qu'en absence de traitement à l'ASA, le taux de production d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α étaient significativement supérieurs dans les MOs d'IDM par rapport aux MOs des contrôles ($p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). Néanmoins, la différence entre les taux d'IFN- γ produits par les MOs d'IDM et des contrôles n'était pas significative ($p > 0,05$ par le test de Mann-Whitney U).

- ❖ **IL-1 β** : Le traitement des MOs d'IDM avec 100 μM d'ASA a induit une diminution significative de la production d'IL-1 β par rapport aux MOs d'IDM non traités ($p = 0,02$ par le test de Mann-Whitney U). De même, le traitement à l'ASA des MOs des contrôles a diminué la production d'IL-1 β (pour toutes les comparaisons avec les MOs non traitées, $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U).
- ❖ **IL-6 et IFN- γ** : Dans les MOs d'IDM, le taux d'IL-6 et d'IFN- γ ont augmenté de manière significative à une faible concentration d'ASA (10 μM) et ont diminué à 1000 μM (pour toutes les comparaisons avec les MOs d'IDM non traités, $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). Dans les MOs des contrôles, toutes les concentrations d'ASA ont induit une augmentation significative de la production d'IL-6 ($p < 0,05$ par le test Mann-Whitney U). A l'inverse, l'IFN- γ a significativement diminué à 10 μM et 1000 μM d'ASA (en comparaison avec les MOs non traités, $p = 0,028$ pour 10 μM et $p = 0,026$ pour 1000 μM par le test de Mann-Whitney U).

Chapitre 3. Résultats

- ❖ **TNF- α** : Dans les MOs d'IDM, la production de TNF- α a augmenté de manière significative et progressive avec l'augmentation des doses d'ASA, c'est-à-dire de 10 μM à 1000 μM (pour toutes les comparaisons avec les MOs d'IDM non traités, $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). Dans les MOs des contrôles, la dose de 1000 μM d'ASA a induit une augmentation significative par rapport aux MOs non traités ($p = 0,02$ par le test Mann-Whitney U).
- ❖ **IL-10** : le taux de production d'IL-10 était significativement supérieur dans les MOs d'IDM que dans les MOs des contrôles ($p = 0,019$ par le test Mann-Whitney U). De plus, le traitement par l'ASA a induit une augmentation progressive de la production d'IL-10 dans les MOs d'IDM (pour toutes les comparaisons avec les MOs d'IDM non traités, $p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U). En revanche, aucune différence significative n'a été révélée dans les MOs des contrôles.

En utilisant le test de Kruskal-Wallis, les valeurs de p étaient inférieures à 0,01 pour l'ensemble des cytokines produites par les MOs d'IDM et pour l'IL-1 β des MOs des contrôles, et inférieures à 0,05 pour l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-6 produits par les MOs des contrôles.

Chapitre 3. Résultats

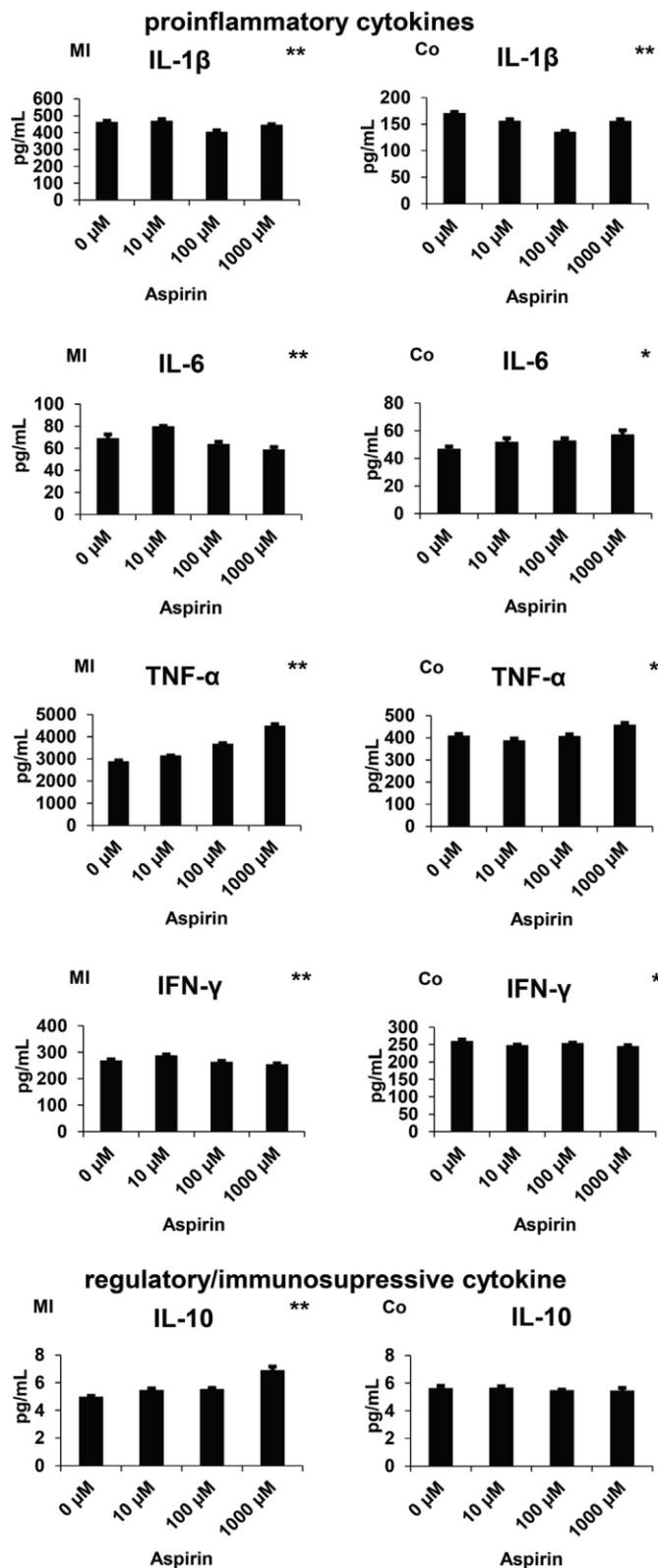


Figure 20. Effet de l'aspirine sur la production d'IL-1β, d'IL-6, d'IFN-γ, du TNF-α et d'IL-10 par les monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains. Les astérisques indiquent des différences significatives : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ par le test de Kruskal–Wallis avec comparaisons par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs \pm erreur standard de la moyenne (SEM) de quatre expériences indépendantes réalisées dans chaque groupe de trois patients avec infarctus du myocarde et trois contrôles sains ($n = 12$ /groupe). Co : contrôles, IFN-γ: interféron gamma, IL: interleukine, MI: infarctus du myocarde, MOs: monocytes TNF-α: tumor necrosis factor alpha.

Chapitre 3. Résultats

3.8. Effet de l'aspirine sur l'expression du CD16 et du CD40

Les résultats illustrés sur la figure 21 ont montré qu'en absence de traitement à l'ASA, l'expression du CD16 était significativement supérieure dans les MOs d'IDM que dans les MOs des contrôles ($p < 0,05$ par test Mann-Whitney U). Dans les MOs d'IDM, toutes les concentrations d'ASA ont induit une diminution significative de l'expression du CD16 par rapport aux MOs non traités (pour toutes les comparaisons, $p = 0,021$ par le test Mann-Whitney U). Tandis que dans les MOs des contrôles, l'expression du CD16 a augmenté à $10 \mu\text{M}$ d'ASA par rapport aux MOs non traités et inversement, a diminué à $100 \mu\text{M}$ et à $1000 \mu\text{M}$ d'ASA en comparaison avec les MOs traités à $10 \mu\text{M}$ d'ASA (pour toutes les comparaisons, $p = 0,021$ par test Mann-Whitney U).

D'un autre côté, en absence de traitement à l'ASA, l'expression du CD40 était significativement supérieure dans les MOs d'IDM que dans les MOs des contrôles ($p = 0,021$ par le test de Mann-Whitney U). De plus, le traitement des MOs d'IDM par l'ASA à $10 \mu\text{M}$ et $100 \mu\text{M}$ a significativement diminué l'expression du CD40 par rapport aux MOs non traités ($p < 0,05$ par le test de Mann-Whitney U).

En utilisant le test de Kruskal-Wallis, les valeurs de p étaient inférieures à $0,01$ pour l'expression du CD16 et du CD40 sur la surface des MOs d'IDM et des contrôles.

Chapitre 3. Résultats

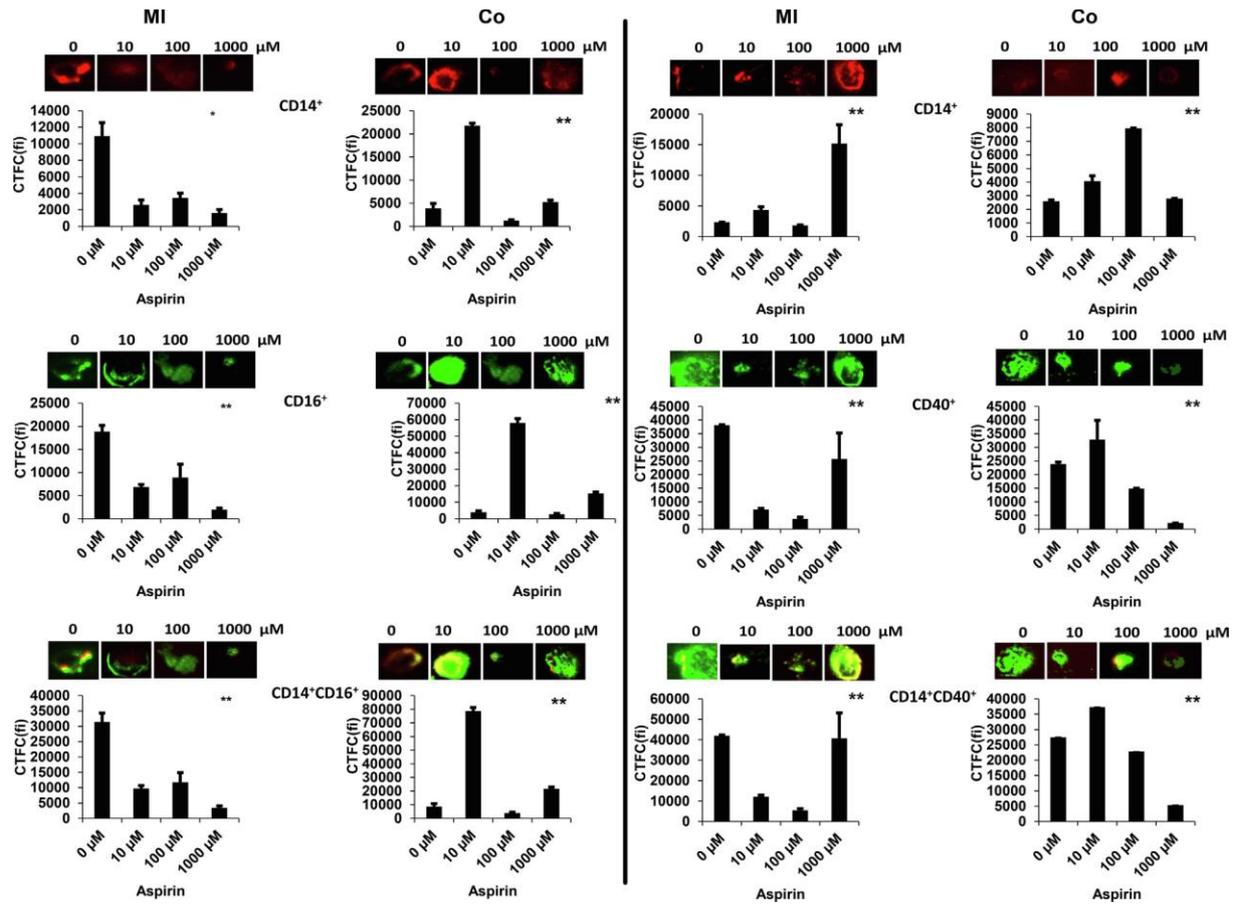


Figure 21. Effet de l'aspirine sur l'expression du CD16 et du CD40 et leurs co-expressions avec le CD14 à la surface des monocytes des patients avec infarctus du myocarde et des contrôles sains. Les astérisques indiquent des différences significatives : * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ par le test de Kruskal–Wallis avec comparaisons par paires en utilisant l'approche Dunn-Bonferroni. Les résultats sont présentés sous forme de valeurs \pm erreur standard de la moyenne (SEM) de quatre expériences indépendantes réalisées dans chaque groupe de trois patients avec infarctus du myocarde et trois contrôles sains ($n = 12/\text{groupe}$). CD14 : cluster de différenciation 14, CD16 : cluster de différenciation 16, CD40 : cluster de différenciation 40, Co : contrôles, CTFC : *corrected total cell fluorescence*, MI : infarctus du myocarde, MOs : monocytes.

Chapitre 4. Discussion

4. Chapitre 4. Discussion

L'implication des MOs dans divers maladies inflammatoire a été associée aux caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des différents sous-ensembles des MOs notamment les MOs intermédiaires et non classiques (Gómez-Olarte et al., 2019; Lacerte et al., 2016). De plus, il existe des indications expérimentales selon lesquelles ni la fonction ni la cinétique des sous-ensembles des MOs ne se chevauchent et cette réponse différentielle peut également être associée à l'état de santé (Tak et al., 2017). Il serait par conséquent d'un grand intérêt de déterminer cliniquement, à l'aide d'étude de cohortes, le niveau d'association de différents sous-types de MOs avec l'IDM avant même de vérifier l'existence ou non d'une relation de cause-à-effet. De plus, tout changement dans les activités des MOs après IDM pourraient considérablement induire une perturbation et un désordre immunitaires sévère notamment une inflammation excessive (Frangogiannis, 2014b).

Par conséquent, dans la présente étude, nous avons évalué les effets *ex vivo* de l'ASA sur l'immunomodulation des activités fonctionnelles et phénotypiques des MOs après l'IDM, compte tenu de son large spectre thérapeutique avec des effets anti-inflammatoires bien connus (Dai and Ge, 2012) et son utilisation comme agent de protection cardiovasculaire (Meek et al., 2010).

4.1. Effet de l'aspirine sur la production du monoxyde d'azote et du peroxyde d'hydrogène

Le NO produit par les MOs du sang périphérique joue un rôle crucial dans des conditions inflammatoires et dans la réponse contre les agents pathogènes grâce à propriété cytotoxique (Balaguer et al., 2017). Il a été rapporté que le NO produit à des concentrations physiologiques normales a des effets anti-inflammatoires et protecteurs en exerçant ses effets vasodilatateurs, antiagrégants et inhibiteurs de l'adhérence des leucocytes, mais à des taux plus élevés, il exerce un effet pro-inflammatoire, délétère et favorise les lésions athérosclérotiques pendant l'IDM (Kobayashi, 2010; Li et al., 2014a; Pong and Huang, 2015; Yasa and Türkseven, 2005). Nos résultats ont montré que l'ASA pouvait induire une diminution de la production du NO par les MOs des patients présentant un IDM. Sachant que le NO est considéré comme l'un des composants clés de la réponse inflammatoire, en particulier celui produit par iNOS (Medeiros et al., 2009), la diminution de sa biodisponibilité aurait sans aucun doute des effets athéroprotecteurs et anti-inflammatoires. Par conséquent, la diminution du NO libéré par les MOs serait l'une des principales voies cinétiques de l'ASA dans la modulation de l'inflammation.

De plus, à des concentrations physiologiques normales, l' H_2O_2 , l'une des formes les plus abondantes et les plus stables des ROS produites par NADPH oxydase est cruciale dans

Chapitre 4. Discussion

la voie de signalisation oxydative de l'homéostasie et de la viabilité des cellules et leur confère aussi une activité cytotoxique contre les bactéries et d'autres agents pathogènes (Zubko and Zubko, 2013). Alors que dans des conditions pathologiques telles que l'athérosclérose dans l'IDM, des taux excessifs d'H₂O₂ induisent non seulement un stress oxydatif (Loffredo et al., 2012) mais aussi une infiltration tissulaire des MOs et des Mφs (Lee et al., 2013), ainsi que leur transformation en cellules spumeuses après accumulation du cholestérol (Loffredo et al., 2012) contribuant de la sorte à l'aggravation et à la progression de l'inflammation (Legein et al., 2013). Par ailleurs, notre étude n'a apporté aucune différence significative dans la production d'H₂O₂ par les MOs d'IDM traités ou non par l'ASA.

4.2. Effet de l'aspirine sur les activités d'iNOS et d'arginase

La L-arginine est le substrat commun pour lequel les NOS synthases et les arginases entrent en compétition pour la métaboliser en NO et L-citrulline et en urée et L-ornithine respectivement. Il a été démontré qu'une diminution de production de NO était liée en partie à une augmentation de l'activité d'arginase et à une diminution de la biodisponibilité en substrat pour la synthèse du NO (Munder, 2009). La dichotomie fondamentale de ces deux voies enzymatiques NOS/Arginase impliquées dans le métabolisme de l'arginine par les MOs et les Mφs engendrent deux réponses immunitaires opposées ; la 1^{ère} est à l'origine de l'augmentation de l'inflammation et la 2^{ème} dans la réparation et le remodelage tissulaire (Rath et al., 2014).

L'arginase est considéré comme l'un des principaux médiateurs anti-inflammatoire chez les MOs (Najac et al., 2016). Plusieurs études ont démontré que l'arginase est fortement impliquée dans la réparation des tissus et de la matrice extracellulaire *via* la production de L-ornithine au cours de l'IDM. Etant donné que L-ornithine est le précurseur des polyamines et de L-proline, essentiels respectivement dans la prolifération cellulaire et la synthèse du collagène (Yang and Ming, 2014). Cependant, l'augmentation de l'activité de l'arginase et/ou la diminution de la production du NO peut être un bon marqueur pour vérifier l'efficacité de certains médicaments supposées avoir une propriété anti-inflammatoire. Ainsi, en plus de ses effets comme la diminution de la production du NO, les effets anti-inflammatoires de l'ASA sur les MOs d'IDM seraient également liés à ses effets comme régulateur positif de l'activité de l'arginase.

D'un autre côté, l'activité iNOS est également impliquée dans la réponse immunitaire. Elle est produite principalement dans les MOs et les Mφs et peut être induite par différents agents notamment les cytokines pro-inflammatoires (Yasa and Türkseven, 2005). L'activité iNOS se manifeste dans des états inflammatoires et produit de grandes quantités de NO qui sont 100 fois supérieures à la quantité produite par la NOS endothéliale (eNOS) (Knowles and

Chapitre 4. Discussion

Moncada, 1994). Qingping Feng et al. ont prouvé que l'iNOS est une enzyme alarmante et nocive au cours de l'IM, son expression et son activité sont amplifiées et entraînent une augmentation du taux de NO dans la circulation (Feng et al., 2001). De même, Toru Miyoshi et al. ont constaté que chez les souris déficientes en apolipoprotéine E, l'absence d'oxydation des LDL *via* iNOS réduisait la formation des lésions athérosclérotiques (Miyoshi et al., 2006). Parallèlement, Padmapriya Ponnuswamy et al. ont montré que l'inhibition génétique et pharmacologique de l'iNOS réduisait le développement de l'athérosclérose (Ponnuswamy et al., 2009). Un inhibiteur endogène de l'iNOS comme l'agmatine peut également réduire la progression de l'athérosclérose et le dysfonctionnement endothélial chez des lapins recevant un régime riche en cholestérol (El-Awady and Suddek, 2014). Aussi, Yitong Liu et al. ont découvert *in vivo* que l'ASA régule négativement l'expression d'iNOS induite par le LPS dans les Mφs pendant l'inflammation précoce (Liu et al., 2017b). Toutes ces études démontrent clairement l'implication de l'expression d'iNOS dans l'inflammation, la progression de l'IDM et sa diminution après le traitement par l'ASA. Ces conclusions corroborent avec nos résultats, qui ont démontré que l'activité d'iNOS était augmentée dans les MOs d'IDM non traités par l'ASA, et que le traitement à l'ASA a nettement diminué son activité.

4.3. Effet de l'aspirine sur la capacité phagocytaire et la destruction bactérienne

Nos résultats ont démontré qu'en absence de traitement à l'ASA, la capacité de phagocytose était plus forte dans les MOs d'IDM par rapport aux MOs des contrôles sains.

En concordance avec nos résultats, une étude précédente a démontré que la capacité de phagocytose et de destruction des MOs et des neutrophiles était plus élevée chez des patients présentant un IDM, même si l'étude ait été réalisée dans le contexte d'une infection par des particules de levure (Djurdjevic et al., 2001). De plus, nos résultats ont montré que le traitement par l'ASA améliore davantage la capacité de phagocytose et de destruction dans les MOs d'IDM, ce qui suggère que l'ASA soutient le maintien d'un profil de MOs classiques, sachant qu'un tel sous-type est caractérisé par une activité phagocytaire et une faible expression de la molécule CD16.

4.4. Effet de l'aspirine sur le taux du calcium intracellulaire

L' Ca^{2+} agit comme un second messenger pour les cellules immunitaires notamment les MOs, les Mφs, les cellules T, les cellules B, les mastocytes et les cellules NK. Il contrôle une variété de fonctions cellulaires telles que la sécrétion cellulaire, la transduction du signal, la transcription des gènes, la division et la différenciation cellulaire (Feske, 2007).

Dans notre étude, nous avons observé que l'ASA induisait une variation dose-dépendante du taux d' Ca^{2+} dans les MOs. L'augmentation des ions de calcium serait un bon indicateur de l'effet immunomodulateur de l'ASA sur les MOs avec son effet non seulement

Chapitre 4. Discussion

positif sur la capacité phagocytaire et bactéricide, comme indiqué ci-dessus, mais aussi négatif sur la production des cytokines pro-inflammatoires et du NO, ainsi que l'activité d'iNOS pendant l'IDM. Néanmoins, à notre connaissance, il n'existe pour l'instant aucune étude similaire qui nous permettrait de comparer nos résultats.

4.5. Effet de l'aspirine sur la teneur totale du cholestérol intracellulaire

L'accumulation du cholestérol dans la paroi artérielle est un inducteur précoce de l'IDM. Plusieurs études chez la souris et chez des patients hypercholestérolémiques ont démontré l'existence d'une relation entre les MOs chargés en cholestérol et l'athérosclérose (Fernandez-Ruiz et al., 2016; Mosig et al., 2008; Wu et al., 2009). D'un point de vue biochimique, le cholestérol est transformé d'un liquide à un état solide et forme des cristaux, qui déclenchent la réponse inflammatoire *via* l'inflammasome NLRP3 (Duewell et al., 2010b).

Nos résultats ont démontré qu'en absence de traitement à l'ASA, la $_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ dans les MOs d'IDM était supérieure à celle des MOs des contrôles, et le traitement à l'ASA diminuait la $_{\text{tcc}}\text{CHOL}$ dans les MOs d'IDM. Ces résultats peuvent s'expliquer par la particularité lipophile de l'ASA qui dissout les cristaux de cholestérol par un mécanisme de type «*Like dissolves like*». Par conséquent, le traitement avec l'ASA serait une bonne alternative thérapeutique pour l'atténuation du processus inflammatoire médiée par l'accumulation du cholestérol intracytosolique dans les MOs pendant l'IDM.

4.6. Effet de l'aspirine sur le taux du glucose intracellulaire

Le glucose est la principale source d'énergie pour les cellules (Jéquier, 1994). Il est transporté à l'intérieur des MOs à travers des transporteurs de glucose (GLUT) qui comprennent trois isoformes: GLUT1, GLUT2 et GLUT3 (Vrhovac Madunic et al., 2014). L'activation *in vitro* des MOs par le LPS ou la phytohémagglutinine (PHA) induit une augmentation de l'expression de GLUT1 fournissant ainsi la source d'énergie pour les besoins métaboliques (Fu, 2004; Maratou et al., 2007). Une étude récente a démontré que l'ASA pouvait moduler l'absorption du glucose en régulant négativement GLUT1 ce qui inhibe la prolifération des lignées cellulaires d'hépatome humain (Liu et al., 2019).

Nos résultats ont indiqué que l'ASA pouvait induire une diminution dose-dépendante du $_{\text{i}}\text{Glu}$ dans les MOs de l'IDM. À l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, qui est connue pour être impliquée dans le dysfonctionnement endothélial et par conséquent dans le déclenchement de l'IDM, nous pouvons ajouter l'effet de l'ASA sur la diminution de l'absorption du glucose par les MOs (Worthley et al., 2010).

Chapitre 4. Discussion

4.7. Effet de l'aspirine sur la production des cytokines pro-inflammatoires et des cytokines régulatrices ou immunosuppressives

Pendant l'IDM, les MOs exercent leurs effets en sécrétant plusieurs médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IFN- γ et le TNF- α (Nahrendorf et al., 2010). Ces cytokines jouent un rôle critique dans l'amplification de la réponse inflammatoire (Fang et al., 2015; Plaine et al., 2018), ce qui conduit à la progression de l'IDM et de l'insuffisance cardiaque (Fang et al., 2015). Cependant, cette réaction inflammatoire est contrebalancée par les cytokines anti-inflammatoires, dont l'IL-10 (Meng et al., 2018).

4.7.1. Effet de l'aspirine sur la production d'IL-1 β

Les MOs pro-inflammatoires sont l'une des sources principales d'IL-1 β (Saxena et al., 2013) dont la production est augmentée pendant l'IDM (Saxena et al., 2013; Slavic et al., 2018). De même, nos résultats ont aussi montré que le taux de production d'IL-1 β est supérieur dans les MOs d'IDM par rapport aux MOs des contrôles. L'IL-1 β est impliquée dans la progression de l'IDM (Chen et al., 2018) par l'amplification de la réponse inflammatoire (Van Tassell et al., 2013) et l'induction d'une leucocytose sanguine, qui est en corrélation inverse avec la survie des patients présentant un IDM (Sager et al., 2015). De plus, la signalisation IL-1 β participe au développement d'un remodelage indésirable après l'IDM (Bujak and Frangogiannis, 2009; Neri et al., 2015b). Plusieurs études ont démontré que l'inhibition de la production d'IL-1 β peut être une cible thérapeutique propice pour les patients souffrant d'IDM (Chen et al., 2018; Sager et al., 2015; Slavic et al., 2018; Toldo et al., 2017; Wu et al., 2018).

Nos résultats ont indiqué que le traitement par l'ASA à des doses de 100 μ M et 1000 μ M a régulé négativement la production d'IL1 β dans les MOs d'IDM. Il a récemment été rapporté que l'ASA réduisait la sécrétion d'IL-1 β par les M ϕ s murins dérivés de la moelle osseuse (BMDM), suggérant la confirmation de ces résultats à l'aide d'un modèle humain *in vitro* (Plaine et al., 2018). Ces résultats sont en accord avec les nôtres, néanmoins, la différence entre les modèles expérimentaux (murins vs humains) et le type cellulaire (M ϕ s vs MOs) ne permet pas de faire des comparaisons avec notre étude, ce qui nécessite plus d'investigations dans les MOs humains.

4.7.2. Effet de l'aspirine sur la production d'IL-6

L'IL-6 est une cytokine pro-inflammatoire associée à la pathogenèse de l'IDM (Iuchi et al., 2018). Elle induit la synthèse des protéines de la phase aiguë, considérée comme un indicateur de mauvais résultats pour les patients souffrant d'IDM (Gabriel et al., 2004). De plus, il a été démontré que l'inhibition de l'IL-6 a un effet préventif sur le développement de l'IDM (Iuchi et al., 2018; Kleveland et al., 2016, 2018). Des études cliniques ont montré que l'ASA utilisée seule (Ikonomidis et al., 1999) ou en combinaison avec d'autres médicaments

Chapitre 4. Discussion

antiplaquettaires (Yu et al., 2018), peut réduire la production d'IL-6 chez les patients atteints d'IM.

Nos résultats ont indiqué que l'ASA a induit une diminution dose-dépendante de la production d'IL-6, ce qui corrobore avec des résultats antérieurs obtenus à partir du sang humain et de Mφs de souris (Hartel et al., 2004; Raza et al., 2014).

4.7.3. Effet de l'aspirine sur la production d'IFN-γ

Il est bien connu que le taux d'IFN-γ est supérieur chez les patients présentant un IDM (Zhang et al., 2017). Ce médiateur pro-inflammatoire joue un rôle important dans de nombreuses pathologies cardiaques dont l'IDM (Levick and Goldspink, 2014). Il exerce ses effets délétères en favorisant la réponse inflammatoire (Fang et al., 2015), et conduit à la nécrose des myocytes cardiaques *via* la stimulation de la sécrétion du NO (Cheng et al., 2005; Keira et al., 2002).

Comme l'IL-6, nos résultats ont indiqué que l'ASA à dose-dépendante peut agir sur l'immunomodulation de la production d'IFN-γ. Ainsi, les effets de L'ASA sur la production des cytokines pro-inflammatoires notamment l'IFNγ, semblent être médiés par différents mécanismes en fonction de la concentration d'ASA. Bien qu'il ait été rapporté que de faibles doses d'ASA pouvaient stimuler la production des cytokines pro-inflammatoires (Hartel et al., 2004), il a été démontré par ailleurs que des doses plus élevées ont un effet opposé et peuvent inhiber l'activation du facteur de transcription NF-κB (Hartel et al., 2004; Yin et al., 1998).

4.7.4. Effet de l'aspirine sur la production du TNF-α

Notre étude a révélé que la production du TNF-α - une cytokine pro-inflammatoire - était nettement plus supérieure dans les cultures de MOs des patients présentant un IDM. Il a été rapporté que cette cytokine joue un rôle critique dans la pathogenèse de l'IDM en favorisant l'infiltration des neutrophiles dans la zone infarctée, la génération des substances toxiques telles que l'O₂⁻ et la perforine (Tian et al., 2015), et en induisant l'apoptose des cardiomyocytes (Haudek et al., 2007). Par conséquent, plusieurs études ont été menées pour explorer des médicaments efficaces ciblant le TNF-α afin de traiter l'IDM (Panahi et al., 2018; Somasuntharam et al., 2016).

Dans la présente étude, nous avons constaté que le taux du TNF-α était significativement augmenté dans les MOs des patients avec IDM et des contrôles. Les effets de l'ASA semblent être proches de ceux observés après l'inhibition de la PGE₂, entraînant une augmentation de la production du TNF-α, à la fois dans des études *in vivo* et *ex vivo*, effectuées sur des MOs humains stimulés par le LPS, mais dans des conditions autre que l'IDM (Page et al., 2010; Saha et al., 2014). De plus, il a été constaté qu'une faible dose d'ASA inhibe la biosynthèse de PGE₂ chez des volontaires sains (Boutaud et al., 2016). Contrairement à ces

Chapitre 4. Discussion

résultats, d'autres ont démontré qu'un tel effet n'était pas corrélé à l'inhibition de la PGE₂ dans les cellules dendritiques humaines (Ho, Deh-Ming Chang, Hen-Yih Shiao, 2001). Par conséquent, ces résultats contradictoires peuvent être dus essentiellement à la différence entre les modèles expérimentaux et les situations pathologiques étudiées, ainsi qu'à la différence des mécanismes et du mode d'action (MoA) de l'ASA selon le type cellulaire.

4.7.5. Effet de l'aspirine sur la production d'IL-10

L'IL-10 est une cytokine immuno-régulatrice et immunosuppressive puissante, dont les effets bénéfiques pour les patients avec un IDM ont déjà été rapportés (Krishnamurthy et al., 2009). Il a été démontré que l'augmentation du taux sérique d'IL-10 était en corrélation avec un bon pronostic au cours de l'IDM (Domínguez Rodríguez et al., 2005). Cette cytokine diminue l'inflammation du myocarde en supprimant la production des cytokines pro-inflammatoires (Krishnamurthy et al., 2009; Meng et al., 2018) et atténue la dysfonction ventriculaire gauche et le remodelage indésirable qui sont de puissants prédicteurs de morbidité et de mortalité chez les patients présentant un IDM (Jung et al., 2017; Krishnamurthy et al., 2009). De plus, il a été rapporté que l'IL-10 provenant de cellules mononucléaires de moelle osseuse transplantée contribue à la protection cardiaque après un IDM (Burchfield et al., 2008).

Bien qu'aucune étude n'ait été menée pour explorer l'effet de l'ASA sur la production d'IL-10 par les MOs pendant l'IDM. Les résultats de notre étude ont révélé que l'ASA a amélioré la production d'IL-10 par les MOs de l'IDM, ce qui peut être bénéfique pour les patients qui en souffrent. Par ailleurs, notre étude nécessite d'autres investigations sur les effets de l'ASA sur la production des cytokines dans les MOs humains ce qui nous permettra de faire des comparaisons, étant donné que toutes les autres études ont été réalisées dans des conditions différentes soit sur des modèles animaux, soit sur d'autres types cellulaires et échantillons, comme le sang périphérique ou le sérum. Le traitement par l'ASA peut donc induire des effets différents d'une cellule immunitaire à une autre (Eng et al., 2018), et les effets thérapeutiques évalués dans des échantillons de sérum ne reflètent pas nécessairement les effets des médicaments sur la production des cytokines au niveau cellulaire (Jason et al., 2001).

4.8 Effet de l'aspirine sur l'expression du CD16 et du CD40

Les MOs humains en circulation constituent une population de cellules hétérogènes et sont classées en fonction de l'expression relative des protéines de surface CD14 et CD16, à savoir les CD14^{high}CD16⁻ «classiques», CD14^{high}CD16⁺ «intermédiaires» et CD14^{low}CD16⁺⁺ «non classiques» (Guilliams et al., 2014). Il a été prouvé que les MOs CD14^{high}CD16⁺ prédisaient indépendamment les événements cardiovasculaires (Rogacev et al., 2012) et la relation entre leur expansion et la vulnérabilité de la plaque coronaire a été mise en évidence

Chapitre 4. Discussion

(Heine et al., 2008; Imanishi et al., 2010; Kashiwagi et al., 2010; Rogacev et al., 2011). De plus, la formation d'agrégats MOs–plaquettes (MPA) pendant l'IDM nécessite l'acquisition d'un profil CD16⁺ par les MOs circulants (Passacquale et al., 2011).

Notre étude a démontré qu'en absence de traitement à l'ASA, l'expression du CD16 était supérieure dans les MOs d'IDM par rapport aux MOs des contrôles et le traitement par l'ASA a significativement diminué son expression dans les MOs d'IDM et de contrôles. Nos résultats sont cohérents avec ceux d'une étude récente démontrant que la thérapie antiplaquettaire peut atténuer le développement d'un profil CD16⁺ par les MOs circulants dans des conditions pro-inflammatoires (Layne et al., 2016b). De plus, la liaison de la molécule co-stimulatrice CD40 des MOs au CD40L entraîne l'activation et la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α (Alderson, 1993; Kiener et al., 1995b; Stout and Suttles, 1996b), ainsi qu'une production de NO (Stout et al., 1996b; Tian et al., 1995b) et l'échappement à l'apoptose (Poe et al., 1997). L'implication directe du CD40 sur les MOs/M ϕ s pendant l'IDM est bien établie (Jansen et al., 2016). Conformément aux résultats antérieurs démontrant une augmentation de l'expression de CD40 chez les patients atteints d'athérosclérose et d'hypercholestérolémie modérée (Bruemmer et al., 2001; Garlich et al., 2001; Szabolcs et al., 2000), nous avons constaté que l'expression de CD40 induite par l'IFN- γ était augmentée dans les MOs d'IDM. Par ailleurs, le traitement à l'ASA a induit une diminution de l'expression du CD40 à la fois dans les MOs d'IDM et de contrôles.

Chapitre 5. Conclusions et perspectives

5. Chapitre 5. Conclusions et perspectives

L'IDM est une complication vasculaire due à l'athérosclérose, il implique une réponse inflammatoire caractérisée par une importante infiltration tissulaire des MOs à partir du sang périphérique. Ces cellules immunitaires dotées d'une large hétérogénéité fonctionnelle et phénotypique orchestrent la majorité des processus physiologiques post-IDM tels que la phagocytose des débris nécrotiques, la protéolyse, le remodelage et la régénération ventriculaire contribuant ainsi à l'initiation et à la résolution de l'inflammation.

Les travaux de cette thèse viennent souligner l'effet immunomodulateur de l'ASA sur les activités fonctionnelles des MOs. C'est ainsi que nous avons pu montrer qu'au cours de l'IDM, l'ASA pouvait induire le switch des MOs circulants vers un profil anti-inflammatoire en diminuant l'expression de la molécule co-stimulatrice CD40, l'activité d'iNOS et la production du NO et des cytokines pro-inflammatoires, d'une part et en favorisant l'activité d'arginase et la production d'IL-10, d'autre part. Nous avons aussi eu l'opportunité d'être les premiers à apporter la preuve que l'ASA pouvait renforcer le processus de phagocytose et de destruction bactérienne et moduler l'immuno-métabolisme des MOs au cours de l'IDM. Pour finir, nous avons démontré que l'ASA pouvait favoriser le basculement des MOs vers le phénotype classique présentant une faible expression du CD16 et des propriétés anti-inflammatoires.

La modulation de la réponse immunitaire innée à travers les MOs pourrait clairement représenter une approche thérapeutique innovante afin de limiter le développement de l'athérosclérose et prévenir ses complications néfastes telles que l'IDM. Ainsi, en termes de perspectives, diverses expériences seront entreprises dans le but d'étudier d'une façon approfondie le mode d'action de l'ASA sur les MOs pendant l'IDM. Parmi elles :

- ❖ Expliquer pourquoi et par quel mécanisme de contrôle l'ASA peut agir différemment sur la production des cytokines au cours de l'IDM.
- ❖ Etudier l'effet de l'ASA sur l'implication du cholestérol cellulaire dans la dynamique de capture et dans la réponse chimiotactique des MOs.
- ❖ Evaluer l'effet de l'ASA sur les Mφs résiduels ayant subi une transformation vers les cellules spumeuses.
- ❖ Renforcer l'étude phénotypique avec les molécules de présentation antigénique HLA-DR afin de vérifier et de préciser vers quel phénotype de MOs l'ASA a induit leur basculement.
- ❖ Etudier l'effet de l'ASA sur la dichotomie Th1/Th2 co-cultivés avec les MOs des patients ayant subi un IDM.
- ❖ Evaluer l'effet de l'ASA sur l'expression d'eNOS par les cellules endothéliales co-cultivées avec les MOs des patients présentant un IDM et évaluer aussi la production

Chapitre 5. Conclusions et perspectives

du NO par les deux enzymes pour pouvoir ainsi établir un ratio eNOS/iNOS et NO endothélial/NO monocyttaire.

- ❖ Enfin, Il serait aussi d'un grand intérêt d'explorer à l'aide d'études *in vivo* l'effet de l'ASA sur le « *crosstalk* » entre les plaquettes et les MOs/Mφs dans la zone infarctée.

Chapitre 6. Bibliographie

6. Chapitre 6. Bibliographie

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., et al. (2008). Anakinra, a Recombinant Human Interleukin-1 Receptor Antagonist, Inhibits Apoptosis in Experimental Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 117, 2670–2683.

Aderem, A. (2003). Phagocytosis and the Inflammatory Response. *J. Infect. Dis.* 187, S340–S345.

Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 593–623.

Aeberhard, E.E., Henderson, S.A., Arabolos, N.S., Griscavage, J.M., Castro, F.E., Barrett, C.T., and Ignarro, L.J. (1995). Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs Inhibit Expression of the Inducible Nitric Oxide Synthase Gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 1053–1059.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193–197.

Akira, S. (2003). Toll-like Receptor Signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 38105–38108.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 499–511.

Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801.

Alderson, M.R. (1993). CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J. Exp. Med.* 178, 669–674.

Alderson, M.R., Armitage, R.J., Tough, T.W., Strockbine, L., Fanslow, W.C., and Spriggs, M.K. (1993). CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *J. Exp. Med.* 178, 669–674.

Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593.

Alexander, J.S., and Elrod, J.W. (2002). Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation*. *J. Anat.* 200, 561–574.

Allen, L.-A.H. (2005). Phosphoinositide3-kinase regulates actin polymerization during delayed phagocytosis of *Helicobacter pylori*. *J. Leukoc. Biol.* 78, 220–230.

Chapitre 6. Bibliographie

Ardavín, C., Martínez del Hoyo, G., Martín, P., Anjuère, F., Arias, C.F., Marín, A.R., Ruiz, S., Parrillas, V., and Hernández, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 22, 691–700.

Aribi, M. (2018). Macrophage Bactericidal Assays. In *Macrophages*, G. Rousselet, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 135–149.

Aribi, M., Meziane, W., Habi, S., Boulatika, Y., Marchandin, H., and Aymeric, J.-L. (2015). Macrophage Bactericidal Activities against *Staphylococcus aureus* Are Enhanced In Vivo by Selenium Supplementation in a Dose-Dependent Manner. *PLOS ONE* 10, e0135515.

Arroyo-Espliguero, R. (2004). CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? *Heart* 90, 983–988.

Aruoma, O.I., and Halliwell, B. (1988). The iron-binding and hydroxyl radical scavenging action of anti-inflammatory drugs. *Xenobiotica* 18, 459–470.

Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., et al. (2009a). CX3CR1⁺ CD115⁺ CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J. Exp. Med.* 206, 595–606.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009b). Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 669–692.

Baeuerle, P.A., and Henkel, T. (1994). Function and Activation of NF- κ B in the Immune System. *Annu. Rev. Immunol.* 12, 141–179.

Bagur, R., and Hajnóczky, G. (2017). Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol. Cell* 66, 780–788.

Balaguer, S., Diaz, L., Gomes, A., Herrera, G., O'Connor, J.-E., Urios, A., Felipo, V., and Montoliu, C. (2017). Real-time cytometric assay of nitric oxide and superoxide interaction in peripheral blood monocytes: A no-wash, no-lyse kinetic method: KINETIC ASSAY OF PEROXYNITRITE GENERATION IN MONOCYTES. *Cytometry B Clin. Cytom.* 92, 211–217.

Barnes, P.J., and Karin, M. (1997). Nuclear Factor- κ B — A Pivotal Transcription Factor in Chronic Inflammatory Diseases. *N. Engl. J. Med.* 336, 1066–1071.

Chapitre 6. Bibliographie

- Biburger, M., Aschermann, S., Schwab, I., Lux, A., Albert, H., Danzer, H., Woigk, M., Dudziak, D., and Nimmerjahn, F. (2011). Monocyte Subsets Responsible for Immunoglobulin G-Dependent Effector Functions In Vivo. *Immunity* 35, 932–944.
- Bidri, M., and Arock, M. (1996). Différenciation des cellules hématopoïétiques : intervention des cytokines et expression des marqueurs membranaires. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.* 36, 859–878.
- Bishop, G.A., Moore, C.R., Xie, P., Stunz, L.L., and Kraus, Z.J. (2007). TRAF Proteins in CD40 Signaling. In *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)*, H. Wu, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 131–151.
- Botti, H., Trostchansky, A., Batthyány, C., and Rubbo, H. (2005). Reactivity of Peroxynitrite and Nitric Oxide with LDL. *IUBMB Life Int. Union Biochem. Mol. Biol. Life* 57, 407–412.
- Boucher, J.L., Custot, J., Vadon, S., Delaforge, M., Lepoivre, M., Tenu, J.P., Yapo, A., and Mansuy, D. (1994). N ω -Hydroxy-L-Arginine, an Intermediate in the L-Arginine to Nitric Oxide Pathway, Is a Strong Inhibitor of Liver and Macrophage Arginase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1614–1621.
- Boufenzler, A., Lemarié, J., Simon, T., Derive, M., Bouazza, Y., Tran, N., Maskali, F., Groubatch, F., Bonnin, P., Bastien, C., et al. (2015). TREM-1 Mediates Inflammatory Injury and Cardiac Remodeling Following Myocardial Infarction. *Circ. Res.* 116, 1772–1782.
- Boutaud, O., Sosa, I.R., Amin, T., Oram, D., Adler, D., Hwang, H.S., Crews, B.C., Milne, G., Harris, B.K., Hoeksema, M., et al. (2016). Inhibition of the Biosynthesis of Prostaglandin E₂ By Low-Dose Aspirin: Implications for Adenocarcinoma Metastasis. *Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.)* 9, 855–865.
- Brandes, R.P., Weissmann, N., and Schröder, K. (2014). Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. *Free Radic. Biol. Med.* 76, 208–226.
- Bredt, D.S., and Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 682–685.
- Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 641–654.
- Brown, M.S., and Goldstein, J.L. (1997). The SREBP Pathway: Regulation of Cholesterol Metabolism by Proteolysis of a Membrane-Bound Transcription Factor. *Cell* 89, 331–340.

Chapitre 6. Bibliographie

Bruemmer, D., Riggers, U., Holzmeister, J., Grill, M., Lippek, F., Settmacher, U., Regitz-Zagrosek, V., Fleck, E., and Graf, K. (2001). Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions. *Am. J. Cardiol.* *87*, 21–27.

Bujak, M., and Frangogiannis, N.G. (2009). The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *57*, 165–176.

Bujak, M., Dobaczewski, M., Chatila, K., Mendoza, L.H., Li, N., Reddy, A., and Frangogiannis, N.G. (2008). Interleukin-1 Receptor Type I Signaling Critically Regulates Infarct Healing and Cardiac Remodeling. *Am. J. Pathol.* *173*, 57–67.

Burchfield, J.S., Iwasaki, M., Koyanagi, M., Urbich, C., Rosenthal, N., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2008). Interleukin-10 From Transplanted Bone Marrow Mononuclear Cells Contributes to Cardiac Protection After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* *103*, 203–211.

Cadauid, A.P. (2017). Aspirin: The Mechanism of Action Revisited in the Context of Pregnancy Complications. *Front. Immunol.* *8*.

Calder, P.C., Dimitriadis, G., and Newsholme, P. (2007). Glucose metabolism in lymphoid and inflammatory cells and tissues: *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* *10*, 531–540.

Caldwell, R.B., Toque, H.A., Narayanan, S.P., and Caldwell, R.W. (2015). Arginase: an old enzyme with new tricks. *Trends Pharmacol. Sci.* *36*, 395–405.

Caldwell, R.W., Rodriguez, P.C., Toque, H.A., Narayanan, S.P., and Caldwell, R.B. (2018). Arginase: A Multifaceted Enzyme Important in Health and Disease. *Physiol. Rev.* *98*, 641–665.

Cardilo-Reis, L., Gruber, S., Schreier, S.M., Drechsler, M., Papac-Milicevic, N., Weber, C., Wagner, O., Stangl, H., Soehnlein, O., and Binder, C.J. (2012). Interleukin-13 protects from atherosclerosis and modulates plaque composition by skewing the macrophage phenotype. *EMBO Mol. Med.* *4*, 1072–1086.

Cathcart, M.K. (2004). Regulation of Superoxide Anion Production by NADPH Oxidase in Monocytes/Macrophages: Contributions to Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 23–28.

Cerqueira, N.M.F.S.A., Oliveira, E.F., Gesto, D.S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H.N., Ramos, M.J., and Fernandes, P.A. (2016). Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry* *55*, 5483–5506.

Chapitre 6. Bibliographie

- Chadwick Jayaraj, J., Davatyan, K., Subramanian, S.S., and Priya, J. (2019). Epidemiology of Myocardial Infarction. In *Myocardial Infarction*, B. Pamukçu, ed. (IntechOpen), p.
- Chatzigeorgiou, A., Lyberi, M., Chatzilimperis, G., Nezos, A., and Kamper, E. (2009). CD40/CD40L signaling and its implication in health and disease. *BioFactors* 35, 474–483.
- Chen, B., Geng, J., Gao, S.-X., Yue, W.-W., and Liu, Q. (2018). Eplerenone Modulates Interleukin-33/sST2 Signaling and IL-1 β in Left Ventricular Systolic Dysfunction After Acute Myocardial Infarction. *J. Interferon Cytokine Res.* 38, 137–144.
- Chen, Z., Martin, M., Li, Z., and Shyy, J.Y.-J. (2014). Endothelial dysfunction: the role of sterol regulatory element-binding protein-induced NOD-like receptor family pyrin domain-containing protein 3 inflammasome in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 25, 339–349.
- Cheng, X., Liao, Y.-H., Ge, H., Li, B., Zhang, J., Yuan, J., Wang, M., Liu, Y., Guo, Z., Chen, J., et al. (2005). Th1/Th2 Functional Imbalance After Acute Myocardial Infarction: Coronary Arterial Inflammation or Myocardial Inflammation. *J. Clin. Immunol.* 25, 246–253.
- Chistiakov, D.A., Orekhov, A.N., and Bobryshev, Y.V. (2015). Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol.* 214, 33–50.
- Cho, J.Y. (2007). Immunomodulatory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) at the clinically available doses. *Arch. Pharm. Res.* 30, 64–74.
- Cho, H.J., Xie, Q.W., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., and Nathan, C. (1992). Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* 176, 599–604.
- Cipollone, F., Patrignani, P., Greco, A., Panara, M.R., Padovano, R., Cuccurullo, F., Patrono, C., Rebuszi, A.G., Liuzzo, G., Quaranta, G., et al. (1997). Differential Suppression of Thromboxane Biosynthesis by Indobufen and Aspirin in Patients With Unstable Angina. *Circulation* 96, 1109–1116.
- Clapham, D.E. (2007). Calcium Signaling. *Cell* 131, 1047–1058.
- Colantoni, A., de Maria, N., Caraceni, P., Bernardi, M., Floyd, R.A., and Van Thiel, D.H. (1998). Prevention of Reoxygenation Injury by Sodium Salicylate in Isolated-Perfused Rat Liver. *Free Radic. Biol. Med.* 25, 87–94.
- Cook-Mills, J.M. (2006). Hydrogen peroxide activation of endothelial cell-associated MMPs during VCAM-1-dependent leukocyte migration. *Cell. Mol. Biol. Noisy--Gd. Fr.* 52, 8–16.

Chapitre 6. Bibliographie

Corraliza, I.M., Campo, M.L., Soler, G., and Modolell, M. (1994). Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods* 174, 231–235.

Crea, F., and Liuzzo, G. (2013). Pathogenesis of Acute Coronary Syndromes. *J. Am. Coll. Cardiol.* 61, 1–11.

Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S.-Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S.K., Moshous, D., Picard, C., et al. (2010). Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 33, 375–386.

Cyrus, T., Sung, S., Zhao, L., Funk, C.D., Tang, S., and Praticò, D. (2002). Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 106, 1282–1287.

Dai, Y., and Ge, J. (2012). Clinical Use of Aspirin in Treatment and Prevention of Cardiovascular Disease. *Thrombosis* 2012, 1–7.

Davignon, J. (2004). Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 109, III-27-III-32.

De Groot, C.J.A., Ruuls, S.R., M. Theeuwes, J.W., Dijkstra, C.D., and Der Valk, P.V. (1997). Immunocytochemical Characterization of the Expression of Inducible and Constitutive Isoforms of Nitric Oxide Synthase in Demyelinating Multiple Sclerosis Lesions: *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 56, 10–20.

Dewald, O., Zymek, P., Winkelmann, K., Koerting, A., Ren, G., Abou-Khamis, T., Michael, L.H., Rollins, B.J., Entman, M.L., and Frangogiannis, N.G. (2005). CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Regulates Inflammatory Responses Critical to Healing Myocardial Infarcts. *Circ. Res.* 96, 881–889.

Dixit, N., and Simon, S.I. (2012). Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest. *Front. Immunol.* 3.

Djurdjevic, P.M., Arsenijevic, N.N., Baskic, D.D., Djukic, A.L., Popovic, S., and Samardzic, G. (2001). Systemic response of peripheral blood leukocytes and their phagocytic activity during acute myocardial infarction. *Exp. Clin. Cardiol.* 6, 159–166.

Dobaczewski, M., Xia, Y., Bujak, M., Gonzalez-Quesada, C., and Frangogiannis, N.G. (2010). CCR5 Signaling Suppresses Inflammation and Reduces Adverse Remodeling of the Infarcted Heart, Mediating Recruitment of Regulatory T Cells. *Am. J. Pathol.* 176, 2177–2187.

Chapitre 6. Bibliographie

Domínguez Rodríguez, A., Abreu González, P., García González, M.J., and Ferrer Hita, J. (2005). [Association between serum interleukin 10 level and development of heart failure in acute myocardial infarction patients treated by primary angioplasty]. *Rev. Esp. Cardiol.* *58*, 626–630.

Donnelly, R.P., Loftus, R.M., Keating, S.E., Liou, K.T., Biron, C.A., Gardiner, C.M., and Finlay, D.K. (2014). mTORC1-Dependent Metabolic Reprogramming Is a Prerequisite for NK Cell Effector Function. *J. Immunol.* *193*, 4477–4484.

Döring, M., Cabanillas Stanchi, K.M., Erbacher, A., Haufe, S., Schwarze, C.P., Handgretinger, R., Hofbeck, M., and Kerst, G. (2015). Phagocytic activity of monocytes, their subpopulations and granulocytes during post-transplant adverse events after hematopoietic stem cell transplantation. *Immunobiology* *220*, 605–613.

Dorion-Thibaudeau, J., Raymond, C., Lattová, E., Perreault, H., Durocher, Y., and De Crescenzo, G. (2014). Towards the development of a surface plasmon resonance assay to evaluate the glycosylation pattern of monoclonal antibodies using the extracellular domains of CD16a and CD64. *J. Immunol. Methods* *408*, 24–34.

Dorn, G.W. (1997). Role of thromboxane A2 in mitogenesis of vascular smooth muscle cells. In *Prostaglandins and Control of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation*, K. Schrör, and P. Ney, eds. (Basel: Birkhäuser Basel), pp. 42–62.

Doughty, C.A., Bleiman, B.F., Wagner, D.J., Dufort, F.J., Mataraza, J.M., Roberts, M.F., and Chiles, T.C. (2006). Antigen receptor-mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. *Blood* *107*, 4458–4465.

Du, M., Pan, W., Duan, X., Yang, P., and Ge, S. (2016). Lower dosage of aspirin promotes cell growth and osteogenic differentiation in murine bone marrow stromal cells. *J. Dent. Sci.* *11*, 315–322.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., et al. (2010a). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* *464*, 1357–1361.

Duewell, P., Kono, H., Rayner, K.J., Sirois, C.M., Vladimer, G., Bauernfeind, F.G., Abela, G.S., Franchi, L., Nuñez, G., Schnurr, M., et al. (2010b). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* *464*, 1357–1361.

Chapitre 6. Bibliographie

- El Kebir, D., József, L., Pan, W., Wang, L., Petasis, N.A., Serhan, C.N., and Filep, J.G. (2009). 15-Epi-lipoxin A₄ Inhibits Myeloperoxidase Signaling and Enhances Resolution of Acute Lung Injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *180*, 311–319.
- El-Awady, M.S., and Suddek, G.M. (2014). Agmatine ameliorates atherosclerosis progression and endothelial dysfunction in high cholesterol-fed rabbits: Effects of AGM in high cholesterol-fed rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* n/a-n/a.
- Elchinova, E., Teubel, I., Roura, S., Fernández, M.A., Lupón, J., Gálvez-Montón, C., de Antonio, M., Moliner, P., Domingo, M., Zamora, E., et al. (2018). Circulating monocyte subsets and heart failure prognosis. *PLOS ONE* *13*, e0204074.
- El-Gayar, S., Thüring-Nahler, H., Pfeilschifter, J., Röllinghoff, M., and Bogdan, C. (2003). Translational Control of Inducible Nitric Oxide Synthase by IL-13 and Arginine Availability in Inflammatory Macrophages. *J. Immunol.* *171*, 4561–4568.
- Eng, H.-L., Hsu, Y.-Y., and Lin, T.-M. (2018). Differences in TLR7/8 activation between monocytes and macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *497*, 319–325.
- Engelbertsen, D., Andersson, L., Ljungcrantz, I., Wigren, M., Hedblad, B., Nilsson, J., and Björkbacka, H. (2013). T-Helper 2 Immunity Is Associated With Reduced Risk of Myocardial Infarction and Stroke. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *33*, 637–644.
- Engelbertsen, D., Vallejo, J., Quách, T.D., Fredrikson, G.N., Alm, R., Hedblad, B., Björkbacka, H., Rothstein, T.L., Nilsson, J., and Bengtsson, E. (2015). Low Levels of IgM Antibodies against an Advanced Glycation Endproduct–Modified Apolipoprotein B100 Peptide Predict Cardiovascular Events in Nondiabetic Subjects. *J. Immunol.* *195*, 3020–3025.
- Enomoto, Y., Adachi, S., Matsushima-Nishiwaki, R., Doi, T., Niwa, M., Akamatsu, S., Tokuda, H., Ogura, S., Yoshimura, S., Iwama, T., et al. (2010). Thromboxane A₂ promotes soluble CD40 ligand release from human platelets. *Atherosclerosis* *209*, 415–421.
- Epelman, S., Lavine, K.J., and Randolph, G.J. (2014). Origin and Functions of Tissue Macrophages. *Immunity* *41*, 21–35.
- Fang, L., Moore, X.-L., Dart, A.M., and Wang, L.-M. (2015). Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction. *J. Geriatr. Cardiol. JGC* *12*, 305–312.
- Feeney, E.R., McAuley, N., O’Halloran, J.A., Rock, C., Low, J., Satchell, C.S., Lambert, J.S., Sheehan, G.J., and Mallon, P.W.G. (2013). The Expression of Cholesterol Metabolism Genes

Chapitre 6. Bibliographie

in Monocytes From HIV-Infected Subjects Suggests Intracellular Cholesterol Accumulation. *J. Infect. Dis.* 207, 628–637.

Feinberg, M.W., Wara, A.K., Cao, Z., Lebedeva, M.A., Rosenbauer, F., Iwasaki, H., Hirai, H., Katz, J.P., Haspel, R.L., Gray, S., et al. (2007). The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J.* 26, 4138–4148.

Feng, Q., Lu, X., Jones, D.L., Shen, J., and Arnold, J.M.O. (2001). Increased Inducible Nitric Oxide Synthase Expression Contributes to Myocardial Dysfunction and Higher Mortality After Myocardial Infarction in Mice. *Circulation* 104, 700–704.

Feng, R., Desbordes, S.C., Xie, H., Tillo, E.S., Pixley, F., Stanley, E.R., and Graf, T. (2008). PU.1 and C/EBP β convert fibroblasts into macrophage-like cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 6057–6062.

Fernandez-Ruiz, I., Puchalska, P., Narasimhulu, C.A., Sengupta, B., and Parthasarathy, S. (2016). Differential lipid metabolism in monocytes and macrophages: influence of cholesterol loading. *J. Lipid Res.* 57, 574–586.

Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 690–702.

Fierro, I.M., and Serhan, C.N. (2001). Mechanisms in anti-inflammation and resolution: the role of lipoxins and aspirin-triggered lipoxins. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34, 555–566.

Fischer, P., and Hilfiker-Kleiner, D. (2009). Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart and its impact on potential therapeutic aspects: Role of gp130-mediated signalling pathways in the heart. *Br. J. Pharmacol.* 153, S414–S427.

FitzGerald, G.A. (1991). Mechanisms of platelet activation: Thromboxane A₂ as an amplifying signal for other agonists. *Am. J. Cardiol.* 68, B11–B15.

Fitzgerald, D.J., and FitzGerald, G.A. (2013). Historical Lessons in Translational Medicine: Cyclooxygenase Inhibition and P2Y₁₂ Antagonism. *Circ. Res.* 112, 174–194.

Flier, J.S., Underhill, L.H., Saper, C.B., and Breder, C.D. (1994). The Neurologic Basis of Fever. *N. Engl. J. Med.* 330, 1880–1886.

Fogg, D.K. (2006). A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science* 311, 83–87.

Chapitre 6. Bibliographie

Fontes, J.A., Rose, N.R., and Čiháková, D. (2015). The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine* 74, 62–68.

Forstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837.

Frangogiannis, N.G. (2007). Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb. Haemost.* 97, 738–747.

Frangogiannis, N.G. (2014a). The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nat. Rev. Cardiol.* 11, 255–265.

Frangogiannis, N.G. (2014b). The Immune System and the Remodeling Infarcted Heart: Cell Biological Insights and Therapeutic Opportunities. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 63, 185–195.

Frangogiannis, N.G. (2015). Interleukin-1 in cardiac injury, repair, and remodeling: pathophysiologic and translational concepts. *Discov. Craiova Rom.* 3.

Frangogiannis, N.G., Mendoza, L.H., Lindsey, M.L., Ballantyne, C.M., Michael, L.H., Smith, C.W., and Entman, M.L. (2000). IL-10 Is Induced in the Reperfused Myocardium and May Modulate the Reaction to Injury. *J. Immunol.* 165, 2798–2808.

Fricchione, G.L., Bilfinger, T.V., and Stefano, G.B. (1998). Aspirin inhibits granulocyte and monocyte adherence to saphenous vein endothelia in a process not mediated by nitric oxide. *Int. J. Cardiol.* 64, S29–S33.

Fu, Y. (2004). Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation. *Blood Cells. Mol. Dis.* 32, 182–190.

Fuchs, M., Hilfiker, A., Kaminski, K., Hilfiker-Kleiner, D., Guener, Z., Klein, G., Podewski, E., Schieffer, B., Rose-John, S., and Drexler, H. (2003). Role of interleukin-6 for left ventricular remodeling and survival after experimental myocardial infarction. *FASEB J.* 17, 1–20.

Fuster, V., Dyken, M.L., Vokonas, P.S., and Hennekens, C. (1993). Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease. Special Writing Group. *Circulation* 87, 659–675.

Gabriel, A.S., Martinsson, A., Wretling, B., and Ahnve, S. (2004). IL-6 levels in acute and post myocardial infarction: their relation to CRP levels, infarction size, left ventricular systolic function, and heart failure. *Eur. J. Intern. Med.* 15, 523–528.

Chapitre 6. Bibliographie

Gao, S., and Liu, J. (2017). Association between circulating oxidized low-density lipoprotein and atherosclerotic cardiovascular disease. *Chronic Dis. Transl. Med.* 3, 89–94.

Garlichs, C.D., John, S., Schmeißer, A., Eskafi, S., Stumpf, C., Karl, M., Goppelt-Struebe, M., Schmieder, R., and Daniel, W.G. (2001). Upregulation of CD40 and CD40 Ligand (CD154) in Patients With Moderate Hypercholesterolemia. *Circulation* 104, 2395–2400.

George, J., Schwartzberg, S., Medvedovsky, D., Jonas, M., Charach, G., Afek, A., and Shamiss, A. (2012). Regulatory T cells and IL-10 levels are reduced in patients with vulnerable coronary plaques. *Atherosclerosis* 222, 519–523.

Gerszten, R.E., and Tager, A.M. (2012). The Monocyte in Atherosclerosis — Should I Stay or Should I Go Now? *N. Engl. J. Med.* 366, 1734–1736.

Geyer, J.W., and Dabich, D. (1971). Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 39, 412–417.

Ginhoux, F., Schultze, J.L., Murray, P.J., Ochando, J., and Biswas, S.K. (2016). New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat. Immunol.* 17, 34–40.

Gisterå, A., and Hansson, G.K. (2017). The immunology of atherosclerosis. *Nat. Rev. Nephrol.* 13, 368–380.

Gitelman, H.J. (1967). An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens. *Anal. Biochem.* 18, 521–531.

Godley, R.W., and Hernandez-Vila, E. (2016). Aspirin for Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease. *Tex. Heart Inst. J.* 43, 318–319.

Goh, J., Baird, A.W., O’Keane, C., Watson, R.W.G., Cottell, D., Bernasconi, G., Petasis, N.A., Godson, C., Brady, H.R., and MacMathuna, P. (2001). Lipoxin A₄ and Aspirin-Triggered 15-Epi-Lipoxin A₄ Antagonize TNF- α -Stimulated Neutrophil-Enterocyte Interactions In Vitro and Attenuate TNF- α -Induced Chemokine Release and Colonocyte Apoptosis in Human Intestinal Mucosa Ex Vivo. *J. Immunol.* 167, 2772–2780.

Gómez-Olarte, S., Bolaños, N.I., Echeverry, M., Rodríguez, A.N., Cuéllar, A., Puerta, C.J., Mariño, A., and González, J.M. (2019). Intermediate Monocytes and Cytokine Production Associated With Severe Forms of Chagas Disease. *Front. Immunol.* 10, 1671.

Chapitre 6. Bibliographie

- Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* 32, 593–604.
- Goudot, C., Coillard, A., Villani, A.-C., Gueguen, P., Cros, A., Sarkizova, S., Tang-Huau, T.-L., Bohec, M., Baulande, S., Hacohen, N., et al. (2017). Aryl Hydrocarbon Receptor Controls Monocyte Differentiation into Dendritic Cells versus Macrophages. *Immunity* 47, 582-596.e6.
- Graf, T., and Enver, T. (2009). Forcing cells to change lineages. *Nature* 462, 587–594.
- Grainger, D.J., Mosedale, D.E., Metcalfe, J.C., and Böttinger, E.P. (2000). Dietary fat and reduced levels of TGFbeta1 act synergistically to promote activation of the vascular endothelium and formation of lipid lesions. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 13), 2355–2361.
- Greene, E.R., Huang, S., Serhan, C.N., and Panigrahy, D. (2011). Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 96, 27–36.
- Groh, L., Keating, S.T., Joosten, L.A.B., Netea, M.G., and Riksen, N.P. (2018). Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Semin. Immunopathol.* 40, 203–214.
- Grosser, N., Abate, A., Oberle, S., Vreman, H.J., Dennerly, P.A., Becker, J.C., Pohle, T., Seidman, D.S., and Schröder, H. (2003). Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 956–960.
- Guevara, I., Iwanejko, J., Dembińska-Kieć, A., Pankiewicz, J., Wanat, A., Anna, P., Gołabek, I., Bartuś, S., Malczewska-Malec, M., and Szczudlik, A. (1998). Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin. Chim. Acta* 274, 177–188.
- Guha, M., and Mackman, N. (2001). LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13, 85–94.
- Guilliams, M., De Kleer, I., Henri, S., Post, S., Vanhoutte, L., De Prijck, S., Deswarte, K., Malissen, B., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2013). Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *J. Exp. Med.* 210, 1977–1992.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 571–578.
- Guilliams, M., Mildner, A., and Yona, S. (2018). Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity* 49, 595–613.

Chapitre 6. Bibliographie

- Guzik, T.J., Korb, R., and Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 54, 469–487.
- Hamid, T., Gu, Y., Ortines, R.V., Bhattacharya, C., Wang, G., Xuan, Y.-T., and Prabhu, S.D. (2009). Divergent Tumor Necrosis Factor Receptor–Related Remodeling Responses in Heart Failure: Role of Nuclear Factor- κ B and Inflammatory Activation. *Circulation* 119, 1386–1397.
- Hansson, G.K. (2014). Molecular Cell Biology of Atherosclerosis. In *PanVascular Medicine*, P. Lanzer, ed. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 1–17.
- Hartel, C., von Puttkamer, J., Gallner, F., Strunk, T., and Schultz, C. (2004). Dose-dependent Immunomodulatory Effects of Acetylsalicylic Acid and Indomethacin in Human Whole Blood: Potential Role of Cyclooxygenase-2 Inhibition. *Scand. J. Immunol.* 60, 412–420.
- Haudek, S.B., Taffet, G.E., Schneider, M.D., and Mann, D.L. (2007). TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways. *J. Clin. Invest.* 117, 2692–2701.
- Heine, G.H., Ulrich, C., Seibert, E., Seiler, S., Marell, J., Reichart, B., Krause, M., Schlitt, A., Köhler, H., and Girndt, M. (2008). CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int.* 73, 622–629.
- Hennekens, C.H., Sechenova, O., Hollar, D., and Serebruany, V.L. (2006). Dose of Aspirin in the Treatment and Prevention of Cardiovascular Disease: Current and Future Directions. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 11, 170–176.
- Hilfiker-Kleiner, D., Shukla, P., Klein, G., Schaefer, A., Stapel, B., Hoch, M., Müller, W., Scherr, M., Theilmeier, G., Ernst, M., et al. (2010). Continuous Glycoprotein-130–Mediated Signal Transducer and Activator of Transcription-3 Activation Promotes Inflammation, Left Ventricular Rupture, and Adverse Outcome in Subacute Myocardial Infarction. *Circulation* 122, 145–155.
- Ho, Deh-Ming Chang, Hen-Yih Shiao, L.-J. (2001). Aspirin differentially regulates endotoxin-induced IL-12 and TNF- α production in human dendritic cells. *Scand. J. Rheumatol.* 30, 346–352.
- Hofer, I.E., Grundmann, S., Schirmer, S., van Royen, N., Meder, B., Bode, C., Piek, J.J., and Buschmann, I.R. (2005). Aspirin, But Not Clopidogrel, Reduces Collateral Conductance in a Rabbit Model of Femoral Artery Occlusion. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 994–1001.

Chapitre 6. Bibliographie

Hoeffel, G., and Ginhoux, F. (2018). Fetal monocytes and the origins of tissue-resident macrophages. *Cell. Immunol.* 330, 5–15.

ter Horst, E., Hakimzadeh, N., van der Laan, A., Krijnen, P., Niessen, H., and Piek, J. (2015). Modulators of Macrophage Polarization Influence Healing of the Infarcted Myocardium. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 29583–29591.

van Hout, G.P., Arslan, F., Pasterkamp, G., and Hoefler, I.E. (2016). Targeting danger-associated molecular patterns after myocardial infarction. *Expert Opin. Ther. Targets* 20, 223–239.

Hussain, M., Javeed, A., Ashraf, M., Zhao, Y., Mukhtar, M.M., and Rehman, M.U. (2012). Aspirin and immune system. *Int. Immunopharmacol.* 12, 10–20.

Hwang, M.-W., Matsumori, A., Furukawa, Y., Ono, K., Okada, M., Iwasaki, A., Hara, M., Miyamoto, T., Touma, M., and Sasayama, S. (2001). Neutralization of interleukin-1 β in the acute phase of myocardial infarction promotes the progression of left ventricular remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.* 38, 1546–1553.

Ikonomidis, I., Andreotti, F., Economou, E., Stefanadis, C., Toutouzas, P., and Nihoyannopoulos, P. (1999). Increased Proinflammatory Cytokines in Patients With Chronic Stable Angina and Their Reduction By Aspirin. *Circulation* 100, 793–798.

Imanishi, T., Ikejima, H., Tsujioka, H., Kuroi, A., Ishibashi, K., Komukai, K., Tanimoto, T., Ino, Y., Takeshita, T., and Akasaka, T. (2010). Association of monocyte subset counts with coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* 212, 628–635.

Ismahil, M.A., Hamid, T., Bansal, S.S., Patel, B., Kingery, J.R., and Prabhu, S.D. (2014). Remodeling of the Mononuclear Phagocyte Network Underlies Chronic Inflammation and Disease Progression in Heart Failure: Critical Importance of the Cardiosplenic Axis. *Circ. Res.* 114, 266–282.

Iuchi, A., Harada, H., and Tanaka, T. (2018). IL-6 blockade for myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 271, 19–20.

Jackson, M., and Krasnodembskaya, A. (2017). Analysis of Mitochondrial Transfer in Direct Co-cultures of Human Monocyte-derived Macrophages (MDM) and Mesenchymal Stem Cells (MSC). *BIO-Protoc.* 7.

Chapitre 6. Bibliographie

- Jakubzick, C.V., Randolph, G.J., and Henson, P.M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat. Rev. Immunol.* *17*, 349–362.
- Jan, M., Meng, S., Chen, N.C., Mai, J., Wang, H., and Yang, X.-F. (2010). Inflammatory and Autoimmune Reactions in Atherosclerosis and Vaccine Design Informatics. *J. Biomed. Biotechnol.* *2010*, 1–16.
- Jansen, M.F., Hollander, M.R., van Royen, N., Horrevoets, A.J., and Lutgens, E. (2016). CD40 in coronary artery disease: a matter of macrophages? *Basic Res. Cardiol.* *111*, 38.
- Janssens, S., and Beyaert, R. (2003). Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin. Microbiol. Rev.* *16*, 637–646.
- Jason, J., Archibald, L.K., Nwanyanwu, O.C., Byrd, M.G., Kazembe, P.N., Dobbie, H., and Jarvis, W.R. (2001). Comparison of Serum and Cell-Specific Cytokines in Humans. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *8*, 1097–1103.
- Javeed, A., Hou, Y., Duan, K., Zhang, B., Shen, H., Cao, Y., and Zhao, Y. (2011). Aspirin significantly decreases the nonopsonic phagocytosis and immunogenicity of macrophages in mice. *Inflamm. Res.* *60*, 389–398.
- Jéquier, E. (1994). Carbohydrates as a source of energy. *Am. J. Clin. Nutr.* *59*, 682S-685S.
- Johnson, J.L. (2017). Metalloproteinases in atherosclerosis. *Eur. J. Pharmacol.* *816*, 93–106.
- Jones, L.H. (2012). Chemistry and Biology of Biomolecule Nitration. *Chem. Biol.* *19*, 1086–1092.
- Jozsef, L., Zouki, C., Petasis, N.A., Serhan, C.N., and Filep, J.G. (2002). Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit peroxynitrite formation, NF- κ B and AP-1 activation, and IL-8 gene expression in human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 13266–13271.
- Jung, M., Ma, Y., Iyer, R.P., DeLeon-Pennell, K.Y., Yabluchanskiy, A., Garrett, M.R., and Lindsey, M.L. (2017). IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. *Basic Res. Cardiol.* *112*, 33.
- Jung, M., Dodsworth, M., and Thum, T. (2019). Inflammatory cells and their non-coding RNAs as targets for treating myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* *114*, 4.

Chapitre 6. Bibliographie

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005). Reactive Oxygen Species Promote TNF α -Induced Death and Sustained JNK Activation by Inhibiting MAP Kinase Phosphatases. *Cell* 120, 649–661.

Kashiwagi, M., Imanishi, T., Tsujioka, H., Ikejima, H., Kuroi, A., Ozaki, Y., Ishibashi, K., Komukai, K., Tanimoto, T., Ino, Y., et al. (2010). Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in patients with stable angina pectoris. *Atherosclerosis* 212, 171–176.

Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384.

Kawasaki, T., and Kawai, T. (2014). Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front. Immunol.* 5.

Keira, N., Tatsumi, T., Matoba, S., Shiraishi, J., Yamanaka, S., Akashi, K., Kobara, M., Asayama, J., Fushiki, S., Fliss, H., et al. (2002). Lethal Effect of Cytokine-induced Nitric Oxide and Peroxynitrite on Cultured Rat Cardiac Myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34, 583–596.

Kiener, P.A., Moran-Davis, P., Rankin, B.M., Wahl, A.F., Aruffo, A., and Hollenbaugh, D. (1995a). Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 4917–4925.

Kiener, P.A., Moran-Davis, P., Rankin, B.M., Wahl, A.F., Aruffo, A., and Hollenbaugh, D. (1995b). Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 4917–4925.

King, V.L., Cassis, L.A., and Daugherty, A. (2007). Interleukin-4 Does Not Influence Development of Hypercholesterolemia or Angiotensin II-Induced Atherosclerotic Lesions in Mice. *Am. J. Pathol.* 171, 2040–2047.

Kleveland, O., Kunszt, G., Bratlie, M., Ueland, T., Broch, K., Holte, E., Michelsen, A.E., Bendz, B., Amundsen, B.H., Espevik, T., et al. (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. *Eur. Heart J.* 37, 2406–2413.

Kleveland, O., Ueland, T., Kunszt, G., Bratlie, M., Yndestad, A., Broch, K., Holte, E., Ryan, L., Amundsen, B.H., Bendz, B., et al. (2018). Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab

Chapitre 6. Bibliographie

induces a selective and substantial increase in plasma IP-10 and MIP-1 β in non-ST-elevation myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 271, 1–7.

Knowles, R.G., and Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298 (Pt 2), 249–258.

Kobara, M., Noda, K., Kitamura, M., Okamoto, A., Shiraishi, T., Toba, H., Matsubara, H., and Nakata, T. (2010). Antibody against interleukin-6 receptor attenuates left ventricular remodelling after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc. Res.* 87, 424–430.

Kobayashi, Y. (2010). The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 88, 1157–1162.

Kopp, E., and Ghosh, S. (1994). Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265, 956–959.

Korn, S.H., Wouters, E.F.M., Vos, N., and Janssen-Heininger, Y.M.W. (2001). Cytokine-induced Activation of Nuclear Factor- κ B Is Inhibited by Hydrogen Peroxide through Oxidative Inactivation of I κ B Kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 35693–35700.

Kortholt, A., Bolourani, P., Rehmann, H., Keizer-Gunnink, I., Weeks, G., Wittinghofer, A., and Van Haastert, P.J.M. (2010). A Rap/Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Controls Pseudopod Formation. *Mol. Biol. Cell* 21, 936–945.

Krishnamurthy, P., Rajasingh, J., Lambers, E., Qin, G., Losordo, D.W., and Kishore, R. (2009). IL-10 Inhibits Inflammation and Attenuates Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction via Activation of STAT3 and Suppression of HuR. *Circ. Res.* 104.

Kundu, J., and Surh, Y. (2008). Inflammation: Gearing the journey to cancer. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 659, 15–30.

Kurrelmeyer, K.M., Michael, L.H., Baumgarten, G., Taffet, G.E., Peschon, J.J., Sivasubramanian, N., Entman, M.L., and 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 5456–5461.

Kyaw, T., Tay, C., Khan, A., Dumouchel, V., Cao, A., To, K., Kehry, M., Dunn, R., Agrotis, A., Tipping, P., et al. (2010). Conventional B2 B Cell Depletion Ameliorates whereas Its Adoptive Transfer Aggravates Atherosclerosis. *J. Immunol.* 185, 4410–4419.

Chapitre 6. Bibliographie

Kyaw, T., Tipping, P., Bobik, A., and Toh, B.-H. (2012). Protective Role of Natural IgM-Producing B1a Cells in Atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 22, 48–53.

Lacerte, P., Brunet, A., Egarnes, B., Duchêne, B., Brown, J.P., and Gosselin, J. (2016). Overexpression of TLR2 and TLR9 on monocyte subsets of active rheumatoid arthritis patients contributes to enhance responsiveness to TLR agonists. *Arthritis Res. Ther.* 18, 10.

Laiosa, C.V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L., and Graf, T. (2006). Reprogramming of Committed T Cell Progenitors to Macrophages and Dendritic Cells by C/EBP α and PU.1 Transcription Factors. *Immunity* 25, 731–744.

Lanone, S., Manivet, P., Callebert, J., Launay, J.-M., Payen, D., Aubier, M., Boczkowski, J., and Mebazaa, A. (2002). Inducible nitric oxide synthase (NOS2) expressed in septic patients is nitrated on selected tyrosine residues: implications for enzymic activity. *Biochem. J.* 366, 399–404.

Lawrence, E. (1998). Getting heated over prostaglandins. *Nature news*980924-2.

Lawrence, T. (2009). The Nuclear Factor NF- κ B Pathway in Inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001651–a001651.

Layne, K., Di Giosia, P., Ferro, A., and Passacquale, G. (2016a). Anti-platelet drugs attenuate the expansion of circulating CD14^{high} CD16⁺ monocytes under pro-inflammatory conditions. *Cardiovasc. Res.* 111, 26–33.

Layne, K., Di Giosia, P., Ferro, A., and Passacquale, G. (2016b). Anti-platelet drugs attenuate the expansion of circulating CD14^{high} CD16⁺ monocytes under pro-inflammatory conditions. *Cardiovasc. Res.* 111, 26–33.

Lee, C.F., Ullevig, S., Kim, H.S., and Asmis, R. (2013). Regulation of Monocyte Adhesion and Migration by Nox4. *PLoS ONE* 8, e66964.

Lee, J., Ryu, H., Ferrante, R.J., Morris, S.M., and Ratan, R.R. (2003). Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 4843–4848.

Lee, J.D., Kravchenko, V., Kirkland, T.N., Han, J., Mackman, N., Moriarty, A., Leturcq, D., Tobias, P.S., and Ulevitch, R.J. (1993). Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored or integral membrane forms of CD14 mediate identical cellular responses to endotoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 9930–9934.

Chapitre 6. Bibliographie

Legein, B., Temmerman, L., Biessen, E.A.L., and Lutgens, E. (2013). Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 3847–3869.

Leuschner, F., Rauch, P.J., Ueno, T., Gorbatov, R., Marinelli, B., Lee, W.W., Dutta, P., Wei, Y., Robbins, C., Iwamoto, Y., et al. (2012). Rapid monocyte kinetics in acute myocardial infarction are sustained by extramedullary monocytopoiesis. *J. Exp. Med.* 209, 123–137.

Levick, S.P., and Goldspink, P.H. (2014). Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Heart Fail. Rev.* 19, 227–236.

Li, H., Horke, S., and Förstermann, U. (2014a). Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 237, 208–219.

Li, X., Zhang, Y., Xia, M., Gulbins, E., Boini, K.M., and Li, P.-L. (2014b). Activation of Nlrp3 Inflammasomes Enhances Macrophage Lipid-Deposition and Migration: Implication of a Novel Role of Inflammasome in Atherogenesis. *PLoS ONE* 9, e87552.

Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–874.

Libby, P. (2017). Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 2278–2289.

Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317–325.

Lievens, D., Eijgelaar, W., Biessen, E., Daemen, M., and Lutgens, E. (2009). The multifunctionality of CD40L and its receptor CD40 in atherosclerosis. *Thromb. Haemost.* 102, 206–214.

Lin, S.-C., Lo, Y.-C., and Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* 465, 885–890.

Linton, M.F., Yancey, P.G., Davies, S.S., Jerome, W.G., Linton, E.F., Song, W.L., Doran, A.C., and Vickers, K.C. (2000). The Role of Lipids and Lipoproteins in Atherosclerosis. In *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, et al., eds. (South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.), p.

Liu, T., Zhang, L., Joo, D., and Sun, S.-C. (2017a). NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2, 17023.

Chapitre 6. Bibliographie

Liu, Y., Fang, S., Li, X., Feng, J., Du, J., Guo, L., Su, Y., Zhou, J., Ding, G., Bai, Y., et al. (2017b). Aspirin inhibits LPS-induced macrophage activation via the NF- κ B pathway. *Sci. Rep.* 7, 11549.

Liu, Y., Feng, J., Sun, M., Liu, B., Yang, G., Bu, Y., Zhao, M., Wang, T., Zhang, W., Yuan, H., et al. (2019). Aspirin inhibits the proliferation of hepatoma cells through controlling GLUT1-mediated glucose metabolism. *Acta Pharmacol. Sin.* 40, 122–132.

Lobry, C., and Weil, R. (2007). Mécanismes régulateurs de la voie NF- κ B dans les lymphocytes T. *Médecine/Sciences* 23, 857–861.

Loffredo, L., Martino, F., Carnevale, R., Pignatelli, P., Catasca, E., Perri, L., Calabrese, C.M., Palumbo, M.M., Baratta, F., Del Ben, M., et al. (2012). Obesity and Hypercholesterolemia are Associated with NOX2 Generated Oxidative Stress and Arterial Dysfunction. *J. Pediatr.* 161, 1004–1009.

Loll, P.J., Picot, D., and Garavito, R.M. (1995). The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat. Struct. Biol.* 2, 637–643.

Loppnow, H., and Libby, P. (1990). Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J. Clin. Invest.* 85, 731–738.

Lowenstein, C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W., and Murphy, W.J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 9730–9734.

Lucido, M.J., Orlando, B.J., Vecchio, A.J., and Malkowski, M.G. (2016). Crystal Structure of Aspirin-Acetylated Human Cyclooxygenase-2: Insight into the Formation of Products with Reversed Stereochemistry. *Biochemistry* 55, 1226–1238.

Luo, N., Liu, J., Chung, B.H., Yang, Q., Klein, R.L., Garvey, W.T., and Fu, Y. (2010). Macrophage Adiponectin Expression Improves Insulin Sensitivity and Protects Against Inflammation and Atherosclerosis. *Diabetes* 59, 791–799.

Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O’Meally, R., Cole, R.N., Pandey, A., and Semenza, G.L. (2011). Pyruvate Kinase M2 Is a PHD3-Stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cell* 145, 732–744.

Chapitre 6. Bibliographie

- Luscinskas, F.W., Nicolaou, K.C., Webber, S.E., Veale, C.A., Gimbrone, M.A., and Serhan, C.N. (1990). Ca²⁺ mobilization with leukotriene A₄ and epoxytetraenes in human neutrophils. *Biochem. Pharmacol.* 39, 355–365.
- Lutgens, E., Gijbels, M., Smook, M., Heeringa, P., Gotwals, P., Kotliansky, V.E., and Daemen, M.J.A.P. (2002). Transforming Growth Factor- β Mediates Balance Between Inflammation and Fibrosis During Plaque Progression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22, 975–982.
- Maekawa, N., Wada, H., Kanda, T., Niwa, T., Yamada, Y., Saito, K., Fujiwara, H., Sekikawa, K., and Seishima, M. (2002). Improved myocardial ischemia/reperfusion injury in mice lacking tumor necrosis factor- α . *J. Am. Coll. Cardiol.* 39, 1229–1235.
- Malik, N., Greenfield, B.W., Wahl, A.F., and Kiener, P.A. (1996). Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156, 3952–3960.
- Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M.F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., et al. (1999). Protective Role of Interleukin-10 in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 85.
- Mallat, Z., Gojova, A., Marchiol-Fournigault, C., Esposito, B., Kamaté, C., Merval, R., Fradelizi, D., and Tedgui, A. (2001). Inhibition of Transforming Growth Factor- β Signaling Accelerates Atherosclerosis and Induces an Unstable Plaque Phenotype in Mice. *Circ. Res.* 89, 930–934.
- Mallat, Z., Taleb, S., Ait-Oufella, H., and Tedgui, A. (2009). The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis: Fig. 1. *J. Lipid Res.* 50, S364–S369.
- Mann, D.L., McMurray, J.J.V., Packer, M., Swedberg, K., Borer, J.S., Colucci, W.S., Djian, J., Drexler, H., Feldman, A., Kober, L., et al. (2004). Targeted Anticytokine Therapy in Patients With Chronic Heart Failure: Results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation* 109, 1594–1602.
- Manz, M.G., Miyamoto, T., Akashi, K., and Weissman, I.L. (2002). Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11872–11877.
- Maratou, E., Dimitriadis, G., Kollias, A., Boutati, E., Lambadiari, V., Mitrou, P., and Raptis, S.A. (2007). Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells. *Eur. J. Clin. Invest.* 37, 282–290.

Chapitre 6. Bibliographie

- Maree, A.O., and Fitzgerald, D.J. (2007). Variable Platelet Response to Aspirin and Clopidogrel in Atherothrombotic Disease. *Circulation* 115, 2196–2207.
- Matsuura, E., Atzeni, F., Sarzi-Puttini, P., Turiel, M., Lopez, L.R., and Nurmohamed, M.T. (2014a). Is atherosclerosis an autoimmune disease? *BMC Med.* 12, 47.
- Matsuura, E., Atzeni, F., Sarzi-Puttini, P., Turiel, M., Lopez, L.R., and Nurmohamed, M.T. (2014b). Is atherosclerosis an autoimmune disease? *BMC Med.* 12, 47.
- Matthews, J.R., Wakasugi, N., virelizier, J.-L., Yodoi, J., and Hay, R.T. (1992). Thiordoxin regulates the DNA binding activity of NF- χ B by reduction of a disulphid bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res.* 20, 3821–3830.
- Mcgettrick, A. (2004). The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol. Immunol.* 41, 577–582.
- Mechetina, L., Najakshin, A., Alabyev, B., Chikaev, N., and Taranin, A. (2002). Identification of CD16-2, a novel mouse receptor homologous to CD16/Fc γ RIII. *Immunogenetics* 54, 463–468.
- Medeiros, R., Figueiredo, C.P., Passos, G.F., and Calixto, J.B. (2009). Reduced skin inflammatory response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Biochem. Pharmacol.* 78, 390–395.
- Meek, I.L., Van de Laar, M.A.F.J., and E. Vonkeman, H. (2010). Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Overview of Cardiovascular Risks. *Pharmaceuticals* 3, 2146–2162.
- Meng, X., Li, J., Yu, M., Yang, J., Zheng, M., Zhang, J., Sun, C., Liang, H., and Liu, L. (2018). Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing IL10 attenuates cardiac impairments in rats with myocardial infarction. *J. Cell. Physiol.* 233, 587–595.
- Merah-Mourah, F., Cohen, S.O., Charron, D., Mooney, N., and Haziot, A. (2020). Identification of Novel Human Monocyte Subsets and Evidence for Phenotypic Groups Defined by Interindividual Variations of Expression of Adhesion Molecules. *Sci. Rep.* 10, 4397.
- Michalek, R.D., Gerriets, V.A., Jacobs, S.R., Macintyre, A.N., MacIver, N.J., Mason, E.F., Sullivan, S.A., Nichols, A.G., and Rathmell, J.C. (2011). Cutting Edge: Distinct Glycolytic and Lipid Oxidative Metabolic Programs Are Essential for Effector and Regulatory CD4⁺ T Cell Subsets. *J. Immunol.* 186, 3299–3303.

Chapitre 6. Bibliographie

Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J. Immunol.* *164*, 6166–6173.

Miteva, K., Madonna, R., De Caterina, R., and Van Linthout, S. (2018). Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* *107*, 67–77.

Miyoshi, T., Li, Y., Shih, D.M., Wang, X., Laubach, V.E., Matsumoto, A.H., Helm, G.A., Luscis, A.J., and Shi, W. (2006). Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci.* *79*, 525–531.

Moncada, S., and Vane, J.R. (1979). Arachidonic Acid Metabolites and the Interactions between Platelets and Blood-Vessel Walls. *N. Engl. J. Med.* *300*, 1142–1147.

Morris, T., Stables, M., Hobbs, A., de Souza, P., Colville-Nash, P., Warner, T., Newson, J., Bellingan, G., and Gilroy, D.W. (2009). Effects of Low-Dose Aspirin on Acute Inflammatory Responses in Humans. *J. Immunol.* *183*, 2089–2096.

Mortier, J., Prévost, J.R.C., Sydow, D., Teuchert, S., Omieczynski, C., Bermudez, M., Frédérick, R., and Wolber, G. (2017). Arginase Structure and Inhibition: Catalytic Site Plasticity Reveals New Modulation Possibilities. *Sci. Rep.* *7*, 13616.

Mosig, S., Rennert, K., Büttner, P., Krause, S., Lütjohann, D., Soufi, M., Heller, R., and Funke, H. (2008). Monocytes of patients with familial hypercholesterolemia show alterations in cholesterol metabolism. *BMC Med. Genomics* *1*, 60.

Mukherjee, R., Kanti Barman, P., Kumar Thatoi, P., Tripathy, R., Kumar Das, B., and Ravindran, B. (2015). Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.* *5*, 13886.

Mukundan, L., Bishop, G.A., Head, K.Z., Zhang, L., Wahl, L.M., and Suttles, J. (2005). TNF Receptor-Associated Factor 6 Is an Essential Mediator of CD40-Activated Proinflammatory Pathways in Monocytes and Macrophages. *J. Immunol.* *174*, 1081–1090.

Munder, M. (2009). Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system: Arginase in the immune system. *Br. J. Pharmacol.* *158*, 638–651.

Munger, M.A., and Hawkins, D.W. (2004). Atherothrombosis: Epidemiology, Pathophysiology, and Prevention. *J. Am. Pharm. Assoc.* *44*, S5–S13.

Chapitre 6. Bibliographie

Muntean, D.M., Sturza, A., Dănilă, M.D., Borza, C., Duicu, O.M., and Mornoș, C. (2016). The Role of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Injury and Protective Strategies. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, 1–19.

Murtuza, B., Suzuki, K., Bou-Gharios, G., Beauchamp, J.R., Smolenski, R.T., Partridge, T.A., and Yacoub, M.H. (2004). Transplantation of skeletal myoblasts secreting an IL-1 inhibitor modulates adverse remodeling in infarcted murine myocardium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 4216–4221.

Nagai, T., Honda, S., Sugano, Y., Matsuyama, T., Ohta-Ogo, K., Asami, Y., Ikeda, Y., Kusano, K., Ishihara, M., Yasuda, S., et al. (2014). Decreased Myocardial Dendritic Cells is Associated With Impaired Reparative Fibrosis and Development of Cardiac Rupture After Myocardial Infarction in Humans. *J. Am. Heart Assoc.* 3.

Nagarajan, S., Chesla, S., Cobern, L., Anderson, P., Zhu, C., and Selvaraj, P. (1995). Ligand Binding and Phagocytosis by CD16 (Fc Receptor III) Isoforms: PHAGOCYTOTIC SIGNALING BY ASSOCIATED AND SUBUNITS IN CHINESE HAMSTER OVARY CELLS. *J. Biol. Chem.* 270, 25762–25770.

Nahrendorf, M., and Swirski, F.K. (2013). Monocyte and Macrophage Heterogeneity in the Heart. *Circ. Res.* 112, 1624–1633.

Nahrendorf, M., Swirski, F.K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J.-L., Libby, P., Weissleder, R., and Pittet, M.J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J. Exp. Med.* 204, 3037–3047.

Nahrendorf, M., Pittet, M.J., and Swirski, F.K. (2010). Monocytes: Protagonists of Infarct Inflammation and Repair After Myocardial Infarction. *Circulation* 121, 2437–2445.

Najac, C., Chaumeil, M.M., Kohanbash, G., Guglielmetti, C., Gordon, J.W., Okada, H., and Ronen, S.M. (2016). Detection of inflammatory cell function using ¹³C magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized [6-¹³C]-arginine. *Sci. Rep.* 6, 31397.

Neri, M., Fineschi, V., Paolo, M., Pomara, C., Riezzo, I., Turillazzi, E., and Cerretani, D. (2015a). Cardiac Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines Response after Myocardial Infarction. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 13, 26–36.

Chapitre 6. Bibliographie

- Neri, M., Fineschi, V., Paolo, M., Pomara, C., Riezzo, I., Turillazzi, E., and Cerretani, D. (2015b). Cardiac Oxidative Stress and Inflammatory Cytokines Response after Myocardial Infarction. *Curr. Vasc. Pharmacol.* *13*, 26–36.
- Nicola, N.A., and Metcalf, D. (1991). Subunit promiscuity among hemopoietic growth factor receptors. *Cell* *67*, 1–4.
- Niedergang, F., and Chavrier, P. (2004). Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr. Opin. Cell Biol.* *16*, 422–428.
- Nimmerjahn, F., Lux, A., Albert, H., Woigk, M., Lehmann, C., Dudziak, D., Smith, P., and Ravetch, J.V. (2010). Fc RIV deletion reveals its central role for IgG2a and IgG2b activity in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 19396–19401.
- Nouari, W., Ysmail-Dahlouk, L., and Aribi, M. (2016). Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Immunopharmacol.* *30*, 94–101.
- Oeckinghaus, A., and Ghosh, S. (2009). The NF- B Family of Transcription Factors and Its Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *1*, a000034–a000034.
- Oeth, P., and Mackman, N. (1995). Salicylates inhibit lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of the tissue factor gene in human monocytic cells. *Blood* *86*, 4144–4152.
- Ohira, T., Bannenberg, G., Arita, M., Takahashi, M., Ge, Q., Van Dyke, T.E., Stahl, G.L., Serhan, C.N., and Badwey, J.A. (2004). A Stable Aspirin-Triggered Lipoxin A₄ Analog Blocks Phosphorylation of Leukocyte-Specific Protein 1 in Human Neutrophils. *J. Immunol.* *173*, 2091–2098.
- O’Neill, L.A.J. (2008). The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol. Rev.* *226*, 10–18.
- O’Neill, L.A.J., Kishton, R.J., and Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 553–565.
- Ong, S.-B., Hernández-Reséndiz, S., Crespo-Avilan, G.E., Mukhametshina, R.T., Kwek, X.-Y., Cabrera-Fuentes, H.A., and Hausenloy, D.J. (2018). Inflammation following acute myocardial infarction: Multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities. *Pharmacol. Ther.* *186*, 73–87.

Chapitre 6. Bibliographie

O'Rourke, S.A., Dunne, A., and Monaghan, M.G. (2019). The Role of Macrophages in the Infarcted Myocardium: Orchestrators of ECM Remodeling. *Front. Cardiovasc. Med.* 6, 101.

Pabst, M.J., Pabst, K.M., Handsman, D.B., Beranova-Giorgianni, S., and Giorgianni, F. (2008). Proteome of monocyte priming by lipopolysaccharide, including changes in interleukin-1 β and leukocyte elastase inhibitor. *Proteome Sci.* 6, 13.

Page, T.H., Turner, J.J.O., Brown, A.C., Timms, E.M., Inglis, J.J., Brennan, F.M., Foxwell, B.M.J., Ray, K.P., and Feldmann, M. (2010). Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Increase TNF Production in Rheumatoid Synovial Membrane Cultures and Whole Blood. *J. Immunol.* 185, 3694–3701.

Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526.

Pålsson-McDermott, E.M., and O'Neill, L.A.J. (2020). Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. *Cell Res.* 30, 300–314.

Palsson-McDermott, E.M., Curtis, A.M., Goel, G., Lauterbach, M.A.R., Sheedy, F.J., Gleeson, L.E., van den Bosch, M.W.M., Quinn, S.R., Domingo-Fernandez, R., Johnston, D.G.W., et al. (2015). Pyruvate Kinase M2 Regulates Hif-1 α Activity and IL-1 β Induction and Is a Critical Determinant of the Warburg Effect in LPS-Activated Macrophages. *Cell Metab.* 21, 65–80.

Palucka, K.A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F., and Gluckman, J.C. (1999). Lipopolysaccharide can block the potential of monocytes to differentiate into dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 65, 232–240.

Panahi, M., Papanikolaou, A., Khan, H., Torabi, A., Cleland, J.G.F., Vadgama, N., Rosenthal, N.A., Harding, S., and Sattler, S. (2018). P2861A systematic review and meta-analysis of anti-cytokine therapies targeting IL-1 and TNF- A in myocardial infarction and heart failure. *Eur. Heart J.* 39.

Passacquale, G., Vamadevan, P., Pereira, L., Hamid, C., Corrigall, V., and Ferro, A. (2011). Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes. *PLoS One* 6, e25595.

Passlick, B., Flieger, D., and Ziegler-Heitbrock, H.W. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527–2534.

Chapitre 6. Bibliographie

- Patrignani, P., Tacconelli, S., Piazuolo, E., Di Francesco, L., Dovizio, M., Sostres, C., Marcantoni, E., Guillem-Llobat, P., Del Boccio, P., Zucchelli, M., et al. (2014). Reappraisal of the clinical pharmacology of low-dose aspirin by comparing novel direct and traditional indirect biomarkers of drug action. *J. Thromb. Haemost.* 12, 1320–1330.
- Patrono, C. (2015). The Multifaceted Clinical Readouts of Platelet Inhibition by Low-Dose Aspirin. *J. Am. Coll. Cardiol.* 66, 74–85.
- Patrono, C., García Rodríguez, L.A., Landolfi, R., and Baigent, C. (2005). Low-Dose Aspirin for the Prevention of Atherothrombosis. *N. Engl. J. Med.* 353, 2373–2383.
- Paul-Clark, M.J., van Cao, T., Moradi-Bidhendi, N., Cooper, D., and Gilroy, D.W. (2004). 15-epi-lipoxin A4-mediated Induction of Nitric Oxide Explains How Aspirin Inhibits Acute Inflammation. *J. Exp. Med.* 200, 69–78.
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., and Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23, 75–93.
- Pavanelli, W.R., Gutierrez, F.R.S., da Silva, J.J.N., Costa, I.C., de Menezes, M.C.N.D., Oliveira, F.J. de A., Itano, E.N., and Watanabe, M.A.E. (2010). The effects of nitric oxide on the immune response during giardiasis. *Braz. J. Infect. Dis.* 14, 606–612.
- Peet, C., Ivetic, A., Bromage, D.I., and Shah, A.M. (2019). Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* cvz336.
- Pence, B.D., and Yarbro, J.R. (2019). Classical monocytes maintain ex vivo glycolytic metabolism and early but not later inflammatory responses in older adults. *Immun. Ageing A* 16, 3.
- Pericone, C.D., Overweg, K., Hermans, P.W.M., and Weiser, J.N. (2000). Inhibitory and Bactericidal Effects of Hydrogen Peroxide Production by *Streptococcus pneumoniae* on Other Inhabitants of the Upper Respiratory Tract. *Infect. Immun.* 68, 3990–3997.
- Pick, E., and Keisari, Y. (1980). A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods* 38, 161–170.
- Pinderski Oslund, L.J., Hedrick, C.C., Olvera, T., Hagenbaugh, A., Territo, M., Berliner, J.A., and Fyfe, A.I. (1999). Interleukin-10 Blocks Atherosclerotic Events In Vitro and In Vivo. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2847–2853.

Chapitre 6. Bibliographie

Plaine, B., Bochaton, T., Paccalet, A., Crola-Da-Silva, C., Bonnefoy-Cudraz, E., Mewton, N., and Ovize, M. (2018). What are the effects of the guidelines-recommended treatments of myocardial infarction on the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines in an in vitro murin inflammatory model? *Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl.* 10, 221–222.

Podhasky, H.-P., Abate, A., Polte, T., Oberle, S., and Schröder, H. (1997). Aspirin protects endothelial cells from oxidative stress - possible synergism with vitamin E. *FEBS Lett.* 417, 349–351.

Poe, J.C., Wagner, D.H., Miller, R.W., Stout, R.D., and Suttles, J. (1997). IL-4 and IL-10 modulation of CD40-mediated signaling of monocyte IL-1 β synthesis and rescue from apoptosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 846–852.

Poltorak, A. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene. *Science* 282, 2085–2088.

Pong, T., and Huang, P.L. (2015). Effects of Nitric Oxide on Atherosclerosis. In *Atherosclerosis*, H. Wang, and C. Patterson, eds. (Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc), pp. 353–364.

Ponnuswamy, P., Ostermeier, E., Schröttle, A., Chen, J., Huang, P.L., Ertl, G., Nieswandt, B., and Kuhlencordt, P.J. (2009). Oxidative Stress and Compartment of Gene Expression Determine Proatherosclerotic Effects of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Am. J. Pathol.* 174, 2400–2410.

Prabhakar, S.S., Zeballos, G.A., Montoya-Zavala, M., and Leonard, C. (1997). Urea inhibits inducible nitric oxide synthase in macrophage cell line. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 273, C1882–C1888.

Prieto, P., Cuenca, J., Través, P.G., Fernández-Velasco, M., Martín-Sanz, P., and Boscá, L. (2010). Lipoxin A4 impairment of apoptotic signaling in macrophages: implication of the PI3K/Akt and the ERK/Nrf-2 defense pathways. *Cell Death Differ.* 17, 1179–1188.

Rao, K.M.K. (2000). MOLECULAR MECHANISMS REGULATING iNOS EXPRESSION IN VARIOUS CELL TYPES. *J. Toxicol. Environ. Health Part B* 3, 27–58.

Rath, M., MÃ¼ller, I., Kropf, P., Closs, E.I., and Munder, M. (2014). Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front. Immunol.* 5.

Chapitre 6. Bibliographie

Raza, H., John, A., and Shafarin, J. (2014). NAC Attenuates LPS-Induced Toxicity in Aspirin-Sensitized Mouse Macrophages via Suppression of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction. *PLoS ONE* 9, e103379.

Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T., and Skoultchi, A.I. (1999). Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev.* 13, 1398–1411.

Richardson, A., and Fedoroff, S. (1997). Quantification of Cells in Culture. In *Protocols for Neural Cell Culture*, S. Fedoroff, and A. Richardson, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 219–233.

Ridker, P.M., and Luscher, T.F. (2014). Anti-inflammatory therapies for cardiovascular disease. *Eur. Heart J.* 35, 1782–1791.

Robertson, A.-K.L., Rudling, M., Zhou, X., Gorelik, L., Flavell, R.A., and Hansson, G.K. (2003). Disruption of TGF- β signaling in T cells accelerates atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* 112, 1342–1350.

Rodríguez-Prados, J.-C., Través, P.G., Cuenca, J., Rico, D., Aragonés, J., Martín-Sanz, P., Cascante, M., and Boscá, L. (2010). Substrate Fate in Activated Macrophages: A Comparison between Innate, Classic, and Alternative Activation. *J. Immunol.* 185, 605–614.

Rogacev, K.S., Seiler, S., Zawada, A.M., Reichart, B., Herath, E., Roth, D., Ulrich, C., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur. Heart J.* 32, 84–92.

Rogacev, K.S., Cremers, B., Zawada, A.M., Seiler, S., Binder, N., Ege, P., Große-Dunker, G., Heisel, I., Hornof, F., Jeken, J., et al. (2012). CD14⁺⁺CD16⁺ Monocytes Independently Predict Cardiovascular Events. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60, 1512–1520.

Romano, E., Kusio-Kobialka, M., Foukas, P.G., Baumgaertner, P., Meyer, C., Ballabeni, P., Michielin, O., Weide, B., Romero, P., and Speiser, D.E. (2015). Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 6140–6145.

Rossol, M., Kraus, S., Pierer, M., Baerwald, C., and Wagner, U. (2012). The CD14^{bright} CD16⁺ monocyte subset is expanded in rheumatoid arthritis and promotes expansion of the Th17 cell population: Monocyte Subset Promotes Th17 Cell Expansion in RA. *Arthritis Rheum.* 64, 671–677.

Chapitre 6. Bibliographie

Rouzer, C.A., and Marnett, L.J. (2009). Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J. Lipid Res.* 50, S29–S34.

Russo, G., Leopold, J.A., and Loscalzo, J. (2002). Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascul. Pharmacol.* 38, 259–269.

Sage, A.P., Tsiantoulas, D., Binder, C.J., and Mallat, Z. (2019). The role of B cells in atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 16, 180–196.

Sager, H.B., Heidt, T., Hulsmans, M., Dutta, P., Courties, G., Sebas, M., Wojtkiewicz, G.R., Tricot, B., Iwamoto, Y., Sun, Y., et al. (2015). Targeting Interleukin-1 β Reduces Leukocyte Production After Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 132, 1880–1890.

Saha, A., Biswas, A., Srivastav, S., Mukherjee, M., Das, P.K., and Ukil, A. (2014). Prostaglandin E₂ Negatively Regulates the Production of Inflammatory Cytokines/Chemokines and IL-17 in Visceral Leishmaniasis. *J. Immunol.* 193, 2330–2339.

Saha, A.K., Osmulski, P., Dallo, S.F., Gaczynska, M., Huang, T.H.-M., and Ramasubramanian, A.K. (2017a). Cholesterol Regulates Monocyte Rolling through CD44 Distribution. *Biophys. J.* 112, 1481–1488.

Saha, A.K., Dallo, S.F., Detmar, A.L., Osmulski, P., Gaczynska, M., Huang, T.H.-M., and Ramasubramanian, A.K. (2017b). Cellular cholesterol regulates monocyte deformation. *J. Biomech.* 52, 83–88.

Saha, A.K., Mousavi, M., Dallo, S.F., Evani, S.J., and Ramasubramanian, A.K. (2018). Influence of membrane cholesterol on monocyte chemotaxis. *Cell. Immunol.* 324, 74–77.

Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109–1118.

Salvemini, D., Kim, S.F., and Mollace, V. (2013). Reciprocal regulation of the nitric oxide and cyclooxygenase pathway in pathophysiology: relevance and clinical implications. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R473–R487.

Sampath, P., Moideen, K., Ranganathan, U.D., and Bethunaickan, R. (2018). Monocyte Subsets: Phenotypes and Function in Tuberculosis Infection. *Front. Immunol.* 9, 1726.

Santiago-Fernández, C., Pérez-Belmonte, L.M., Millán-Gómez, M., Moreno-Santos, I., Carrasco-Chinchilla, F., Ruiz-Salas, A., Morcillo-Hidalgo, L., Melero, J.M., Garrido-Sánchez,

Chapitre 6. Bibliographie

L., and Jiménez-Navarro, M. (2019). Overexpression of scavenger receptor and infiltration of macrophage in epicardial adipose tissue of patients with ischemic heart disease and diabetes. *J. Transl. Med.* 17, 95.

Sasaki, N., Yamashita, T., Takeda, M., Shinohara, M., Nakajima, K., Tawa, H., Usui, T., and Hirata, K. (2009). Oral Anti-CD3 Antibody Treatment Induces Regulatory T Cells and Inhibits the Development of Atherosclerosis in Mice. *Circulation* 120, 1996–2005.

Satriano, J. (2004). Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines: Review article. *Amino Acids* 26.

Saxena, A., Chen, W., Su, Y., Rai, V., Uche, O.U., Li, N., and Frangogiannis, N.G. (2013). IL-1 Induces Proinflammatory Leukocyte Infiltration and Regulates Fibroblast Phenotype in the Infarcted Myocardium. *J. Immunol.* 191, 4838–4848.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.

Schroecksadel, K., Winkler, C., Wirleitner, B., Schennach, H., and Fuchs, D. (2005). Aspirin down-regulates tryptophan degradation in stimulated human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Clin. Exp. Immunol.* 140, 41–45.

Schrör, K. (1997). Aspirin and Platelets: The Antiplatelet Action of Aspirin and Its Role in Thrombosis Treatment and Prophylaxis. *Semin. Thromb. Hemost.* 23, 349–356.

Scott, E., Simon, M., Anastasi, J., and Singh, H. (1994). Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science* 265, 1573–1577.

Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V., and Amigorena, S. (2013). Human Inflammatory Dendritic Cells Induce Th17 Cell Differentiation. *Immunity* 38, 336–348.

Serhan, C.N. (2008). Controlling the Resolution of Acute Inflammation: A New Genus of Dual Anti-Inflammatory and Proresolving Mediators. *J. Periodontol.* 79, 1520–1526.

Serhan, C.N., and Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.* 6, 1191–1197.

Serhan, C.N., Clish, C.B., Brannon, J., Colgan, S.P., Chiang, N., and Gronert, K. (2000a). Novel Functional Sets of Lipid-Derived Mediators with Antiinflammatory Actions Generated

Chapitre 6. Bibliographie

from Omega-3 Fatty Acids via Cyclooxygenase 2–Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs and Transcellular Processing. *J. Exp. Med.* 192, 1197–1204.

Serhan, C.N., Levy, B.D., Clish, C.B., Gronert, K., and Chiang, N. (2000b). Lipoxins, Aspirin-Triggered 15-epi-Lipoxin Stable Analogs and Their Receptors in Anti-Inflammation: A Window for Therapeutic Opportunity. In *Advances in Eicosanoid Research*, C.N. Serhan, and H.D. Perez, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 143–185.

Shackelford, R.E., Alford, P.B., Xue, Y., Thai, S.-F., Adams, D.O., and Pizzo, S. (1997). Aspirin Inhibits Tumor Necrosis Factor - α Gene Expression in Murine Tissue Macrophages. *Mol. Pharmacol.* 52, 421–429.

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S.-A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J.T., and Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J. Cell. Physiol.* 233, 6425–6440.

Sharma-walia, N., and Chandrasekharan, J. (2015). Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. *J. Inflamm. Res.* 181.

Shetelig, C., Limalanathan, S., Hoffmann, P., Seljeflot, I., Gran, J.M., Eritsland, J., and Andersen, G.Ø. (2018). Association of IL-8 With Infarct Size and Clinical Outcomes in Patients With STEMI. *J. Am. Coll. Cardiol.* 72, 187–198.

Shi, L.Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D.R., and Chi, H. (2011). HIF1 α -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J. Exp. Med.* 208, 1367–1376.

Shirai, T., Nazarewicz, R.R., Wallis, B.B., Yanes, R.E., Watanabe, R., Hilhorst, M., Tian, L., Harrison, D.G., Giacomini, J.C., Assimes, T.L., et al. (2016). The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. *J. Exp. Med.* 213, 337–354.

Shive, C.L., Jiang, W., Anthony, D.D., and Lederman, M.M. (2015). Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation: *AIDS* 29, 1263–1265.

Shreshtha, S., Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., and Singh, S. (2018). Nitric Oxide: It's Role in Immunity. *J. Clin. Diagn. Res.*

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787–795.

Chapitre 6. Bibliographie

da Silva, T.A., Zorzetto-Fernandes, A.L.V., Cecilio, N.T., Sardinha-Silva, A., Fernandes, F.F., and Roque-Barreira, M.C. (2017). CD14 is critical for TLR2-mediated M1 macrophage activation triggered by N-glycan recognition. *Sci. Rep.* 7, 7083.

Silveira, A., McLeod, O., Strawbridge, R.J., Gertow, K., Sennblad, B., Baldassarre, D., Veglia, F., Deleskog, A., Persson, J., Leander, K., et al. (2015). Plasma IL-5 concentration and subclinical carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 239, 125–130.

Singer, I., Kawka, D., Scott, S., Weidner, J., Mumford, R., Riehl, T., and Stenson, W. (1996). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111, 871–885.

Sivaramakrishnan, V., Bidula, S., Campwala, H., Katikaneni, D., and Fountain, S.J. (2012). Constitutive lysosome exocytosis releases ATP and engages P2Y receptors in human monocytes. *J. Cell Sci.* 125, 4567–4575.

Skrzeczyńska-Moncznik, J., Bzowska, M., Lośseke, S., Grage-Griebenow, E., Zembala, M., and Pryjma, J. (2008). Peripheral Blood CD14^{high} CD16⁺ Monocytes are Main Producers of IL-10. *Scand. J. Immunol.* 67, 152–159.

Slavic, S., Andrukhova, O., Ford, K., Handschuh, S., Latic, N., Reichart, U., Sasgary, S., Bergow, C., Hofbauer, L.C., Kostenuik, P.J., et al. (2018). Selective inhibition of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) in hematopoietic cells improves outcome after experimental myocardial infarction. *J. Mol. Med.* 96, 559–573.

Smedman, C., Ernemar, T., Gudmundsdotter, L., Gille-Johnson, P., Somell, A., Nihlmark, K., Gårdlund, B., Andersson, J., and Paulie, S. (2012). FluoroSpot Analysis of TLR-Activated Monocytes Reveals Several Distinct Cytokine-Secreting Subpopulations: FluoroSpot Analysis of Human Monocytes. *Scand. J. Immunol.* 75, 249–258.

Somasuntharam, I., Yehl, K., Carroll, S.L., Maxwell, J.T., Martinez, M.D., Che, P.-L., Brown, M.E., Salaita, K., and Davis, M.E. (2016). Knockdown of TNF- α by DNAzyme gold nanoparticles as an anti-inflammatory therapy for myocardial infarction. *Biomaterials* 83, 12–22.

Son, Y., Cheong, Y.-K., Kim, N.-H., Chung, H.-T., Kang, D.G., and Pae, H.-O. (2011). Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J. Signal Transduct.* 2011, 1–6.

Chapitre 6. Bibliographie

- Song, Y., Zhang, L.-J., Li, H., Gu, Y., Li, F.-F., Jiang, L.-N., Liu, F., Ye, J., and Li, Q. (2013). Polyunsaturated fatty acid relatively decreases cholesterol content in THP-1 macrophage-derived foam cell: partly correlates with expression profile of CIDE and PAT members. *Lipids Health Dis.* 12, 111.
- Steer, K.A., Wallace, T.M., Bolton, C.H., and Hartog, M. (1997). Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification. *Heart* 77, 333–337.
- Stern-Ginossar, N., and Mandelboim, O. (2010). Receptors on NK cells. In *Natural Killer Cells*, (Elsevier), pp. 155–168.
- Stout, R.D., and Suttles, J. (1996a). The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol. Today* 17, 487–492.
- Stout, R.D., and Suttles, J. (1996b). The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol. Today* 17, 487–492.
- Stout, R.D., Suttles, J., Xu, J., Grewal, I.S., and Flavell, R.A. (1996a). Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156, 8–11.
- Stout, R.D., Suttles, J., Xu, J., Grewal, I.S., and Flavell, R.A. (1996b). Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 156, 8–11.
- Strober, W. (2015). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* 111.
- Stuehr, D.J. (1999). Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1411, 217–230.
- Sun, S.-C. (2011). Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* 21, 71–85.
- Sun, S.-C., Chang, J.-H., and Jin, J. (2013). Regulation of nuclear factor- κ B in autoimmunity. *Trends Immunol.* 34, 282–289.
- Suzuki, K., Murtuza, B., Smolenski, R.T., Sammut, I.A., Suzuki, N., Kaneda, Y., and Yacoub, M.H. (2001). Overexpression of Interleukin-1 Receptor Antagonist Provides Cardioprotection Against Ischemia-Reperfusion Injury Associated With Reduction in Apoptosis. *Circulation* 104, I-308–I-313.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of

Chapitre 6. Bibliographie

Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* 325, 612–616.

Szabolcs, M.J., Cannon, P.J., Thienel, U., Chen, R., Michler, R.E., Chess, L., and Yellin, M.J. (2000). Analysis of CD154 and CD40 expression in native coronary atherosclerosis and transplant associated coronary artery disease. *Virchows Arch.* 437, 149–159.

Tak, T., van Groenendael, R., Pickkers, P., and Koenderman, L. (2017). Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia. *J. Innate Immun.* 9, 464–474.

Takada, Y., Mukhopadhyay, A., Kundu, G.C., Mahabeleshwar, G.H., Singh, S., and Aggarwal, B.B. (2003). Hydrogen Peroxide Activates NF- κ B through Tyrosine Phosphorylation of I κ B α and Serine Phosphorylation of p65: EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF I κ B α KINASE AND Syk PROTEIN-TYROSINE KINASE. *J. Biol. Chem.* 278, 24233–24241.

Takeda, K., and Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Semin. Immunol.* 16, 3–9.

Tamura, T., Nagamura-Inoue, T., Shmeltzer, Z., Kuwata, T., and Ozato, K. (2000). ICSBP Directs Bipotential Myeloid Progenitor Cells to Differentiate into Mature Macrophages. *Immunity* 13, 155–165.

Tannahill, G.M., Curtis, A.M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E.M., McGettrick, A.F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N.J., Kelly, B., Foley, N.H., et al. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 β through HIF-1 α . *Nature* 496, 238–242.

Tay, M.Z., Wiehe, K., and Pollara, J. (2019). Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis in Antiviral Immune Responses. *Front. Immunol.* 10, 332.

Tedgui, A., and Mallat, Z. (2006). Cytokines in Atherosclerosis: Pathogenic and Regulatory Pathways. *Physiol. Rev.* 86, 515–581.

Terry, R.L., and Miller, S.D. (2014). Molecular control of monocyte development. *Cell. Immunol.* 291, 16–21.

Tian, L., Noelle, R.J., and Lawrence, D.A. (1995a). Activated T cells enhance nitric oxide production by murine splenic macrophages through gp39 and LFA-1. *Eur. J. Immunol.* 25, 306–309.

Chapitre 6. Bibliographie

- Tian, L., Noelle, R.J., and Lawrence, D.A. (1995b). Activated T cells enhance nitric oxide production by murine splenic macrophages through gp39 and LFA-1. *Eur. J. Immunol.* *25*, 306–309.
- Tian, M., Yuan, Y.-C., Li, J.-Y., Gionfriddo, M.R., and Huang, R.-C. (2015). Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review. *Chronic Dis. Transl. Med.* *1*, 18–26.
- Timmers, L., Pasterkamp, G., de Hoog, V.C., Arslan, F., Appelman, Y., and de Kleijn, D.P.V. (2012). The innate immune response in reperfused myocardium. *Cardiovasc. Res.* *94*, 276–283.
- Toldo, S., Van Tassell, B.W., and Abbate, A. (2017). Interleukin-1 Blockade in Acute Myocardial Infarction and Heart Failure. *JACC Basic Transl. Sci.* *2*, 431–433.
- Tolouei Semnani, R., Moore, V., Bennuru, S., McDonald-Fleming, R., Ganesan, S., Cotton, R., Anuradha, R., Babu, S., and Nutman, T.B. (2014). Human Monocyte Subsets at Homeostasis and Their Perturbation in Numbers and Function in Filarial Infection. *Infect. Immun.* *82*, 4438–4446.
- Tsiantoulas, D., Diehl, C.J., Witztum, J.L., and Binder, C.J. (2014). B Cells and Humoral Immunity in Atherosclerosis. *Circ. Res.* *114*, 1743–1756.
- Tsujioka, H., Imanishi, T., Ikejima, H., Kuroi, A., Takarada, S., Tanimoto, T., Kitabata, H., Okochi, K., Arita, Y., Ishibashi, K., et al. (2009). Impact of heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* *54*, 130–138.
- Undas, A., Brummel-Ziedins, K.E., and Mann, K.G. (2007). Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood* *109*, 2285–2292.
- Urbanski, K., Ludew, D., Filip, G., Filip, M., Sagan, A., Szczepaniak, P., Grudzien, G., Sadowski, J., Jasiewicz-Honkisz, B., Sliwa, T., et al. (2017). CD14+CD16++ “nonclassical” monocytes are associated with endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Thromb. Haemost.* *117*, 971–980.
- Ushikubi, F., Segi, E., Sugimoto, Y., Murata, T., Matsuoka, T., Kobayashi, T., Hizaki, H., Tuboi, K., Katsuyama, M., Ichikawa, A., et al. (1998). Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* *395*, 281–284.

Chapitre 6. Bibliographie

Van Tassel, B.W., Toldo, S., Mezzaroma, E., and Abbate, A. (2013). Targeting Interleukin-1 in Heart Disease. *Circulation* 128, 1910–1923.

Vazquez-Medina, J.P. (2018). Redox Signaling and the Onset of the Inflammatory Cascade. In *Immunity and Inflammation in Health and Disease*, (Elsevier), pp. 37–42.

Vig, M., and Kinet, J.-P. (2009). Calcium signaling in immune cells. *Nat. Immunol.* 10, 21–27.

Voisard, R., Fischer, R., Oßwald, M., Voglic, S., Baur, R., Susa, M., Koenig, W., and Hombach, V. (2001). Aspirin (5 mmol/L) Inhibits Leukocyte Attack and Triggered Reactive Cell Proliferation in a 3D Human Coronary In Vitro Model. *Circulation* 103, 1688–1694.

Vrhovac Madunic, I., Breljak, D., and Sabolic, I. (2014). Glucose transporters in the mammalian blood cells. *Period. Biol.* 116, 61–131.

Wahl, L.M., Wahl, S.M., Smythies, L.E., and Smith, P.D. (2005). Isolation of Human Monocyte Populations. *Curr. Protoc. Immunol.* 70.

Wang, S., Deng, S., Cao, Y., Zhang, R., Wang, Z., Jiang, X., Wang, J., Zhang, X., Zhang, J., Liu, G., et al. (2018). Overexpression of Toll-Like Receptor 4 Contributes to Phagocytosis of ***Salmonella Enterica*** Serovar Typhimurium via Phosphoinositide 3-Kinase Signaling in Sheep. *Cell. Physiol. Biochem.* 49, 662–677.

Wang, Z., Kong, L., Kang, J., Vaughn, D.M., Bush, G.D., Walding, A.L., Grigorian, A.A., Robinson, J.S., and Nakayama, D.K. (2011). Interleukin-1 β Induces Migration of Rat Arterial Smooth Muscle Cells Through a Mechanism Involving Increased Matrix Metalloproteinase-2 Activity. *J. Surg. Res.* 169, 328–336.

Watanabe, N., and Ikeda, U. (2004). Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Curr. Atheroscler. Rep.* 6, 112–120.

Weber, C., Erl, W., Pietsch, A., and Weber, P.C. (1995). Aspirin Inhibits Nuclear Factor- κ B Mobilization and Monocyte Adhesion in Stimulated Human Endothelial Cells. *Circulation* 91, 1914–1917.

Winkels, H., Meiler, S., Lievens, D., Engel, D., Spitz, C., Bürger, C., Beckers, L., Dandl, A., Reim, S., Ahmadsei, M., et al. (2017). CD27 co-stimulation increases the abundance of regulatory T cells and reduces atherosclerosis in hyperlipidaemic mice. *Eur. Heart J.* 38, 3590–3599.

Chapitre 6. Bibliographie

- Winocour, P.D., Watala, C., Perry, D.W., and Kinlough-Rathbone, R.L. (1992). Decreased Platelet Membrane Fluidity Due to Glycation or Acetylation of Membrane Proteins. *Thromb. Haemost.* 68, 577–582.
- Wittmann, C., Chockley, P., Singh, S.K., Pase, L., Lieschke, G.J., and Grabher, C. (2012). Hydrogen Peroxide in Inflammation: Messenger, Guide, and Assassin. *Adv. Hematol.* 2012, 1–6.
- Witztum, J., Binder, C., Chou, M.-Y., Fogelstrand, L., Hartvigsen, K., Shaw, P., and Boullier, A. (2008). Natural Antibodies in Murine Atherosclerosis. *Curr. Drug Targets* 9, 190–195.
- Wolf, D., and Ley, K. (2019). Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. *Circ. Res.* 124, 315–327.
- Wolf, A.A., Yáñez, A., Barman, P.K., and Goodridge, H.S. (2019). The Ontogeny of Monocyte Subsets. *Front. Immunol.* 10, 1642.
- Wong, K.L., Tai, J.J.-Y., Wong, W.-C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.-H., Kourilsky, P., and Wong, S.-C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 118, e16–e31.
- Wong, K.L., Yeap, W.H., Tai, J.J.Y., Ong, S.M., Dang, T.M., and Wong, S.C. (2012). The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol. Res.* 53, 41–57.
- Woollard, A.C.S., Wolff, S.P., and Bascal, Z.A. (1990). Antioxidant characteristics of some potential anticataract agents. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 299–305.
- Worthley, M.I., Prabhu, A., De Sciscio, P., Schultz, C., Sanders, P., and Willoughby, S.R. (2010). Detrimental Effects of Energy Drink Consumption on Platelet and Endothelial Function. *Am. J. Med.* 123, 184–187.
- Wu, H., Gower, R.M., Wang, H., Perrard, X.-Y.D., Ma, R., Bullard, D.C., Burns, A.R., Paul, A., Smith, C.W., Simon, S.I., et al. (2009). Functional Role of CD11c⁺ Monocytes in Atherogenesis Associated With Hypercholesterolemia. *Circulation* 119, 2708–2717.
- Wu, R., Lamontagne, D., and de Champlain, J. (2002). Antioxidative Properties of Acetylsalicylic Acid on Vascular Tissues From Normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats. *Circulation* 105, 387–392.

Chapitre 6. Bibliographie

Wu, X., Chen, Z., Yang, Y., Dong, Y., Liu, H., Kuang, S., and Luo, K. (2018). Impact of proteasome inhibitor MG-132 on expression of NF- κ B, IL-1 β and histological remodeling after myocardial infarction. *Exp. Ther. Med.*

Wynn, T.A., Barron, L., Thompson, R.W., Madala, S.K., Wilson, M.S., Cheever, A.W., and Ramalingam, T. (2011). Quantitative Assessment of Macrophage Functions in Repair and Fibrosis. In *Current Protocols in Immunology*, J.E. Coligan, B.E. Bierer, D.H. Margulies, E.M. Shevach, and W. Strober, eds. (Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.), p. im1422s93.

Xie, H., Ye, M., Feng, R., and Graf, T. (2004). Stepwise Reprogramming of B Cells into Macrophages. *Cell* 117, 663–676.

Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T., and Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256, 225–228.

Xie, Q.W., Whisnant, R., and Nathan, C. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177, 1779–1784.

Xie, Q.W., Kashiwabara, Y., and Nathan, C. (1994). Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 4705–4708.

Yáñez, A., Coetzee, S.G., Olsson, A., Muench, D.E., Berman, B.P., Hazelett, D.J., Salomonis, N., Grimes, H.L., and Goodridge, H.S. (2017). Granulocyte-Monocyte Progenitors and Monocyte-Dendritic Cell Progenitors Independently Produce Functionally Distinct Monocytes. *Immunity* 47, 890-902.e4.

Yang, Z., and Ming, X.-F. (2014). Functions of Arginase Isoforms in Macrophage Inflammatory Responses: Impact on Cardiovascular Diseases and Metabolic Disorders. *Front. Immunol.* 5.

Yang, Z., Zingarelli, B., and Szabó, C. (2000). Crucial Role of Endogenous Interleukin-10 Production in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation* 101, 1019–1026.

Yao, L., Huang, K., Huang, D., Wang, J., Guo, H., and Liao, Y. (2008). Acute myocardial infarction induced increases in plasma tumor necrosis factor- α and interleukin-10 are associated with the activation of poly(ADP-ribose) polymerase of circulating mononuclear cell. *Int. J. Cardiol.* 123, 366–368.

Chapitre 6. Bibliographie

Yasa, M., and Türkseven, S. (2005). Vasoprotective effects of nitric oxide in atherosclerosis. *FABAD J. Pharm. Sci.* 30, 41.

Yeap, W.H., Wong, K.L., Shimasaki, N., Teo, E.C.Y., Quek, J.K.S., Yong, H.X., Diong, C.P., Bertoletti, A., Linn, Y.C., and Wong, S.C. (2016). CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* 6, 34310.

Yin, M.-J., Yamamoto, Y., and Gaynor, R.B. (1998). The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β . *Nature* 396, 77–80.

Yu, H.-R., Wei, Y.-Y., Ma, J.-G., and Geng, X.-Y. (2018). Beneficial effects of combined administration of Clopidogrel and Aspirin on the levels of proinflammatory cytokines, cardiac function, and prognosis in ST-segment elevation myocardial infarction: A comparative study. *Medicine (Baltimore)* 97, e13010.

Zawada, A.M., Rogacev, K.S., Rotter, B., Winter, P., Marell, R.-R., Fliser, D., and Heine, G.H. (2011). SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118, e50–e61.

Zeng, S., Zhou, X., Ge, L., Ji, W.-J., Shi, R., Lu, R.-Y., Sun, H.-Y., Guo, Z.-Z., Zhao, J.-H., Jiang, T.-M., et al. (2014). Monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in patients with unstable angina. *J. Thromb. Thrombolysis* 38, 439–446.

Zhang, D.-E., Zhang, P., Wang, N. -d., Hetherington, C.J., Darlington, G.J., and Tenen, D.G. (1997). Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein -deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 569–574.

Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-aswapati, N., Radomska, H.S., Auron, P.E., Tenen, D.G., and Sun, Z. (1999). Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 8705–8710.

Zhang, X., Zhang, J., Zhang, R., Guo, Y., Wu, C., Mao, X., Guo, G., Zhang, Y., Li, D., and Zou, Q. (2013). Structural, enzymatic and biochemical studies on *Helicobacter pylori* arginase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 995–1002.

Zhang, Y., Ren, Y., Mu, L., Huang, J., Bai, C.-C., and Du, G. (2017). Associations among interleukin-17, interferon-gamma, and acute coronary syndrome. *Biomed. Res.* 28.

Chapitre 6. Bibliographie

Zhou, L., Somasundaram, R., Nederhof, R.F., Dijkstra, G., Faber, K.N., Peppelenbosch, M.P., and Fuhler, G.M. (2012). Impact of Human Granulocyte and Monocyte Isolation Procedures on Functional Studies. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 1065–1074.

Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D.N., Leenen, P.J.M., Liu, Y.-J., MacPherson, G., Randolph, G.J., et al. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116, e74–e80.

Zlatanova, I., Pinto, C., and Silvestre, J.-S. (2016). Immune Modulation of Cardiac Repair and Regeneration: The Art of Mending Broken Hearts. *Front. Cardiovasc. Med.* 3.

Zubko, E.I., and Zubko, M.K. (2013). Co-operative inhibitory effects of hydrogen peroxide and iodine against bacterial and yeast species. *BMC Res. Notes* 6, 272.

(1988). Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet Lond. Engl.* 2, 349–360.

(1994). Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration. *BMJ* 308, 81–106.

(2009). Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *The Lancet* 373, 1849–1860.

(2012). Phagocytosis and Intracellular Killing. In *Immunology for Pharmacy*, (Elsevier), pp. 97–101.



Aspirin enhances regulatory functional activities of monocytes and downregulates CD16 and CD40 expression in myocardial infarction autoinflammatory disease

Imène Belhassena^a, Wafa Nouari^a, Aida Messaoud^a, Mouna Nouar^a, Mohamed Brahimi^b, Sid-Ahmed Chawki Lamara^c, Mourad Aribi^{a,*}

^a Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, BioMolIm, W0414100, University of Tlemcen, 13000 Tlemcen, Algeria

^b EHU "1er Novembre 1954" - Hemobiology, Oran, Algeria

^c Department of Biotechnology, University of Oran, 1 Ahmed Ben Bella, 31000 Oran, Algeria

ARTICLE INFO

Keywords:

Aspirin
Human monocyte CD16 (FcRγIIIa) and CD40 expression
Immunomodulation
Monocyte phenotypes and functional activities
Myocardial infarction autoinflammatory disease

ABSTRACT

Background: Exacerbation of CD16 as molecule marker of both intermediate and non-classical monocytes (MOs) has been shown to be involved in the pathogenesis of myocardial infarction (MI). In this study, we have tried to evaluate the aspirin (acetylsalicylic acid, ASA) treatment effect on the CD16-expressed MOs and activation-associated CD40 in MI.

Methods: MOs were isolated from the whole blood of healthy controls and patients with MI. The cells were stimulated and treated with different doses of ASA.

Results: ASA significantly decreased nitric oxide (NO) production and inducible NO synthase (iNOS) activity, but significantly increased arginase activity. Levels of interleukin (IL)-1β, IL-6 and interferon-γ (IFN-γ) were downregulated, whereas those of IL-10 were upregulated. Additionally, ASA induced a markedly increase in both phagocytosis and intracellular pathogen killing activities. Moreover, ASA treatment induced significantly up-regulation of intracellular levels of glucose (Glu), and free calcium ions (Ca²⁺), and, covertly, significantly downregulation of total cellular cholesterol content (tccCHOL). Furthermore, the expression levels of CD16 and CD40 were significantly downregulated in ASA-treated MOs.

Conclusions: We show for the first time that ASA immunomodulates the functional activities of MOs during MI and promotes their switching toward a classical phenotype, exhibiting low CD16 expression levels and thereby anti-inflammatory properties.

1. Introduction

MI corresponds to the necrosis of cardiac muscle cells resulting from coronary artery retraction and lack of oxygenation in the myocardium. The physiopathological mechanism of MI involves atherosclerosis [1], i.e., a chronic auto-inflammatory disease of the artery walls irrigating the heart [2]. Of note, innate immune cells play a key role in the proinflammatory process associated to the disease, given their ability of T-cells autoactivation, through various ways, including cell–cell cross-talk and cytokines release.

More recently, it has been reported that CD16 expression on MOs surface is increased on day 5 of MI [3] and is required for MO platelet aggregation (MPA) [4]. As noticed, CD16 molecule is present with

CD14 on cell surface of non-classical and intermediate MOs that both are inculcated in the pathogenesis of MI [5,6].

Several drugs, like ASA have been reported to have a marked effect to establish anti-inflammatory conditions in MI [7]. Its cardio-protective effect at low dose is possibly due not only to its anti-inflammatory properties, but also to its anti-thrombotic effect [8–10]. It has been reported that its ability to reduce inflammatory conditions is mainly related to its downstream inhibition of proinflammatory cytokines, as well as of adhesion molecules [11].

In the current study, we aimed to evaluate the *ex vivo* effect of ASA on overall functional activities of MOs and on the expression levels of CD16/FcRγIIIa, as well as of CD40 as a costimulatory molecule involved in MOs activation and production of proinflammatory cytokines

* Corresponding author at: Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology, W0414100, Imama-Mansourah, Rcade # 2, University of Tlemcen, PO Box: 262, Imama-Mansourah, Tlemcen, 13000, Algeria. Department of Biology, University of Tlemcen, PO Box: 262, Imama-Mansourah, Tlemcen, 13000, Algeria.

E-mail address: mourad.aribi@univ-tlemcen.dz (M. Aribi).

<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106349>

Received 8 December 2019; Received in revised form 20 February 2020; Accepted 24 February 2020

1567-5769/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

during MI.

2. Materials and methods

2.1. Study design and cell sampling

MOs were provided from voluntary patients with ST-elevation MI (STEMI) and age-, gender- matched healthy control donors. Patients and subjects had no change in diurnal rhythms, as well as the number of agranulocytes, including circulating MOs, after MI at time point of blood collection. Exclusion criteria were especially severe metabolic disorders, including diabetes, inflammatory diseases, cancers or renal or hepatic impairment. Participants gave written informed consent and the study protocol was approved by the Ethics Committee of Tlemcen University. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by centrifugation on density gradient from whole blood. MOs were isolated from PBMCs by plastic adherence method. Supernatants and cell lysates were recovered after stimulation with LPS in the absence or in the presence of different doses of ASA. Levels of NO production, IL-1 β , IL-6, IL-10 and IFN- γ were measured on the supernatants, and lysates were used to measure the arginase activity, H₂O₂ production and levels of i Glu, i Ca²⁺ and tcc CHOL. Phagocytosis and bacterial killing were performed on a mixture of MOs, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and ASA. iNOS activity was measured using levels of NO and relative proteins. The expression levels of CD14, CD16, and CD40 on the surface of live ASA-treated MOs was evaluated by direct immunofluorescence using a Floid Cell Imaging Station. Each experiment was repeated independently at least 4 times. The design of this study is summarized in Fig. 1.

2.2. Isolation of MOs and cell culture

PBMCs were isolated by density gradient centrifugation using Histopaque (1.077 g ml⁻¹; Sigma-Aldrich, Munich, Germany), and

cultured at 37 °C and 5% CO₂ with humid atmosphere in RPMI 1640 medium, supplemented with 2 mM L-glutamine, 50 μ g/mL gentamycin and 10% fetal bovine serum (FBS) [12]. MOs were isolated from PBMCs by differential plastic adherence method [13]. The non-adherent cells were removed and adherent MOs subjected to ASA treatment. Quantification of cell viability was assessed by light microscopy (Zeiss, Germany) using Trypan Blue Exclusion Test (TBET) [14], and the purity of MOs was exceeded 90% as demonstrated by fluorescent staining with phycoerythrin (PE)-conjugated mouse antihuman CD14 (clone MEM-18 by Sigma-Aldrich) using a Floid Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, MA USA) [15,16]. 2 \times 10⁵ MOs were stimulated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂ with LPS at 10 ng/mL and treated simultaneously with different ASA doses (0 μ M, 10 μ M, 100 μ M and 1000 μ M) [17]. Cell-free supernatants were collected and stored at -80 °C until analyses.

2.3. MOs lysis

MOs were lysed with 0.1% Triton X-100 for 30 min for determining the levels of proteins, i Ca²⁺, tcc CHOL, i Glu and arginase activity. Reaction was stopped with a mixture of Tris-HCl (25 mM, pH = 7.4) and MnCl₂ (5 mM) [18].

2.4. Protein assay

The concentration of cell protein content was measured in cell lysates after formation of a quantifiable color complex by spectrophotometry at 540 nm, using a commercial kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Middletown, USA).

2.5. Respiratory burst assay

Respiratory burst assay was carried out by the determination of the levels of NO production and H₂O₂ [19].

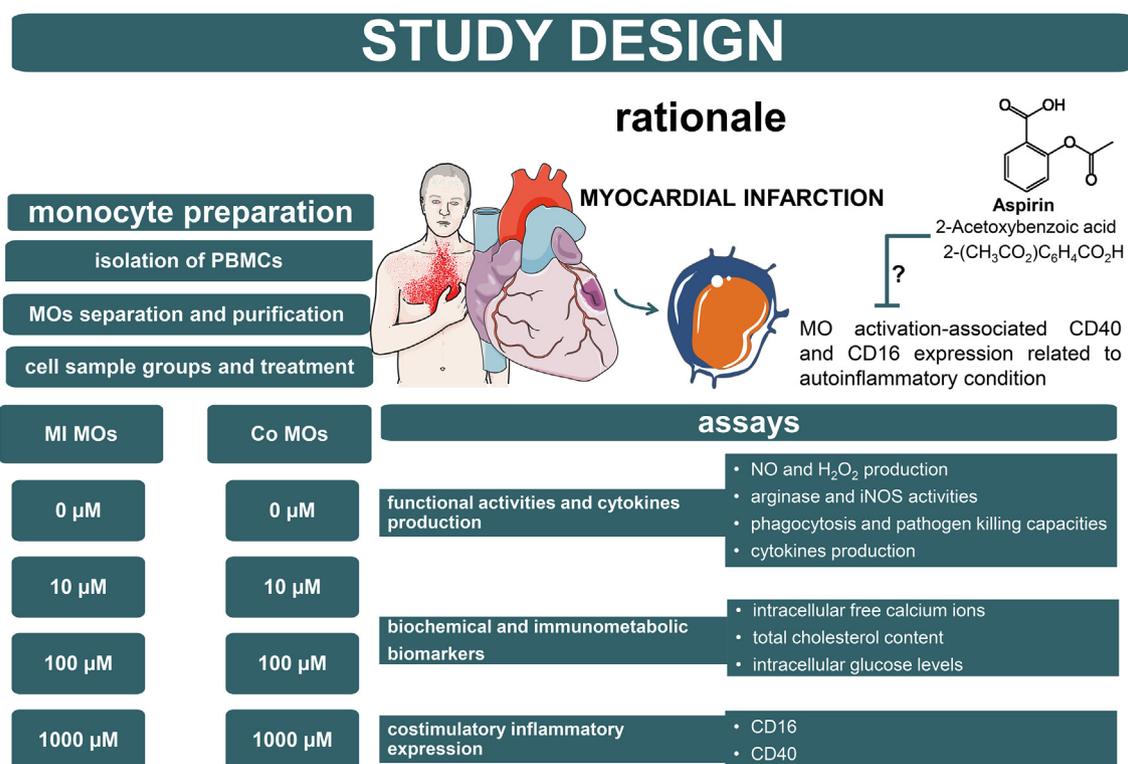


Fig. 1. Study flow-charts. We evaluated the *ex vivo* effect of ASA on functional activities, cytokine production, and expression levels of CD16 and CD40 on MI MOs compared with healthy control MOs. Co: controls, H₂O₂: hydrogen peroxide, iNOS: inducible nitric oxide synthase, MOs: monocytes, MI: myocardial infarction, NO: nitric oxide, PBMCs: peripheral blood mononuclear cells. Schematic representations were provided from Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).

2.5.1. NO assay

NO levels were spectrophotometrically determined in cell culture supernatants by measuring the NO metabolites (NOx, nitrite [NO₂⁻] and nitrate [NO₃⁻]) at 540 nm using the sensitive colorimetric Griess method. The assay was based on the use of trichloroacetic acid (TCA), vanadium (III) and Griess reagent chloride, as described [20,21]. The concentration of NO was determined from linear standard curve established by 0–150 µmol/L sodium nitrite (NaNO₂).

2.5.2. H₂O₂ assay

H₂O₂ production was measured in cell lysates at 610 nm by colorimetric method of Pick and Keisari [22] as described [19]. The assay was based on the oxidation of phenol red by H₂O₂ via peroxidase. A buffered Phenol Red Solution (PRS), which contains a peroxide assay buffer (PAB) (5.0 mM K₂HPO₄, 1.0 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 0.5 mM glucose adjusted to pH 7.4), 0.28 mM (0.1 g/L) of phenol red (phenolsulfonphthalein) and 8.5 U/L (50 µg/mL) of horseradish peroxidase (HRPO, EC 1.11.1.7) was used. The PRS solution was prepared immediately before the performance of the experiment by adding phenol red and HRPO to 2.1 mL of PAB at a final concentration of 0.46 mM and 0.046 U/mL, respectively. Cell lysates were added to the assay mixture at a ratio of 1–4 and then incubated for 30 min at 37 °C [23]. To stop the reaction, 10 µL of 1 N NaOH were added. The amount of H₂O₂ produced was quantified from a standard curve, *i.e.*, optical density = f([H₂O₂]), prepared by the use of dilutions of 30% H₂O₂.

2.6. iNOS activity

The iNOS activity was determined by normalizing each NO concentration to milligrams of protein and expressed as nanomoles per milligram protein per 30 min.

2.7. Arginase activity assay

Arginase activity assay was performed using a spectrophotometric technique based on the determination of the production of urea after the addition of L-arginine [24–26]. Briefly, 50 µL of 0.5 M L-arginine solution (pH 9.7) were added to same volume of heat-activated lysates, and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 1 h. The reaction was stopped by adding 400 µL of acidic mixture composed of 1 vol 96% H₂SO₄, 3 vol 85% H₃PO₄ and 7 vol distilled water [27]. The amount of urea generated by arginase was analyzed at 600 nm using a commercial kit (UREA/BUN—COLOR, BioSystems, S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Spain). One unit of arginase activity was defined as the amount of enzyme that catalyzes the formation of 1 µmol of urea/min.

2.8. Phagocytosis and pathogen killing assays

S. aureus (ATCC) 25923 strains were used for the phagocytosis and pathogen killing assays. Bacteria were grown in Brain Heart Infusion Broth (BHIB) overnight at 37 °C. The optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was adjusted to 1, corresponding to 10⁹ CFU/mL, as confirmed by bacterial count. Phagocytosis and intracellular bactericidal capacity assays were performed as described in detail [19,20]. Phagocytosis results were determined using the percentage decrease in the number of viable extracellular bacteria. The percentage of intracellular bacterial killing was calculated as follows:

$$\% \text{ bacterial killing} = 100 \times \left(\frac{NW_{t0} - NW_{t1}}{NW_{t0}} \right),$$

in which N_{t0} and N_{t1} correspond to the number of viable intracellular bacteria at t₀ and t₁, respectively.

2.9. ⁴⁵Ca²⁺ assay

The levels of ⁴⁵Ca²⁺ were spectrophotometry determined at 560 nm.

The assay used the orthocresolphthalein (OCP) complexone method, which is based on the reaction of calcium ions with OCP in alkaline solution [28]. The levels of ⁴⁵Ca²⁺ were expressed as µg/mg proteins.

2.10. ¹²⁵I-CHOL assay

The levels of ¹²⁵I-CHOL were spectrophotometry measured at 500 nm on cell lysates by enzymatic reaction [29,30], using a commercial kit (BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Spain). The levels of ¹²⁵I-CHOL were expressed as µg/mg proteins.

2.11. ¹²⁵I-Glu assay

¹²⁵I-Glu concentrations were spectrophotometrically assessed using a commercial assay kit (BioSystems S.A. Costa Brava 30, Barcelona, Spain), according to the manufacturer's instructions. This process is based on the oxidation of glucose to gluconate by the glucose oxidase enzyme (GOD), and the H₂O₂ produced was detected at 500 nm with chromogenic oxygen acceptor, phenol, 4-aminophenazone (4-AP) in the presence of peroxidase (POD). The levels of ¹²⁵I-Glu were expressed as µg/mg proteins.

2.12. Cytokines assays

The concentration of IL-1β, IL-6, IL-10, TNF-α, and IFN-γ were measured in supernatants after 24 h by a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), with respective commercial kits, according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences co., San Diego, USA). The absorbance was measured at 450 nm with an ELISA plate reader (Biochrom Anthos 2020, Cambridge, UK). The limits of detection (LOD) were 0.3 pg/mL for IL-1β, 1 pg/mL for IL-6, IL-10, and TNF-α, and 8 pg/mL for IFN-γ.

2.13. Cell imaging and immunofluorescence assays

The expression levels of CD14, CD16, and CD40 on LPS/INF-γ activated MOs were evaluated by direct immunofluorescence. 2 × 10⁵ MOs were cultured for 24 h at 37 °C and 5% of CO₂ in chamber slide after stimulation with LPS (10 ng/mL) and INF-γ (10 ng/mL) in the absence or presence of different ASA doses. After fixation by 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min and blocking by 5% FBS in PBS for 1 h, MOs were stained with PE-conjugated mouse antihuman CD14 (clone MEM-18 by Sigma-Aldrich), fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled mouse antihuman CD16 (clone 3G8 by BD) and FITC-mouse antihuman CD40 (clone HI40a by Sigma Aldrich) diluted respectively at 1:750, 1:200 and 1:500 in block solution. The stained cells were assessed using inverted cell imaging fluorescence microscopy station (Fluor Cell Imaging Station, Thermo Fischer Scientific, MA USA), and analyzed using ImageJ software (the National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) [31,32].

2.14. Statistical analyses

All experiments were repeated at least four times and the data were presented as the mean with standard error of mean (SEM). Statistical analyses were performed by a non-parametric Mann-Whitney *U* or Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) test, with pairwise comparisons using the Dunn-Bonferroni approach, after checking of data distribution. Statistics were carried out using SPSS software package version 20.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and differences were considered statistically significant at *p*-value less than 0.05.

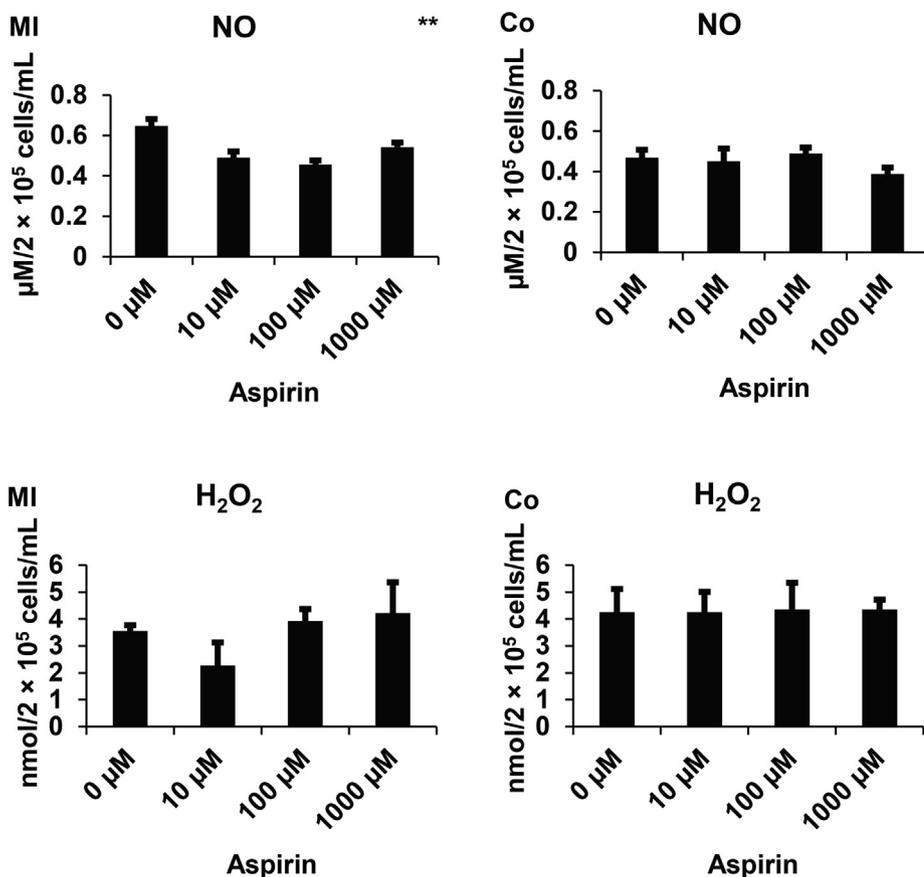


Fig. 2. Effect of aspirin on NO and H₂O₂ production in MI MOs compared with control MOs. NO production was assayed by the sensitive Griess reaction and H₂O₂ levels were measured by the adapted method of Pick and Keisari. Asterisks indicate significant differences: ** $p < 0.01$ by Kruskal–Wallis test with pairwise comparisons using the Dunn–Bonferroni approach. The results are presented as mean values with standard error of mean (SEM) of six independent experiments carried out in each group of three healthy donors or patients without pooling samples ($n = 18/\text{group}$). Co: controls, H₂O₂: hydrogen peroxide, MOs: monocytes, MI: myocardial infarction, NO: nitric oxide.

3. Results

3.1. Effect of ASA on NO and H₂O₂ production

The NO and H₂O₂ production were evaluated as MOs respiratory burst biomarkers. We see in Fig. 2 that NO production was significantly increased in ASA-untreated MI MOs compared to untreated control MOs ($p = 0.01$ by Mann–Whitney U test). ASA treatment at 10 µM, 100 µM and 1000 µM significantly downregulated the levels of NO production when compared with ASA-untreated MI MOs ($p = 0.010$, $p = 0.005$, and $p = 0.016$ by Mann–Whitney U test, respectively). In contrast, no significant difference was revealed in the NO production in control MOs. $P = 0.003$ using Kruskal–Wallis test in MI MOs. Finally, there is no significant effect of ASA on the production of H₂O₂ in MOs from patients and controls.

3.2. Effect of ASA on iNOS and arginase activities

We show in Fig. 3 that iNOS activity in ASA-untreated MOs from MI patients was increased than in untreated control MOs ($p < 0.01$ by Mann–Whitney U test). Additionally, ASA treatment at 1000 µM significantly decreased the iNOS activity when compared with ASA-untreated MI MOs ($p = 0.004$ by Mann–Whitney U test). Moreover, a significant increase was seen on the arginase activity between ASA-untreated MOs from MI patients and MOs treated at 100 µM ($p = 0.016$ by Mann–Whitney U test). For both iNOS and arginase activities, the difference was not statistically significant in control MOs. When using Kruskal–Wallis test, $p < 0.01$ in MI MOs for arginase and iNOS activities.

3.3. Effect of ASA on phagocytosis and pathogen killing capacities

The results in Fig. 4 showed that phagocytosis capacity was

significantly increased in ASA-untreated MOs from MI patients than in that of untreated MOs from controls ($p = 0.019$ by Mann–Whitney U test). Additionally, treatment with ASA induced a significant increase in phagocytosis levels in both MI and control MOs (for all comparisons with ASA-untreated MOs, $p < 0.05$ by Mann–Whitney U test). Moreover, the pathogen killing levels increased significantly and gradually with increasing doses of ASA, *i.e.*, from 10 µM to 1000 µM in MI MOs (for all comparisons with ASA-untreated MI MOs, $p = 0.02$ by Mann–Whitney U test). Conversely, ASA treatment decreased significantly the pathogen killing capacity in the range of 10 µM to 100 µM compared to ASA-untreated control MOs ($p < 0.05$ by Mann–Whitney U test), this activity decreased slightly at the dose of 1000 µM, but the difference did not reach a significant level ($p > 0.05$ by Mann–Whitney U test). The Kruskal–Wallis test gave $p < 0.01$ for phagocytosis and pathogen killing in both MI and control MOs.

3.4. Effect of ASA on $i_f\text{Ca}^{2+}$ levels

As depicted in Fig. 5, ASA induced a significant increase in $i_f\text{Ca}^{2+}$ levels at the dose of 100 µM in MI MOs ($p = 0.036$ by Mann–Whitney U test). However, the extreme doses of ASA appear to have no substantial changes in $i_f\text{Ca}^{2+}$ levels ($p > 0.05$ by Mann–Whitney U test). Consequently, the effect of ASA on $i_f\text{Ca}^{2+}$ seems to be dose-dependent. Additionally, there was no significant difference in $i_f\text{Ca}^{2+}$ levels in control MOs. For multiple comparisons, using Kruskal–Wallis test, p -value was inferior to 0.05 for MI MOs.

3.5. Effect of ASA on $t_{cc}\text{CHOL}$ levels

We see in Fig. 6 that $t_{cc}\text{CHOL}$ levels were significantly increased in ASA-untreated MI MOs when compared to that of untreated control MOs ($p < 0.01$ by Mann–Whitney U test). Additionally, ASA gradually downregulated $t_{cc}\text{CHOL}$ levels in MI MOs, the difference was significant

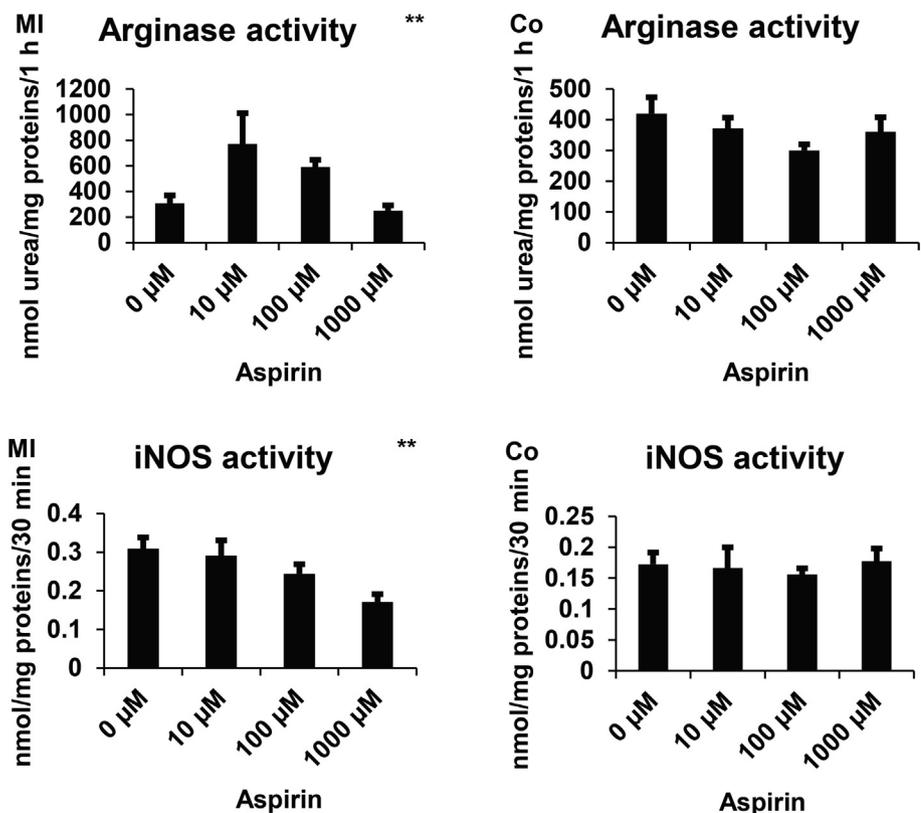


Fig. 3. Effect of Aspirin on Arginase and iNOS activities in MI and control MOs. Arginase activity levels were spectrophotometrically determined by measurement of the concentration of urea after the addition of L-arginine, and iNOS activity was determined from NO levels relative to protein concentration. Asterisks indicate significant differences: ** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test with pairwise comparisons using the Dunn-Bonferroni approach. The results are presented as mean values with standard error of mean (SEM) of six independent experiments carried out in each group of three healthy donors or patients without pooling samples ($n = 18/\text{group}$). Co: controls, iNOS: inducible nitric oxide synthase, MOs: monocytes, MI: myocardial infarction.

at the dose of 1000 μM compared with untreated MI MOs ($p < 0.01$ by Mann-Whitney U test). Whereas, treatment with ASA at the dose of 100 μM resulted in a significant decrease in $t_{cc}\text{CHOL}$ levels in control MOs compared to ASA-untreated control MOs ($p = 0.037$ by Mann-

Whitney U test). For multiple comparisons using the Kruskal-Wallis test, p -values were < 0.01 and < 0.05 for MI and control MOs, respectively.

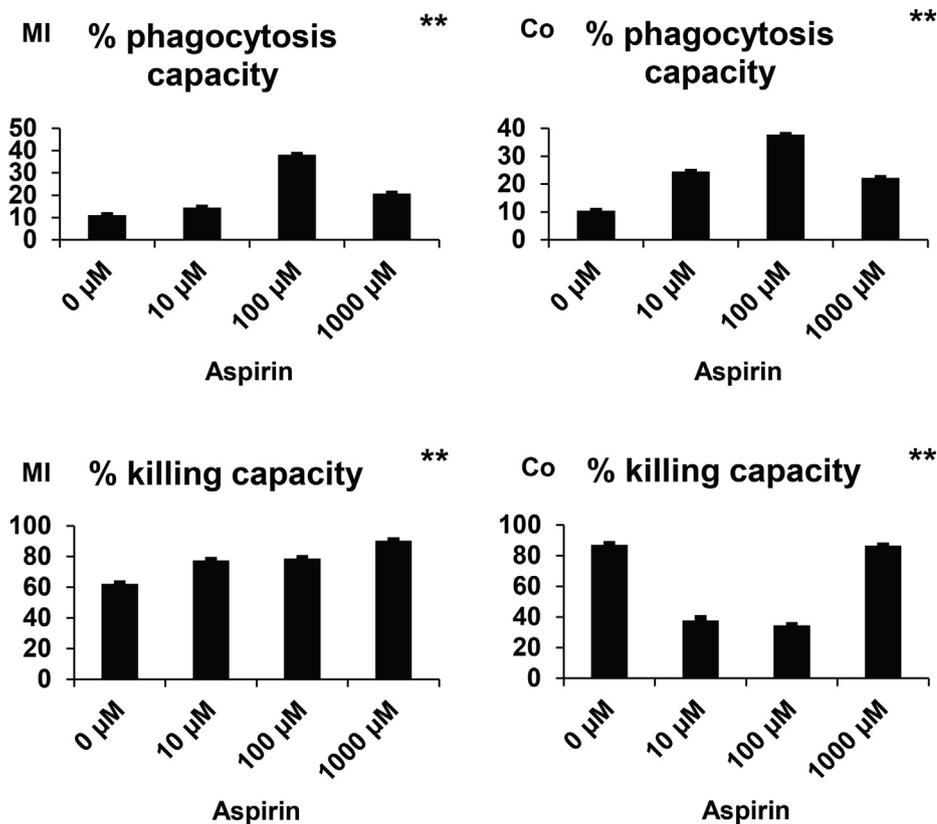


Fig. 4. Effect of aspirin on phagocytosis and killing capacities of MI and control MOs. The bactericidal activity of MOs was assayed using the antibiotic protection method. After infection, intracellular live bacteria were analyzed by the colony forming unit (CFU) method at two time points after infection, i.e., at 0 (t_0) and 1 h (t_1). Asterisks indicate significant differences: ** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test with pairwise comparisons using the Dunn-Bonferroni approach. The results are presented as mean values with standard error of mean (SEM) of four independent experiments carried out in each group of three healthy donors or patients without pooling samples ($n = 12/\text{group}$). Co: controls, MOs: monocytes, MI: myocardial infarction.

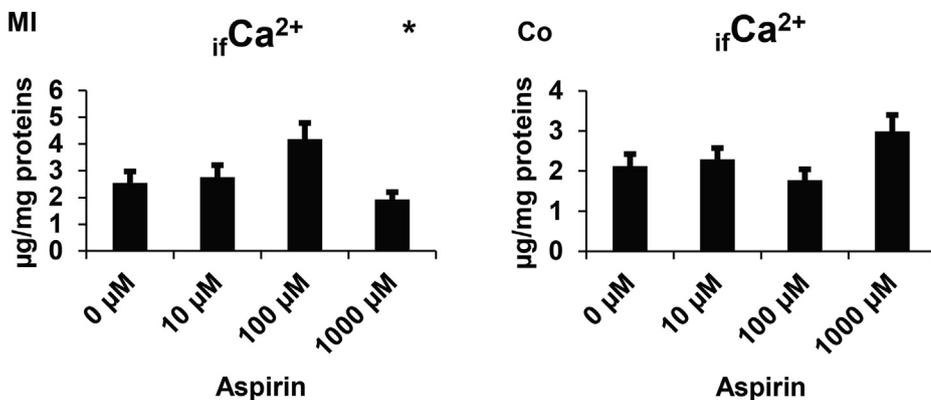


Fig. 5. Effect of aspirin on iCa^{2+} levels of MI and control MOs. iCa^{2+} levels were biochemically measured by the ortho-cresolphthalein complexone method. Asterisks indicate significant differences: * $p < 0.05$ by Kruskal–Wallis test with pairwise comparisons using the Dunn–Bonferroni approach. The results are presented as mean values with standard error of mean (SEM) of six independent experiments carried out in each group of three healthy donors or patients without pooling samples ($n = 18$ /group). Co: controls, iCa^{2+} : intracellular free calcium ions, MOs: monocytes, MI: myocardial infarction.

3.6. Effect of ASA on $iGlu$ levels

As shown in Fig. 7, $iGlu$ was increased in ASA-untreated MI MOs than in untreated control MOs ($p = 0.01$ by Mann-Whitney U test). Additionally, no significant changes were revealed between ASA-untreated MOs and ASA-treated MOs at 10 μ M and 100 μ M in MI and control MOs. However, ASA at 1000 μ M induced significant downregulation of $iGlu$ levels in MI MOs, but a significant upregulation in control MOs when compared with ASA-untreated MOs ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test for MI and control MOs, respectively). Using Kruskal-Wallis test, p -values were < 0.05 for MI and control MOs.

3.7. Effect of ASA on proinflammatory and anti-inflammatory cytokines production

The results in Fig. 8 showed that the production levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were significantly increased in untreated MI MOs than in that of untreated control MOs ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test), nevertheless, the levels of IFN- γ were not significantly different ($p > 0.05$ by Mann-Whitney U test). Treatment of MI MOs with 100 μ M of ASA induced a significant downregulation of IL-1 β production when compared with ASA-untreated MI MOs ($p = 0.02$ by Mann-Whitney U test); similarly, ASA treatment of control MOs downregulated the IL-1 β production (for all comparisons with ASA-untreated MOs, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). IL-6 and IFN- γ levels were significantly increased at a low concentration of ASA (10 μ M) and decreased at 1000 μ M in MI MOs (for all comparisons with ASA-untreated MI MOs, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Although these results were released from comparison between two same conditions in which ASA-untreated and LPS-stimulated MOs were compared to ASA-treated and LPS-stimulated MOs, it is easy enough to say that a low concentration of ASA could induce such effects on IFN- γ and IL-6, but this could be due to a combined effect of stimulation by LPS with treatment

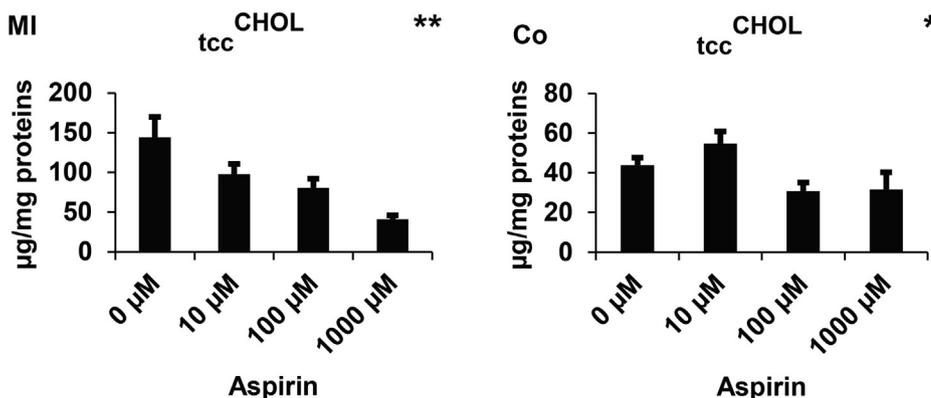


Fig. 6. Effect of aspirin on $tccCHOL$ levels of MI MOs compared with control MOs. $tccCHOL$ levels were measured with spectrophotometric method after conversion of cholesterol esters to free cholesterol by the enzyme cholesterol ester hydrolase (EC 3.1.1.13), using commercial reagents. Asterisks indicate significant differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Kruskal–Wallis test with pairwise comparisons using the Dunn–Bonferroni approach. The results are presented as mean values with standard error of mean (SEM) of six independent experiments carried out in each group of three healthy donors or patients without pooling samples ($n = 18$ /group). Co: controls, MI: myocardial infarction, $tccCHOL$: total cellular cholesterol content.

with ASA. Moreover, all concentrations of ASA induced a significant increase of IL-6 production in control MOs ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test); conversely, IFN- γ were significantly decreased at 10 μ M and 1000 μ M of ASA in control MOs when compared with ASA-untreated control MOs ($p = 0.028$ for 10 μ M, and $p = 0.026$ for 1000 μ M by Mann-Whitney U test). Furthermore, TNF- α production increased significantly and gradually with increasing doses of ASA, i.e., from 10 μ M to 1000 μ M in MI MOs (for comparisons with ASA-untreated MI MOs, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test); a dose of 1000 μ M ASA induced a significant increase in control MOs ($p = 0.02$ by Mann-Whitney U test).

On the other hand, the levels of IL-10 production were significantly downregulated in MI MOs than in control cells ($p = 0.019$ by Mann-Whitney U test). Additionally, ASA treatment induced a gradual upregulation of IL-10 production in MI MOs (for all comparisons with ASA-untreated MI MOs, $p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). In contrast, no significant difference was revealed in control MOs. When comparing using Kruskal-Wallis test, p -values were less than 0.01 for the overall cytokines of MI MOs, and IL-1 β of control MOs, and less than 0.05 for IFN- γ , TNF- α , and IL-6 of control MOs.

3.8. Effect of ASA on the surface expression of CD16 and CD40

The results illustrated in Fig. 9 showed that the expression levels of CD16 were significantly increased in untreated MI MOs than in that of untreated control MOs ($p < 0.05$ by Mann-Whitney U test). Additionally, all concentrations of ASA induced a significant downregulation of CD16 expression levels in MI MOs when compared with ASA-untreated MI MOs (for all comparisons, $p = 0.021$ by Mann-Whitney U test). In control MOs, treatment with 10 μ M ASA upregulated the expression of CD16 when compared with ASA-untreated control MOs, and, conversely, decreased at 100 μ M, and 1000 μ M ASA when compared with 10 μ M ASA-treated control MOs (for all comparisons, $p = 0.021$ by Mann-Whitney U test).

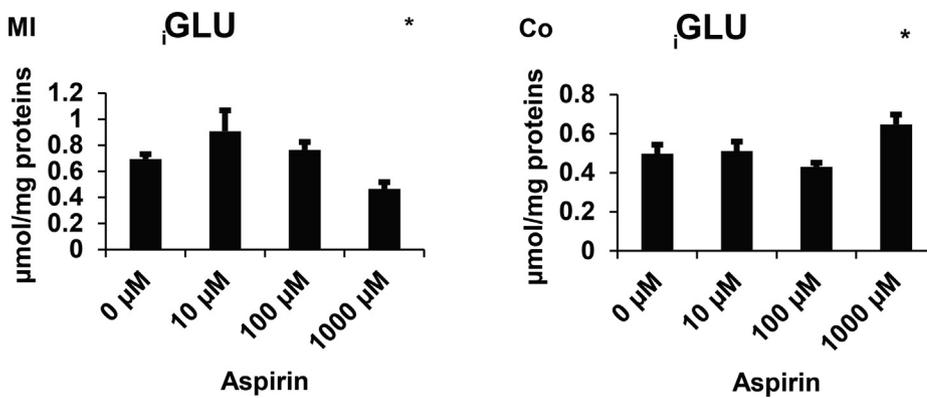


Fig. 7. Effect of aspirin on i GLU levels in MI and control MOs. i GLU levels were spectrophotometrically measured based on the oxidation of glucose to gluconate by the glucose oxidase enzyme. Asterisks indicate significant differences: * $p < 0.05$ by Kruskal–Wallis test with pairwise comparisons using the Dunn–Bonferroni approach. The results are presented as mean values with standard error of mean (SEM) of five independent experiments carried out in each group of three healthy donors or patients without pooling samples ($n = 15$ /group). Co: controls, i GLU: intracellular levels of glucose, MOs: monocytes, MI: myocardial infarction.

On the other hand, expression levels of CD40 were significantly increased in untreated MI MOs than in that of untreated control MOs ($p = 0.021$ by Mann–Whitney U test). Additionally, ASA treatment at 10 μ M and 100 μ M significantly downregulated the expression of CD40 compared with untreated MI MOs ($p < 0.05$ by Mann–Whitney U test). Using the Kruskal–Wallis test, p -values were < 0.01 for CD16, and CD40 expression on MI and control MOs.

4. Discussion

The role of MOs in various inflammatory diseases has been associated to differential subset activation phenotype, including intermediate and non-classical MOs [33,34]. Additionally, there are experimental indications that neither function nor kinetics of the MO subsets overlap and this differential response may also be associated to health status [35]. Therefore, it would be of great interest to determine clinically through large cohort studies the association levels of different MO subtypes with MI even before confirming the existence or not of cause-and-effect relationship. Moreover, any change in MO activities after MI could undoubtedly induce severe immune disorders, including excessive inflammation [36]. Hence, in the present study we have evaluated the *ex vivo* effects of ASA on immunomodulation of MO functional phenotypic activities after MI, given its broad therapeutic spectrum with well documented benefits as anti-inflammatory [37] and cardiovascular protective agent [38].

4.1. Effect of ASA on NO and H_2O_2 production

NO produced by peripheral blood MOs plays a crucial role in inflammatory conditions and in the response against pathogens by its cytotoxic property [39]. It has been reported that NO produced at normal concentrations has an anti-inflammatory and protective effects by its vasodilatory, antiaggregant, and inhibition of leukocytes adhesion properties, but at high ones, it exerts a proinflammatory, deleterious effect and promotes atherosclerotic lesions during MI [40–43]. In this first report, our results showed that ASA induced a downregulation of NO production in MI MOs. Knowing that NO is considered as one of key components in the inflammatory response, especially that which is produced by iNOS [44], the decrease in its bioavailability would undoubtedly have an atheroprotective and anti-inflammatory effects. Therefore, downregulation of NO released by MOs would be one of the main kinetic pathways of ASA in the modulation of inflammation. Moreover, at normal physiological levels, H_2O_2 , one of the most abundant and stable forms of reactive oxygen species (ROS) produced by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, is crucial in oxidative signaling pathway for cell homeostasis and viability, as well as in cell cytotoxicity [45]. Under pathological conditions, such as atherosclerosis in MI, excessive levels of H_2O_2 leads not only to oxidative stress [46], but also to MOs and macrophages (M ϕ s) tissue infiltration [47], as well as to their transformation into

foam cells after cholesterol accumulation [46], and to progression of inflammation [48]. While, in our study, there was no significant difference in H_2O_2 production by MI MOs, treated or not by ASA.

4.2. Effect of ASA on iNOS and arginase activities

L-arginine is the common substrate for which NOS and arginases compete to metabolize it to NO and L-citrulline, urea and L-ornithine, respectively. It has been demonstrated that a decrease in NO production was related to an increase in arginase activity and a decrease in substrate bioavailability for NO synthesis [49].

The fundamental dichotomy of these two NOS and arginase enzymatic pathways involved in the metabolism of arginine by MOs engenders two opposite immune responses. The first one is responsible for the increase of inflammation, whereas, the second one is required for tissue repair and remodeling [50]. Arginase is considered to be as one of the principal anti-inflammatory mediators in MOs [51]. Numerous studies have shown that arginase activity is strongly involved in tissue and extracellular matrix repair via the production of L-ornithine during MI. So L-ornithine is the precursor of polyamine, which is involved in tissue proliferation, and L-proline, which is important for collagen synthesis [52]. For great interest, increasing arginase activity and/or decreasing NO production may be a good marker for checking the efficiency of some drugs that are recognized for their anti-inflammatory properties. So in addition to its effects on downregulation of NO production, anti-inflammatory effects of ASA on MI MOs would be also related to its effects on upregulation of arginase activity. Furthermore, the iNOS activity is also involved in the immune response. It is produced primarily in MOs and M ϕ s, and can be induced by different agents, including proinflammatory cytokines [40]. iNOS activity occurs in conditions of inflammation and produces large quantities of NO that are 100-fold the amount produced by the constitutive endothelial NOS (eNOS) [53]. Qingping Feng *et al.* proved that iNOS is a harmful enzyme in MI, its expression and activity are increased and result in increased NO levels in the circulation [54]. Similarly, Toru Miyoshi *et al.* found that in apolipoprotein E-deficient mice, the absence of iNOS-mediated LDL oxidation reduce atherosclerotic lesion formation [55]. At the same time, Padmapriya Ponnuswamy *et al.* showed that genetic and pharmacological inhibition of iNOS reduce the development of atherosclerosis [56]. An endogenous inhibitor of iNOS as agmatine can also reduce atherosclerosis progression and endothelial dysfunction in high cholesterol-fed rabbits [57]. On the other hand, Yitong Liu *et al.* found that ASA downregulates the LPS-induced iNOS expression in M ϕ s during the early inflammation *in vivo* [58]. All these studies clearly demonstrated the involvement of iNOS expression in inflammation, progression of MI, and its decrease after ASA treatment. These findings are in accordance with our results, which demonstrated that iNOS activity was increased in ASA-untreated MI MOs, and markedly lowered by ASA treatment.

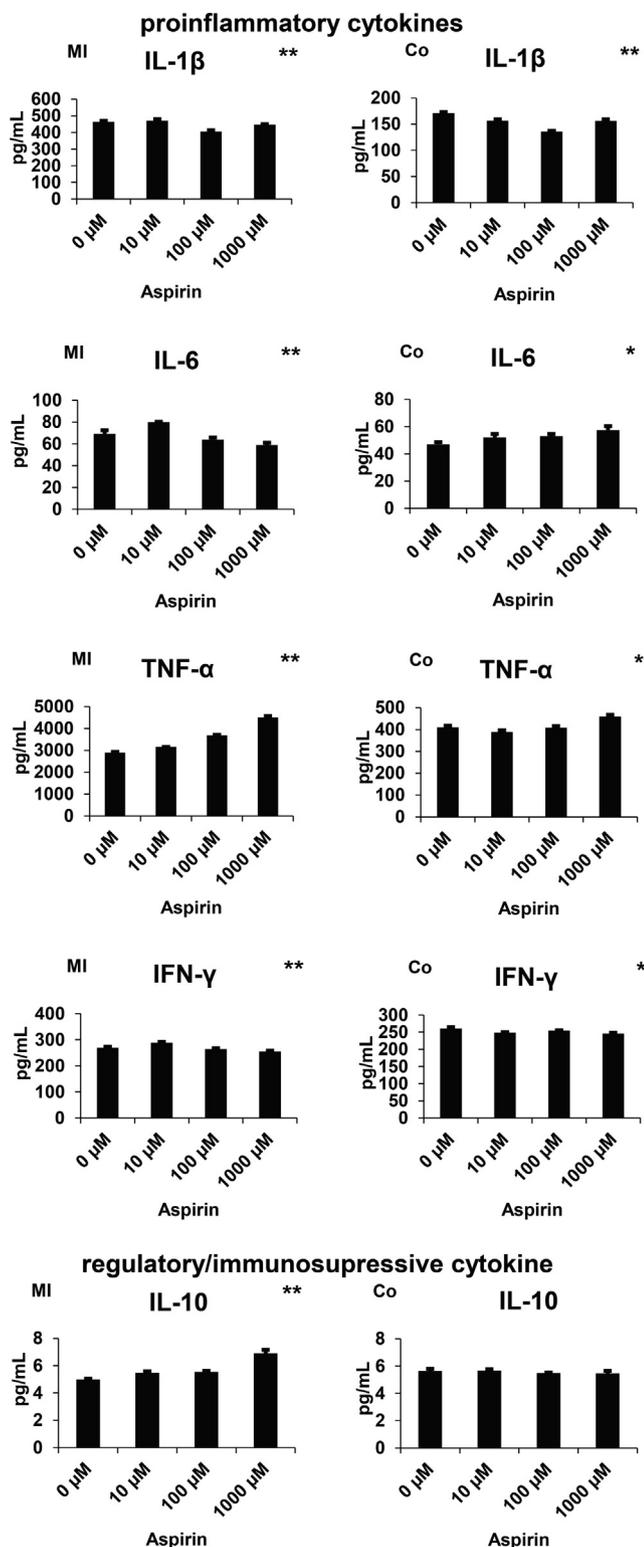


Fig. 8. Effect of aspirin on the production of IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α and IL-10 in MI and control MOs. Cytokine levels were measured using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Asterisks indicate significant differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Kruskal–Wallis test with pairwise comparisons using the Dunn-Bonferroni approach. The results are presented as mean values with standard error of mean (SEM) of four independent experiments carried out in each group of three healthy donors or patients without pooling samples ($n = 12$ /group). Co: controls, MOs: monocytes, MI: myocardial infarction, IFN- γ : interferon gamma, IL: interleukin, TNF- α : tumor necrosis factor alpha.

4.3. Effect of ASA on phagocytosis and killing capacities

Our outcomes showed that the phagocytosis capacity was upregulated in ASA-untreated MI MOs, when compared to healthy condition. Similar to our findings, a previous study has demonstrated that both phagocytic and killing capacities of MOs and neutrophils were increased in MI patients, although the study has been achieved in the context of infection with yeast particles [59]. Additionally, our results showed that ASA treatment further upregulated phagocytosis and killing capacities in MI MOs, which suggests that ASA may maintain a classical MO profile, knowing that such a subtype is characterized by phagocytic activity and low expression of CD16 molecule.

4.4. Effect of ASA on i_fCa^{2+}

i_fCa^{2+} acts as second messenger in immune cells including MOs, M ϕ s, T-cells, B-cells, mast cells and natural killer (NK) cells. It controls a variety of cell functions, such as cell secretion, signal transduction, gene transcription and cell division and differentiation [60].

In our study, we observed that ASA induced a change in i_fCa^{2+} levels within MOs in a dose-dependent manner. The increase in calcium ion levels would be a good indicator of the immunomodulatory effect of ASA on MOs, and its effect not only on upregulation of phagocytosis and destruction capacities, as indicated above, but also on downregulation of proinflammatory cytokine and NO production, as well as of iNOS activity in MI. Nevertheless, to the best of our knowledge, there are no similar studies allowing us to make comparisons with our results.

4.5. Effect of ASA on $t_{cc}CHOL$

Cholesterol accumulation in artery wall is an early inducer of MI. Several studies in mice and in hypercholesterolemic patients have reported the relationship between cholesterol-loaded MOs and atherosclerosis [61–63]. From a biochemical point of view, the cholesterol is transformed from a liquid to a solid state and forms crystals, which initiate the inflammatory response through a nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs), nucleotide-binding oligomerization domain leucine rich repeat and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome protein [64]. Our results demonstrated that $t_{cc}CHOL$ levels were increased in ASA-untreated MI MOs than in control MOs, and ASA treatment decreased $t_{cc}CHOL$ levels in MI MOs. These results can be explained by the lipophilic particularity of ASA which dissolves cholesterol crystals by a “like dissolves like” mechanism. Therefore, treatment with ASA would be a good therapeutic alternative for downregulation of the inflammatory process mediated by intracytosolic cholesterol accumulation in MO during MI.

4.6. Effect of ASA on $iGlu$

Glucose is the main source of energy for cells [65]. It is transported inside the MOs through glucose-transporters (GLUT) that include three isoforms: GLUT1, GLUT2 and GLUT3 [66]. Activation *in vitro* of MOs by LPS or phytohemagglutinin (PHA) induces an increase of GLUT1 expression, and its upregulation provides the source of energy for basic metabolic needs [67,68]. Recent study has demonstrated that ASA can modulates glucose uptake through downregulating GLUT1 and inhibits proliferation of hepatoma cells [69]. Our findings have indicated that ASA can induce downregulation of $iGlu$ in MI MOs in a dose-dependent manner. To the inhibition of platelet aggregation, which is known to be involved in endothelial dysfunction and consequently in triggering MI, we can add the ASA effect on the downregulation of glucose uptake in MO cells [70].

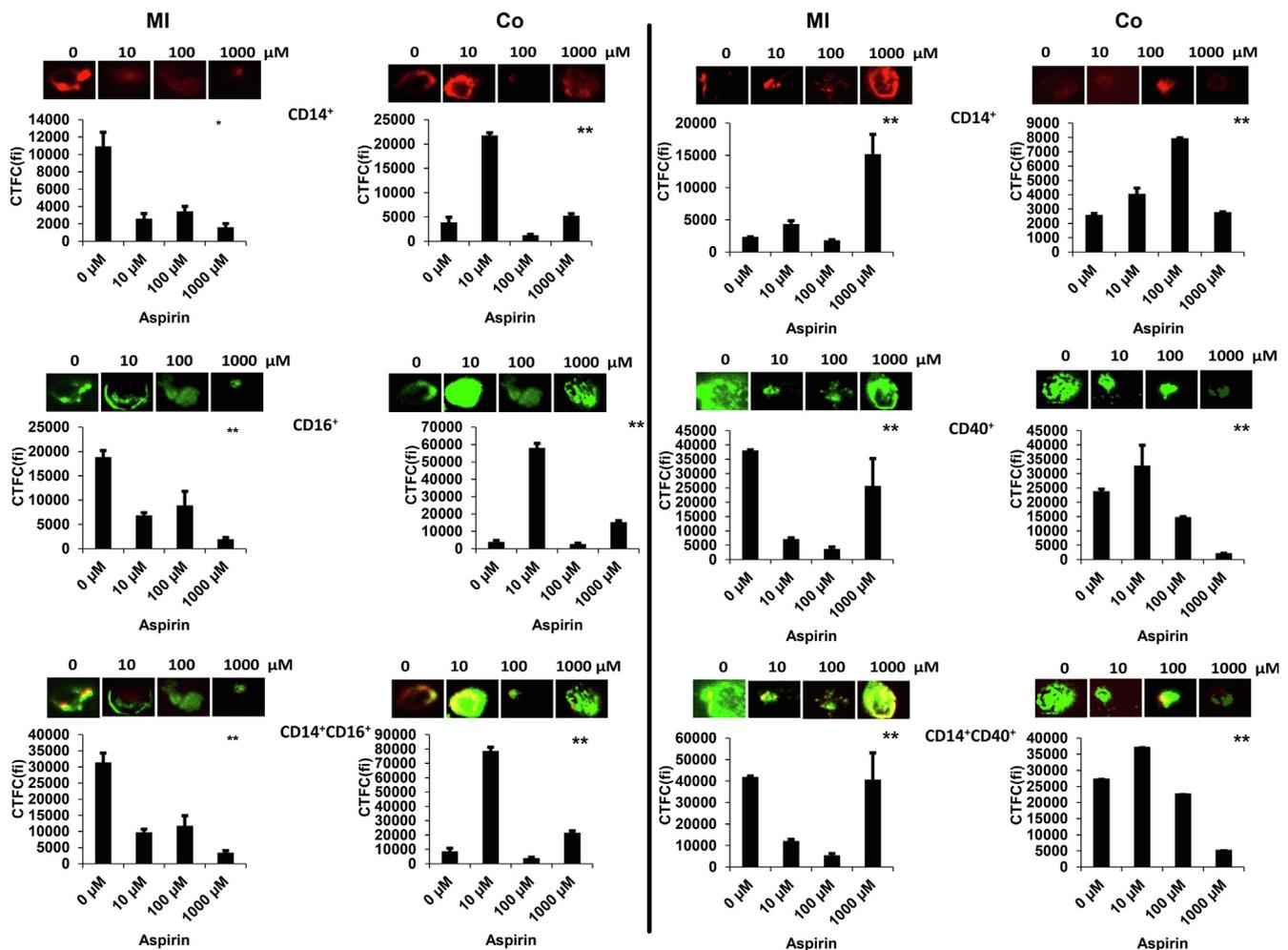


Fig. 9. Effect of aspirin on the MI and Co MOs surface expression of CD16 and CD40 and their coexpression with CD14. MI and Co MOs were stimulated with LPS and IFN- γ in the absence or presence of different ASA doses, and stained with the appropriate dilution of each fluorescent labeled antibody. Stained cells were visualized by Floid Cell Imaging Station microscopy, and surface expression of CD14, CD16, and CD40 were assessed by calculating the corrected total cell fluorescence (CTCF) using ImageJ software represented in histograms. Red channel was used for CD14 expression, and green channel for both CD16 and CD40 expression. Asterisks indicate significant differences: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Kruskal–Wallis test with pairwise comparisons using the Dunn–Bonferroni approach. The results are presented as mean values with standard error of mean (SEM) of four independent experiments carried out in each group of three healthy donors or patients without pooling samples ($n = 12$ /group). CD14: cluster of differentiation 14, CD16: cluster of differentiation 16, CD40: cluster of differentiation 40, Co: controls, MOs: monocytes, MI: myocardial infarction.

4.7. Effect ASA on proinflammatory and regulatory/immunosuppressive cytokines production

During MI, MOs exert their effects by secreting several inflammatory mediators such as IL-1 β , IL-6, IFN- γ and TNF- α [71]. These cytokines play a critical role in the amplification of the inflammatory response [71,72], which leads to the progression of MI and heart failure [72]. However, this inflammatory reaction is counterbalanced by anti-inflammatory cytokines, including IL-10 [73].

4.7.1. Effect of ASA on IL-1 β production

Proinflammatory MOs are a main source of IL-1 β [74], which has been reported to be upregulated during MI [74,75]. Similarly, our findings showed that IL-1 β production levels were increased in MI MOs when compared to healthy condition. IL-1 β is involved in the progression of MI [76] by amplification of inflammatory response [77] and increasing leukocytes production, which correlates inversely with MI patients survival [78]. Additionally, IL-1 β signaling plays an important role in the pathogenesis of myocardial repair/remodelling after MI [79,80]. Several studies demonstrated that the inhibition of IL-1 β production may be a propitious therapeutic target for patients with MI

[75,76,78,81,82]. Our findings have indicated that ASA treatment at the doses of 100 μ M and 1000 μ M downregulated the production of IL-1 β in MI MOs. It has recently been reported that ASA reduced IL-1 β secretion by murine bone-marrow-derived macrophage (BMDM), suggesting the confirmation of these outcomes using a human *in vitro* model [71]. These are in agreement with our results, nevertheless, the difference between experimental models (murine vs. human) and cell type (macrophage vs. MOs) do not allow comparisons to be made with our study, which requires more investigations in human MOs.

4.7.2. Effect of ASA on IL-6 production

IL-6 is a proinflammatory cytokine associated with MI pathogenesis [83]. It induces acute phase proteins synthesis, which has been reported to be an indicator of poor MI patient outcomes [84]. In addition, IL-6 inhibition has been shown to have a preventive effect on MI development [83,85,86]. Clinical studies have showed that ASA when used either alone [87], or in combination with other anti-platelet drugs [88], can reduce IL-6 production in patients with MI. Our results have indicated that ASA downregulated IL-6 production by MI MOs in a dose-dependent way, which corroborate previous results obtained from human blood and mouse M ϕ s [89,90].

4.7.3. Effect of ASA on IFN- γ production

It has been reported that IFN- γ levels were increased in patients with MI [91]. This proinflammatory mediator plays an important role in many cardiac pathologies including MI [92]. It exerts its deleterious effects by promoting inflammatory response [72], and leading to cardiac myocytes necrosis *via* the stimulation of NO secretion [93,94]. As for IL-6, our findings have indicated that ASA can act in a dose-dependent manner on immunomodulation of IFN- γ production. The ASA effects on the production of proinflammatory cytokines, including IFN- γ , seem to be mediated by different mechanisms depending on ASA concentration. Although low doses of ASA treatment were reported to be able to stimulate the production of proinflammatory cytokines [89], high doses have been demonstrated to have an opposite effect, and can inhibit the activation of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- κ B) [89,95].

4.7.4. Effect of ASA on TNF- α production

Our study revealed that the production of TNF- α , a proinflammatory cytokine, was markedly upregulated in the culture of MOs from patients with MI. It has been reported that this cytokine plays a critical role in the pathogenesis of MI by increasing neutrophil infiltration in the infarction area, promoting toxic substances generation, such as superoxide and perforin [96], and improving cardiomyocytes apoptosis [97]. Therefore, several studies have been designed to explore effective drugs targeting TNF- α for MI therapy [98,99]. In the current study, we found that TNF- α levels were significantly upregulated in both MI and control MOs. The effects of ASA appear to be close to those observed following inhibition of prostaglandin E2 (PGE2), resulting in upregulation of TNF- α production, both in *in vivo* and *ex vivo* studies, carried out on LPS-stimulated human MOs, but under conditions other than MI [100,101]. Moreover, it has been found that low dose of ASA inhibits PGE2 biosynthesis in healthy volunteers [102]. In contrast with these findings, others have demonstrated that such effect was not correlated with PGE2 inhibition in human dendritic cells [103]. Therefore, these conflicting results may be due essentially to the difference in experimental models and diseases, as well as to the difference in both mechanisms and mode of action (MoA) of ASA according to the cell types.

4.7.5. Effect of ASA on IL-10 production

IL-10 is a potent immunoregulatory/immunosuppressive cytokine, whose beneficial effects for MI patients have been already indicated [104]. The increase serum levels of IL-10 has been reported to correlate with good prognosis in MI [105]. This cytokine attenuates myocardial inflammation by suppressing proinflammatory cytokines production [73,104], and mitigates left ventricular dysfunction and remodeling, which are potent predictors of morbidity and mortality in MI patients [104,106]. In addition, it has been reported that IL-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after MI [107]. Whilst no studies have been conducted on the effect of ASA on IL-10 production by MOs during MI. Findings from the present study reveal that ASA enhanced IL-10 production by MI MOs, which may be benefit for MI patients.

In fine, our study deserves other investigations on ASA effects on cytokines production in human MOs to allow comparisons, given that all the other studies have been carried out in different conditions either on animal models, or on other cell types and samples, like peripheral blood serum. So ASA treatment can induce different effects from one immune cell to another [108], and that the therapeutic effects evaluated in serum samples do not necessarily reflect the drug effects on the production of cytokines at the cellular level [109].

4.8. Effect of ASA on CD16 and CD40 expression

Human circulating MOs are heterogeneous cell population, and classified based on relative expression levels of CD14 and CD16 surface

proteins, namely 'classical' CD14^{high}CD16⁻, 'intermediate' CD14^{high}CD16⁺ and 'non-classical' CD14^{low}CD16⁺ subset [110]. It has been proved that CD14^{high}CD16⁺ MOs independently predicted cardiovascular events [111] and the relationship between their expansion and coronary plaque vulnerability has been detected [112–115]. In addition, formation of MOs–platelet aggregates (MPA) during MI requires acquisition of a CD16⁺ profile by circulating MOs [4]. Our study demonstrated that CD16 expression was increased in ASA-untreated MI MOs than in control MOs, and ASA treatment significantly downregulated its expression in both MI and control MOs. Our outcomes are consistent with those of a recent study demonstrating that anti-platelet therapy can attenuate the development of a CD16⁺ profile by circulating MOs under proinflammatory conditions [116]. Moreover, binding CD40 costimulatory molecule on MOs to CD40L leads to MOs activation and production of several proinflammatory cytokines, such as IL-1 β , IL-6, and TNF- α [117–119], as well as NO production [120,121] and rescue from apoptosis [122]. The direct involvement of CD40 on MOs/M ϕ s in MI has been firmly established [123]. In line with previous results demonstrating an increase of CD40 expression in patients with atherosclerosis and moderate hypercholesterolemia [124–126], we found that IFN- γ -induced CD40 expression was upregulated in MI MOs. Conversely, treatment with ASA induced downregulation of CD40 expression in both MI and control MOs.

5. Conclusions and future prospects

In this first report, we demonstrated that ASA immunomodulates the functional activities of MOs during MI and promotes their switching toward a classical phenotype, exhibiting low CD16 expression levels and thereby anti-inflammatory properties during MI. So ASA appears to influence markedly immunometabolic response, and the surface expression of the costimulatory molecule CD40. Our results give rise to a variety of complementary studies, and among others, it would be interesting to study the effect of ASA on residual M ϕ s that were transformed into lipid-rich foam cells. Finally, it would be of great interest to explore the effect of ASA on the crosstalk between platelets and MOs/M ϕ s in the infarct zone.

Declaration of Competing Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to express their deepest thanks to Mr. Boucif Belhassena for his considerable support of this study, as well as the Staff and PhD and thesis Masters candidates in Immunology of the Laboratory of Applied Molecular Biology and Immunology (W0414100, University of Tlemcen, Algeria). They would also like to address special thanks to all eligible blood donors, as well as the staff of Cardiology Department of Tlemcen Medical Centre University (Tlemcen, Algeria).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106349>.

References

- [1] A. Gisterå, G.K. Hansson, The immunology of atherosclerosis, *Nat. Rev. Nephrol.* 13 (2017) 368–380, <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.51>.
- [2] E. Matsuura, F. Atzeni, P. Sarzi-Puttini, M. Turiel, L.R. Lopez, M.T. Nurmohamed, Is atherosclerosis an autoimmune disease? *BMC Med.* 12 (2014) 47, <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-47>.
- [3] H. Tsujioka, T. Imanishi, H. Ikejima, A. Kuroi, S. Takarada, T. Tanimoto, H. Kitabata, K. Okochi, Y. Arita, K. Ishibashi, K. Komukai, H. Kataiwa, N. Nakamura, K. Hirata, A. Tanaka, T. Akasaka, Impact of heterogeneity of human

- peripheral blood monocyte subsets on myocardial salvage in patients with primary acute myocardial infarction, *J. Am. Coll. Cardiol.* 54 (2009) 130–138, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.04.021>.
- [4] G. Passacualle, P. Vamadevan, L. Pereira, C. Hamid, V. Corrigan, A. Ferro, Monocyte-platelet interaction induces a pro-inflammatory phenotype in circulating monocytes, *PLoS ONE* 6 (2011) e25595, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025595>.
- [5] S. Zeng, X. Zhou, L. Ge, W.-J. Ji, R. Shi, R.-Y. Lu, H.-Y. Sun, Z.-Z. Guo, J.-H. Zhao, T.-M. Jiang, Y.-M. Li, Monocyte subsets and monocyte-platelet aggregates in patients with unstable angina, *J. Thromb. Thrombolysis* 38 (2014) 439–446, <https://doi.org/10.1007/s11239-014-1083-4>.
- [6] K. Urbanski, D. Ludew, G. Filip, M. Filip, A. Sagan, P. Szczepaniak, G. Grudzien, J. Sadowski, B. Jasiewicz-Honkisz, T. Sliwa, B. Kapelak, E. McGinnigle, T. Mikolajczyk, T.J. Guzik, CD14 + CD16 + + “nonclassical” monocytes are associated with endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease, *Thromb. Haemost.* 117 (2017) 971–980, <https://doi.org/10.1160/TH16-08-0614>.
- [7] M. Nahrendorf, M.J. Pittet, F.K. Swirski, Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction, *Circulation* 121 (2010) 2437–2445, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.916346>.
- [8] T. Morris, M. Stables, A. Hobbs, P. de Souza, P. Colville-Nash, T. Warner, J. Newson, G. Bellingan, D.W. Gilroy, Effects of low-dose aspirin on acute inflammatory responses in humans, *J. Immunol.* 183 (2009) 2089–2096, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900477>.
- [9] T. Cyrus, S. Sung, L. Zhao, C.D. Funk, S. Tang, D. Praticò, Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice, *Circulation* 106 (2002) 1282–1287, <https://doi.org/10.1161/01.cir.0000027816.54430.96>.
- [10] A. Undas, K.E. Brummel-Ziedins, K.G. Mann, Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions, *Blood* 109 (2007) 2285–2292, <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-010645>.
- [11] E. Kopp, S. Ghosh, Inhibition of NF- κ B by sodium salicylate and aspirin, *Science* 265 (1994) 956–959, <https://doi.org/10.1126/science.8052854>.
- [12] A. Richardson, S. Fedoroff, Quantification of Cells in Culture, in: S. Fedoroff, A. Richardson (Eds.), *Protocols for Neural Cell Culture*, Humana Press, Totowa, NJ, 1997, pp. 219–233, https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2586-5_16.
- [13] L.M. Wahl, S.M. Wahl, L.E. Smythies, P.D. Smith, Isolation of human monocyte populations, *Curr. Proto. Immunol.* 70 (2005), <https://doi.org/10.1002/0471142735.im0706as70>.
- [14] W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability, *Curr. Proto. Immunol.* 111 (2015), <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>.
- [15] M.J. Pabst, K.M. Pabst, D.B. Handsman, S. Beranova-Giorgianni, F. Giorgianni, Proteome of monocyte priming by lipopolysaccharide, including changes in interleukin-1 β and leukocyte elastase inhibitor, *Proteome Sci.* 6 (2008) 13, <https://doi.org/10.1186/1477-5956-6-13>.
- [16] L. Zhou, R. Somasundaram, R.F. Nederhof, G. Dijkstra, K.N. Faber, M.P. Peppelenbosch, G.M. Fuhler, Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies, *Clin. Vaccine Immunol.* 19 (2012) 1065–1074, <https://doi.org/10.1128/CVI.05715-11>.
- [17] M. Du, W. Pan, X. Duan, P. Yang, S. Ge, Lower dosage of aspirin promotes cell growth and osteogenic differentiation in murine bone marrow stromal cells, *J. Dent. Sci.* 11 (2016) 315–322, <https://doi.org/10.1016/j.jds.2016.03.009>.
- [18] W. Nouari, L. Ysmail-Dahlouk, M. Aribi, Vitamin D3 enhances bactericidal activity of macrophage against *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. Immunopharmacol.* 30 (2016) 94–101, <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.11.033>.
- [19] M. Aribi, Macrophage bactericidal assays, in: G. Rousselet (Ed.), *Macrophages*, Springer New York, New York, NY, 2018: pp. 135–149. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7837-3_14.
- [20] M. Aribi, W. Meziane, S. Habi, Y. Boulatika, H. Marchandini, J.-L. Aymeric, Macrophage bactericidal activities against staphylococcus aureus are enhanced in vivo by selenium supplementation in a dose-dependent manner, *PLoS ONE* 10 (2015) e0135515, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135515>.
- [21] I. Guevara, J. Iwanejko, A. Dembińska-Kieć, J. Pankiewicz, A. Wanat, P. Anna, I. Gołabek, S. Bartuś, M. Malczewska-Malec, A. Szczudlik, Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction, *Clin. Chim. Acta* 274 (1998) 177–188, [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(98\)00060-6](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(98)00060-6).
- [22] E. Pick, Y. Keisari, A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture, *J. Immunol. Meth.* 38 (1980) 161–170, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90340-3](https://doi.org/10.1016/0022-1759(80)90340-3).
- [23] C.D. Pericone, K. Overweg, P.W.M. Hermans, J.N. Weiser, Inhibitory and Bactericidal Effects of Hydrogen Peroxide Production by *Streptococcus pneumoniae* on Other Inhabitants of the Upper Respiratory Tract, *Infect. Immun.* 68 (2000) 3990–3997, <https://doi.org/10.1128/IAI.68.7.3990-3997.2000>.
- [24] T.A. Wynn, L. Barron, R.W. Thompson, S.K. Madala, M.S. Wilson, A.W. Cheever, T. Ramalingam, Quantitative assessment of macrophage functions in repair and fibrosis, in: J.E. Coligan, B.E. Bierer, D.H. Margulies, E.M. Shevach, W. Strober (Eds.), *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2011, pp. im1422s93. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1422s93>.
- [25] I.M. Corraliza, M.L. Campo, G. Soler, M. Modolell, Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod, *J. Immunol. Meth.* 174 (1994) 231–235, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)90027-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)90027-2).
- [26] J.W. Geyer, D. Dabich, Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates, *Anal. Biochem.* 39 (1971) 412–417, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90431-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90431-3).
- [27] X. Zhang, J. Zhang, R. Zhang, Y. Guo, C. Wu, X. Mao, G. Guo, Y. Zhang, D. Li, Q. Zou, Structural, enzymatic and biochemical studies on *Helicobacter pylori* arginase, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 995–1002, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.008>.
- [28] H.J. Gitelman, An improved automated procedure for the determination of calcium in biological specimens, *Anal. Biochem.* 18 (1967) 521–531, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(67\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(67)90110-8).
- [29] Y. Song, L.-J. Zhang, H. Li, Y. Gu, F.-F. Li, L.-N. Jiang, F. Liu, J. Ye, Q. Li, Polyunsaturated fatty acid relatively decreases cholesterol content in THP-1 macrophage-derived foam cell: partly correlates with expression profile of CIDE and PAT members, *Lipids Health Dis.* 12 (2013) 111, <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-111>.
- [30] N. Luo, J. Liu, B.H. Chung, Q. Yang, R.L. Klein, W.T. Garvey, Y. Fu, Macrophage adiponectin expression improves insulin sensitivity and protects against inflammation and atherosclerosis, *Diabetes* 59 (2010) 791–799, <https://doi.org/10.2337/db09-1338>.
- [31] M. Jackson, A. Krasnodembskaya, Analysis of mitochondrial transfer in direct co-cultures of human monocyte-derived macrophages (MDM) and mesenchymal stem cells (MSC), *BIO-PROTOCOL*. 7 (2017), <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2255>.
- [32] C.A. Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis, *Nat. Methods* 9 (2012) 671–675, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- [33] S. Gómez-Olarte, N.I. Bolaños, M. Echeverry, A.N. Rodríguez, A. Cuéllar, C.J. Puerta, A. Mariño, J.M. González, Intermediate monocytes and cytokine production associated with severe forms of chagas disease, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1671, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01671>.
- [34] P. Lacerate, A. Brunet, B. Egarnes, B. Duchêne, J.P. Brown, J. Gosselin, Overexpression of TLR2 and TLR9 on monocyte subsets of active rheumatoid arthritis patients contributes to enhance responsiveness to TLR agonists, *Arthritis Res. Ther.* 18 (2016) 10, <https://doi.org/10.1186/s13075-015-0901-1>.
- [35] T. Tak, R. van Groenendaal, P. Pickkers, L. Koenderman, Monocyte subsets are differentially lost from the circulation during acute inflammation induced by human experimental endotoxemia, *J. Innate Immun.* 9 (2017) 464–474, <https://doi.org/10.1159/000475665>.
- [36] N.G. Frangogiannis, The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 63 (2014) 185–195, <https://doi.org/10.1097/FJC.000000000000003>.
- [37] Y. Dai, J. Ge, Clinical use of aspirin in treatment and prevention of cardiovascular disease, *Thrombosis* 2012 (2012) 245037, <https://doi.org/10.1155/2012/245037>.
- [38] I.L. Meek, M.A.F.J. Van de Laar, H.E. Vonkeman, Non-steroidal anti-inflammatory drugs: an overview of cardiovascular risks, *Pharmaceuticals (Basel)* 3 (2010) 2146–2162, <https://doi.org/10.3390/ph3072146>.
- [39] S. Balaguer, L. Diaz, A. Gomes, G. Herrera, J.-E. O'Connor, A. Urios, V. Felipo, C. Montoliu, Real-time cytometric assay of nitric oxide and superoxide interaction in peripheral blood monocytes: A no-wash, no-lyse kinetic method: kinetic assay of peroxynitrite generation in monocytes, *Cytometry* 92 (2017) 211–217, <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21237>.
- [40] M. Yasa, S. Türkseven, Vasoprotective effects of nitric oxide in atherosclerosis, *FABAD J. Pharma. Sci.* 30 (2005) 41.
- [41] H. Li, S. Horke, U. Förstermann, Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis, *Atherosclerosis* 237 (2014) 208–219, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2014.09.001>.
- [42] Y. Kobayashi, The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation, *J. Leukoc. Biol.* 88 (2010) 1157–1162, <https://doi.org/10.1189/jlb.0310149>.
- [43] T. Pong, P.L. Huang, Effects of Nitric Oxide on Atherosclerosis, in: H. Wang, C. Patterson (Eds.), *Atherosclerosis*, John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, NJ, 2015, pp. 353–364. <https://doi.org/10.1002/9781118828533.ch28>.
- [44] R. Medeiros, C.P. Figueiredo, G.F. Passos, J.B. Calixto, Reduced skin inflammatory response in mice lacking inducible nitric oxide synthase, *Biochem. Pharmacol.* 78 (2009) 390–395, <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.04.021>.
- [45] E.I. Zubko, M.K. Zubko, Co-operative inhibitory effects of hydrogen peroxide and iodine against bacterial and yeast species, *BMC Res Notes.* 6 (2013) 272, <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-272>.
- [46] L. Loffredo, F. Martino, R. Carnevale, P. Pignatelli, E. Catasca, L. Perri, C.M. Calabrese, M.M. Palumbo, F. Baratta, M. Del Ben, F. Angelico, F. Violi, Obesity and hypercholesterolemia are associated with NOX2 generated oxidative stress and arterial dysfunction, *J. Pediatr.* 161 (2012) 1004–1009, <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2012.05.042>.
- [47] C.F. Lee, S. Ullevig, H.S. Kim, R. Asmis, Regulation of monocyte adhesion and migration by Nox4, *PLoS ONE* 8 (2013) e6964, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.006964>.
- [48] B. Legein, L. Temmerman, E.A.L. Biessen, E. Lutgens, Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis, *Cell. Mol. Life Sci.* 70 (2013) 3847–3869, <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1289-1>.
- [49] M. Munder, Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system: Arginase in the immune system, *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 638–651, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x>.
- [50] M. Rath, I. Müller, P. Kropf, E.I. Closs, M. Munder, Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages, *Front. Immunol.* 5 (2014), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>.
- [51] C. Najac, M.M. Chaumeil, G. Kohanbash, C. Guglielmetti, J.W. Gordon, H. Okada, S.M. Ronen, Detection of inflammatory cell function using ¹³C magnetic resonance spectroscopy of hyperpolarized [^{6-¹³C}]-arginine, *Sci. Rep.* 6 (2016) 31397, <https://doi.org/10.1038/srep31397>.
- [52] Z. Yang, X.-F. Ming, Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory

- responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders, *Front. Immunol.* 5 (2014), <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00533>.
- [53] R.G. Knowles, S. Moncada, Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem. J.* 298 (1994) 249–258, <https://doi.org/10.1042/bj2980249>.
- [54] Q. Feng, X. Lu, D.L. Jones, J. Shen, J.M.O. Arnold, Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality after myocardial infarction in mice, *Circulation* 104 (2001) 700–704, <https://doi.org/10.1161/hc3201.092284>.
- [55] T. Miyoshi, Y. Li, D.M. Shih, X. Wang, V.E. Laubach, A.H. Matsumoto, G.A. Helm, A.J. Lusis, W. Shi, Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Life Sci.* 79 (2006) 525–531, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.01.043>.
- [56] P. Ponnuswamy, E. Ostermeier, A. Schröttle, J. Chen, P.L. Huang, G. Ertl, B. Wieswandt, P.J. Kuhlencordt, Oxidative stress and compartment of gene expression determine proatherosclerotic effects of inducible nitric oxide synthase, *Am. J. Pathol.* 174 (2009) 2400–2410, <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080730>.
- [57] M.S. El-Awady, G.M. Suddek, Agmatine ameliorates atherosclerosis progression and endothelial dysfunction in high cholesterol-fed rabbits: effects of AGM in high cholesterol-fed rabbits, n/a–n/a, *J. Pharm. Pharmacol.* (2014), <https://doi.org/10.1111/jphp.12204>.
- [58] Y. Liu, S. Fang, X. Li, J. Feng, J. Du, L. Guo, Y. Su, J. Zhou, G. Ding, Y. Bai, S. Wang, H. Wang, Y. Liu, Aspirin inhibits LPS-induced macrophage activation via the NF- κ B pathway, *Sci. Rep.* 7 (2017) 11549, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10720-4>.
- [59] P.M. Djurdjevic, N.N. Arsenijevic, D.D. Baskic, A.L. Djukic, S. Popovic, G. Samardzic, Systemic response of peripheral blood leukocytes and their phagocytic activity during acute myocardial infarction, *Exp. Clin. Cardiol.* 6 (2001) 159–166.
- [60] S. Feske, Calcium signalling in lymphocyte activation and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 690–702, <https://doi.org/10.1038/nri2152>.
- [61] S. Mosis, G. Rennert, P. Büttner, S. Krause, D. Lütjohann, M. Soufi, R. Heller, H. Funke, Monocytes of patients with familial hypercholesterolemia show alterations in cholesterol metabolism, *BMC Med. Genom.* 1 (2008) 60, <https://doi.org/10.1186/1755-8794-1-60>.
- [62] H. Wu, R.M. Gower, H. Wang, X.-Y.D. Perrard, R. Ma, D.C. Bullard, A.R. Burns, A. Paul, C.W. Smith, S.I. Simon, C.M. Ballantyne, Functional role of CD11c⁺ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia, *Circulation* 119 (2009) 2708–2717, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.823740>.
- [63] I. Fernandez-Ruiz, P. Puchalska, C.A. Narasimulu, B. Sengupta, S. Parthasarathy, Differential lipid metabolism in monocytes and macrophages: influence of cholesterol loading, *J. Lipid Res.* 57 (2016) 574–586, <https://doi.org/10.1194/jlr.M062752>.
- [64] P. Duestwell, H. Kono, K.J. Rayner, C.M. Sirois, G. Vladimer, F.G. Bauernfeind, G.S. Abela, L. Franchi, G. Nuñez, M. Schnurr, T. Espevik, E. Lien, K.A. Fitzgerald, K.L. Rock, K.J. Moore, S.D. Wright, V. Hornung, E. Latz, NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals, *Nature* 464 (2010) 1357–1361, <https://doi.org/10.1038/nature08938>.
- [65] E. Jéquier, Carbohydrates as a source of energy, *Am. J. Clin. Nutr.* 59 (1994) 682S–685S, <https://doi.org/10.1093/ajcn/59.3.682S>.
- [66] I. Vrhovac Madunic, D. Breljak, I. Sabolic, Glucose transporters in the mammalian blood cells, *Period. Biol.* 116 (2014) 61–131.
- [67] Y. Fu, L. Maianu, B.R. Melbert, W.T. Garvey, Facilitative glucose transporter gene expression in human lymphocytes, monocytes, and macrophages: a role for GLUT isoforms 1, 3, and 5 in the immune response and foam cell formation, *Blood Cells Mol. Dis.* 32 (2004) 182–190, <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2003.09.002>.
- [68] E. Maratou, G. Dimitriadis, A. Kollias, E. Boutati, V. Lambadiari, P. Mitrou, S.A. Raptis, Glucose transporter expression on the plasma membrane of resting and activated white blood cells, *Eur. J. Clin. Invest.* 37 (2007) 282–290, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01786.x>.
- [69] Y. Liu, J. Feng, M. Sun, B. Liu, G. Yang, Y. Bu, M. Zhao, T. Wang, W. Zhang, H. Yuan, X. Zhang, Aspirin inhibits the proliferation of hepatoma cells through controlling GLUT1-mediated glucose metabolism, *Acta Pharmacol. Sin.* 40 (2019) 122–132, <https://doi.org/10.1038/s41401-018-0014-x>.
- [70] M.I. Worthley, A. Prabhu, P. De Sciscio, C. Schultz, P. Sanders, S.R. Willoughby, Detrimental effects of energy drink consumption on platelet and endothelial function, *Am. J. Med.* 123 (2010) 184–187, <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2009.09.013>.
- [71] B. Plaine, T. Bochaton, A. Paccalet, C. Crola-Da-Silva, E. Bonnefoy-Cudraz, N. Newton, M. Ovize, What are the effects of the guidelines-recommended treatments of myocardial infarction on the secretion of pro- and anti-inflammatory cytokines in an in vitro murin inflammatory model? *Arch. Cardiovasc. Dis. Suppl.* 10 (2018) 221–222, <https://doi.org/10.1016/j.acvdsp.2018.02.099>.
- [72] L. Fang, X.-L. Moore, A.M. Dart, L.-M. Wang, Systemic inflammatory response following acute myocardial infarction, *J. Geriatr. Cardiol.* 12 (2015) 305–312, <https://doi.org/10.11909/j.issn.1671-5411.2015.03.020>.
- [73] X. Meng, J. Li, M. Yu, J. Yang, M. Zheng, J. Zhang, C. Sun, H. Liang, L. Liu, Transplantation of mesenchymal stem cells overexpressing IL10 attenuates cardiac impairments in rats with myocardial infarction, *J. Cell. Physiol.* 233 (2018) 587–595, <https://doi.org/10.1002/jcp.25919>.
- [74] A. Saxena, W. Chen, Y. Su, V. Rai, O.U. Uche, N. Li, N.G. Frangogiannis, IL-1 induces proinflammatory leukocyte infiltration and regulates fibroblast phenotype in the infarcted myocardium, *J. I.* 191 (2013) 4838–4848, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300725>.
- [75] S. Slavic, O. Andrukhova, K. Ford, S. Handschuh, N. Latic, U. Reichart, S. Sasgary, C. Bergow, L.C. Hofbauer, P.J. Kostenuik, R.G. Erben, Selective inhibition of receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) in hematopoietic cells improves outcome after experimental myocardial infarction, *J. Mol. Med.* 96 (2018) 559–573, <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1641-x>.
- [76] B. Chen, J. Geng, S.-X. Gao, W.-W. Yue, Q. Liu, Eplerenone modulates interleukin-33/ST2 signaling and IL-1 β in left ventricular systolic dysfunction after acute myocardial infarction, *J. Interferon Cytokine Res.* 38 (2018) 137–144, <https://doi.org/10.1089/jir.2017.0067>.
- [77] B.W. Van Tassel, S. Toldo, E. Mezzaroma, A. Abbate, Targeting interleukin-1 in heart disease, *Circulation* 128 (2013) 1910–1923, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003199>.
- [78] H.B. Sager, T. Heidt, M. Hulsmans, P. Dutta, G. Courties, M. Sebas, G.R. Wojtkiewicz, B. Tricot, Y. Iwamoto, Y. Sun, R. Weissleder, P. Libby, F.K. Swirski, M. Nahrendorf, Targeting interleukin-1 β reduces leukocyte production after acute myocardial infarction, *Circulation* 132 (2015) 1880–1890, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016160>.
- [79] M. Neri, V. Fineschi, M. Paolo, C. Pomara, I. Riezzo, E. Turillazzi, D. Cerretani, Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction, *CVP* 13 (2015) 26–36, <https://doi.org/10.2174/15701611113119990003>.
- [80] M. Bujak, N.G. Frangogiannis, The role of IL-1 in the pathogenesis of heart disease, *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)* 57 (2009) 165–176, <https://doi.org/10.1007/s00005-009-0024-y>.
- [81] S. Toldo, B.W. Van Tassel, A. Abbate, Interleukin-1 blockade in acute myocardial infarction and heart failure, *JACC: Basic Transl. Sci.* 2 (2017) 431–433, <https://doi.org/10.1016/j.jacpts.2017.07.006>.
- [82] X. Wu, Z. Chen, Y. Yang, Y. Dong, H. Liu, S. Kuang, K. Luo, Impact of proteasome inhibitor MG-132 on expression of NF- κ B, IL-1 β and histological remodeling after myocardial infarction, *Exp Ther Med.* (2018), <https://doi.org/10.3892/etm.2018.6308>.
- [83] A. Iuchi, H. Harada, T. Tanaka, IL-6 blockade for myocardial infarction, *Int. J. Cardiol.* 271 (2018) 19–20, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.06.068>.
- [84] A.S. Gabriel, A. Martinsson, B. Wretling, S. Ahnve, IL-6 levels in acute and post myocardial infarction: their relation to CRP levels, infarction size, left ventricular systolic function, and heart failure, *Eur. J. Inter. Med.* 15 (2004) 523–528, <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2004.07.013>.
- [85] O. Kleveland, T. Ueland, G. Kunszt, M. Bratlie, A. Yndestad, K. Broch, E. Holte, L. Ryan, B.H. Amundsen, B. Bendz, S. Aakhus, T. Espevik, B. Halvorsen, T.E. Molnes, R. Wiseth, L. Gullestad, P. Aukrust, J.K. Damås, Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab induces a selective and substantial increase in plasma IP-10 and MIP-1 β in non-ST-elevation myocardial infarction, *Int. J. Cardiol.* 271 (2018) 1–7, <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.04.136>.
- [86] O. Kleveland, G. Kunszt, M. Bratlie, T. Ueland, K. Broch, E. Holte, A.E. Michelsen, B. Bendz, B.H. Amundsen, T. Espevik, S. Aakhus, J.K. Damås, P. Aukrust, R. Wiseth, L. Gullestad, Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial, *Eur. Heart J.* 37 (2016) 2406–2413, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw171>.
- [87] I. Ikonomidis, F. Andreotti, E. Economou, C. Stefanadis, P. Toutouzas, P. Nihoyannopoulos, Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin, *Circulation* 100 (1999) 793–798, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.100.8.793>.
- [88] H.-R. Yu, Y.-Y. Wei, J.-G. Ma, X.-Y. Geng, Beneficial effects of combined administration of Clopidogrel and Aspirin on the levels of proinflammatory cytokines, cardiac function, and prognosis in ST-segment elevation myocardial infarction: A comparative study, *Medicine* 97 (2018) e13010, <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000013010>.
- [89] C. Hartel, J. von Puttkamer, F. Gallner, T. Strunk, C. Schultz, Dose-dependent immunomodulatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in human whole blood: potential role of cyclooxygenase-2 inhibition, *Scand. J. Immunol.* 60 (2004) 412–420, <https://doi.org/10.1111/j.0300-9475.2004.01481.x>.
- [90] H. Raza, A. John, J. Shafarin, NAC attenuates LPS-induced toxicity in aspirin-sensitized mouse macrophages via suppression of oxidative stress and mitochondrial dysfunction, *PLoS ONE* 9 (2014) e103379, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103379>.
- [91] Y. Zhang, Y. Ren, L. Mu, J. Huang, C.-C. Bai, G. Du, Associations among interleukin-17, interferon-gamma, and acute coronary syndrome, *Biomed. Res.* 28 (2017), <https://www.alliedacademies.org/abstract/associations-among-interleukin17-interferongamma-and-acute-coronary-syndrome-7436.html> (accessed December 7, 2019).
- [92] S.P. Leveck, P.H. Goldspink, Could interferon-gamma be a therapeutic target for treating heart failure? *Heart Fail. Rev.* 19 (2014) 227–236, <https://doi.org/10.1007/s10741-013-9393-8>.
- [93] X. Cheng, Y.-H. Liao, H. Ge, B. Li, J. Zhang, J. Yuan, M. Wang, Y. Liu, Z. Guo, J. Chen, J. Zhang, L. Zhang, Th1/Th2 Functional Imbalance After Acute Myocardial Infarction: Coronary Arterial Inflammation or Myocardial Inflammation, *J. Clin. Immunol.* 25 (2005) 246–253, <https://doi.org/10.1007/s10875-005-4088-0>.
- [94] N. Keira, T. Tatsumi, S. Matoba, J. Shiraishi, S. Yamanaka, K. Akashi, M. Kobara, J. Asayama, S. Fushiki, H. Fliiss, M. Nakagawa, Lethal effect of cytokine-induced nitric oxide and peroxynitrite on cultured rat cardiac myocytes, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34 (2002) 583–596, <https://doi.org/10.1006/jmcc.2002.1539>.
- [95] M.-J. Yin, Y. Yamamoto, R.B. Gaynor, *Nature* 396 (1998) 77–80, <https://doi.org/10.1038/23948>.
- [96] M. Tian, Y.-C. Yuan, J.-Y. Li, M.R. Gionfriddo, R.-C. Huang, Tumor necrosis factor- α and its role as a mediator in myocardial infarction: A brief review, *Chron. Dis.*

- Transl. Med. 1 (2015) 18–26, <https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2015.02.002>.
- [97] S.B. Haudek, G.E. Taffet, M.D. Schneider, D.L. Mann, TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 2692–2701, <https://doi.org/10.1172/JCI29134>.
- [98] I. Somasuntharam, K. Yehl, S.L. Carroll, J.T. Maxwell, M.D. Martinez, P.-L. Che, M.E. Brown, K. Salaita, M.E. Davis, Knockdown of TNF- α by DNzyme gold nanoparticles as an anti-inflammatory therapy for myocardial infarction, *Biomaterials* 83 (2016) 12–22, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.12.022>.
- [99] M. Panahi, A. Papanikolaou, H. Khan, A. Torabi, J.G.F. Cleland, N. Vadgama, N.A. Rosenthal, S. Harding, S. Sattler, P2861A systematic review and meta-analysis of anti-cytokine therapies targeting IL-1 and TNF- A in myocardial infarction and heart failure, *Eur. Heart J.* 39 (2018), <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy565.P2861>.
- [100] A. Saha, A. Biswas, S. Srivastav, M. Mukherjee, P.K. Das, A. Ukil, Prostaglandin E₂ negatively regulates the production of inflammatory cytokines/chemokines and IL-17 in visceral leishmaniasis, *J. I.* 193 (2014) 2330–2339, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400399>.
- [101] T.H. Page, J.J.O. Turner, A.C. Brown, E.M. Timms, J.J. Inglis, F.M. Brennan, B.M. J. Foxwell, K.P. Ray, M. Feldmann, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs increase TNF production in rheumatoid synovial membrane cultures and whole blood, *J. I.* 185 (2010) 3694–3701, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000906>.
- [102] O. Boutaud, I.R. Sosa, T. Amin, D. Oram, D. Adler, H.S. Hwang, B.C. Crews, G. Milne, B.K. Harris, M. Hoeksema, B.C. Knollmann, P.E. Lammers, L.J. Marnett, P.P. Massion, J.A. Oates, Inhibition of the biosynthesis of prostaglandin E₂ by low-dose aspirin: implications for adenocarcinoma metastasis, *Cancer Prev. Res.* 9 (2016) 855–865, <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0094>.
- [103] L.-J. Ho, Deh-Ming Chang, Hen-Yih Shiau, Aspirin differentially regulates endotoxin-induced IL-12 and TNF- α production in human dendritic cells, *Scand. J. Rheumatol.* 30 (2001) 346–352, <https://doi.org/10.1080/030097401317148543>.
- [104] P. Krishnamurthy, J. Rajasingh, E. Lambers, G. Qin, D.W. Losordo, R. Kishore, IL-10 inhibits inflammation and attenuates left ventricular remodeling after myocardial infarction via activation of STAT3 and suppression of HuR, *Circ. Res.* 104 (2009), <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.188243>.
- [105] A. Domínguez Rodríguez, P. Abreu González, M.J. García González, J. Ferrer Hita, Association between serum interleukin 10 level and development of heart failure in acute myocardial infarction patients treated by primary angioplasty, *Rev. Esp. Cardiol.* 58 (2005) 626–630.
- [106] M. Jung, Y. Ma, R.P. Iyer, K.Y. DeLeon-Pennell, A. Yabluchanskiy, M.R. Garrett, M.L. Lindsey, IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation, *Basic Res. Cardiol.* 112 (2017) 33, <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0622-5>.
- [107] J.S. Burchfield, M. Iwasaki, M. Koyanagi, C. Urbich, N. Rosenthal, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction, *Circ. Res.* 103 (2008) 203–211, <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.178475>.
- [108] H.-L. Eng, Y.-Y. Hsu, T.-M. Lin, Differences in TLR7/8 activation between monocytes and macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 497 (2018) 319–325, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.079>.
- [109] J. Jason, L.K. Archibald, O.C. Nwanyanwu, M.G. Byrd, P.N. Kazembe, H. Dobbie, W.R. Jarvis, Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8 (2001) 1097–1103, <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.6.1097-1103.2001>.
- [110] M. Guillems, F. Ginhoux, C. Jakubzick, S.H. Naik, N. Onai, B.U. Schraml, E. Segura, R. Tussiwand, S. Yona, Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 571–578, <https://doi.org/10.1038/nri3712>.
- [111] K.S. Rogacev, B. Cremers, A.M. Zawada, S. Seiler, N. Binder, P. Ege, G. Große-Dunker, I. Heisel, F. Hornof, J. Jeken, N.M. Rebling, C. Ulrich, B. Scheller, M. Böhm, D. Fliser, G.H. Heine, CD14+ + CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events, *J. Am. Coll. Cardiol.* 60 (2012) 1512–1520, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.07.019>.
- [112] M. Kashiwagi, T. Imanishi, H. Tsujioka, H. Ikejima, A. Kuroi, Y. Ozaki, K. Ishibashi, K. Komukai, T. Tanimoto, Y. Ino, H. Kitabata, K. Hirata, T. Akasaka, Association of monocyte subsets with vulnerability characteristics of coronary plaques as assessed by 64-slice multidetector computed tomography in patients with stable angina pectoris, *Atherosclerosis* 212 (2010) 171–176, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.05.004>.
- [113] G.H. Heine, C. Ulrich, E. Seibert, S. Seiler, J. Marell, B. Reichart, M. Krause, A. Schlitt, H. Köhler, M. Girndt, CD14+ + CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients, *Kidney Int.* 73 (2008) 622–629, <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002744>.
- [114] K.S. Rogacev, S. Seiler, A.M. Zawada, B. Reichart, E. Herath, D. Roth, C. Ulrich, D. Fliser, G.H. Heine, CD14+ + CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease, *Eur. Heart J.* 32 (2011) 84–92, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq371>.
- [115] T. Imanishi, H. Ikejima, H. Tsujioka, A. Kuroi, K. Ishibashi, K. Komukai, T. Tanimoto, Y. Ino, T. Takeshita, T. Akasaka, Association of monocyte subset counts with coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris, *Atherosclerosis* 212 (2010) 628–635, <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2010.06.025>.
- [116] K. Layne, P. Di Giosia, A. Ferro, G. Passacuale, Anti-platelet drugs attenuate the expansion of circulating CD14^{high} CD16⁺ monocytes under pro-inflammatory conditions, *Cardiovasc. Res.* 111 (2016) 26–33, <https://doi.org/10.1093/cvr/cvw089>.
- [117] R.D. Stout, J. Suttles, The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses, *Immunol. Today* 17 (1996) 487–492, [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(96\)10060-1](https://doi.org/10.1016/0167-5699(96)10060-1).
- [118] M.R. Alderson, CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40, *J. Exp. Med.* 178 (1993) 669–674, <https://doi.org/10.1084/jem.178.2.669>.
- [119] P.A. Kiener, P. Moran-Davis, B.M. Rankin, A.F. Wahl, A. Aruffo, D. Hollenbaugh, Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes, *J. Immunol.* 155 (1995) 4917–4925.
- [120] L. Tian, R.J. Noelle, D.A. Lawrence, Activated T cells enhance nitric oxide production by murine splenic macrophages through gp39 and LFA-1, *Eur. J. Immunol.* 25 (1995) 306–309, <https://doi.org/10.1002/eji.1830250152>.
- [121] R.D. Stout, J. Suttles, J. Xu, I.S. Grewal, R.A. Flavell, Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice, *J. Immunol.* 156 (1996) 8–11.
- [122] J.C. Poe, D.H. Wagner, R.W. Miller, R.D. Stout, J. Suttles, IL-4 and IL-10 modulation of CD40-mediated signaling of monocyte IL-1 β synthesis and rescue from apoptosis, *J. Immunol.* 159 (1997) 846–852.
- [123] M.F. Jansen, M.R. Hollander, N. van Royen, A.J. Horrevoets, E. Lutgens, CD40 in coronary artery disease: a matter of macrophages? *Basic Res. Cardiol.* 111 (2016) 38, <https://doi.org/10.1007/s00395-016-0554-5>.
- [124] C.D. Garlachs, S. John, A. Schmeisser, S. Eskafi, C. Stumpf, M. Karl, M. Goppelt-Struebe, R. Schmieder, W.G. Daniel, Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia, *Circulation* 104 (2001) 2395–2400, <https://doi.org/10.1161/hc4501.099312>.
- [125] M.J. Szabolcs, P.J. Cannon, U. Thienel, R. Chen, R.E. Michler, L. Chess, M.J. Yellin, Analysis of CD154 and CD40 expression in native coronary atherosclerosis and transplant associated coronary artery disease, *Virchows. Arch.* 437 (2000) 149–159, <https://doi.org/10.1007/s00428000215>.
- [126] D. Bruemmer, U. Riggers, J. Holzmeister, M. Grill, F. Lippek, U. Settmacher, V. Regitz-Zagrosek, E. Fleck, K. Graf, Expression of CD40 in vascular smooth muscle cells and macrophages is associated with early development of human atherosclerotic lesions, *Am. J. Cardiol.* 87 (2001) 21–27, [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(00\)01266-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(00)01266-2).