

Université de Montréal

Régulation de l'activation et de l'adhésion des leucocytes, des cellules endothéliales et des plaquettes par la protéine C-réactive

Par

Tarek KHREISS

Département des Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention du grade de
Doctorat ès Philosophie (Ph.D.) en Sciences Biomédicales

Décembre 2005

© Tarek KHREISS, 2005



W
4
U58
2007
v.001



AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

**Régulation de l'activation et de l'adhésion des leucocytes, des cellules endothéliales
et des plaquettes par la protéine C-réactive**

Présenté par :

Tarek KHREISS

à été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Bruce G. Allen	président-rapporteur
Janos G. Filep	directeur de recherche
Yahye Merhi	membre du jury
Marek Rola-Pleszczynski	évaluateur externe

SOMMAIRE

Des études épidémiologiques et cliniques ont démontré une forte relation entre des marqueurs de l'inflammation et le risque de développement futur des maladies coronaires aiguës (CAD). Parmi ces marqueurs, la protéine C-réactive (CRP) prédit le développement des CAD chez les personnes apparemment saines et chez les patients ayant une angine de poitrine stable ou instable. Cependant, il est incertain si la CRP est seulement un marqueur ou un médiateur des CAD. De plus, peu est connu sur les mécanismes moléculaires de la CRP, puisque des effets pro- et anti-inflammatoires ont été observés. Nous avons trouvé qu'un réarrangement structurel de la CRP en une forme monomérique et/ou modifiée (mCRP) est pré-requis pour ses actions pro-inflammatoires. Contrairement à la CRP, seulement la mCRP, via la voie de signalisation de la p38 MAPK, augmente l'expression des molécules d'adhésions ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1 et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires MCP-1 et IL-8 chez les cellules endothéliales coronaires artérielles humaines (HCAEC). Ces changements phénotypiques promouvoient l'adhésion des neutrophiles sur les HCAECs. La mCRP induit la formation du peroxy-nitrite chez les neutrophiles, l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP-1 et conséquemment la production et sécrétion d'IL-8. La mCRP augmente l'expression de la P-sélectine sur les plaquettes suite à un stress par le cisaillement et subséquemment la capture des neutrophiles par les plaquettes et l'agrégation homotypique des neutrophiles. Par contre, la forme native de la CRP diminue l'expression de la P-sélectine et prévient la capture des neutrophiles par les plaquettes. Les actions de la CRP ont été réduites considérablement par un anticorps anti-CD32 alors que les effets de la mCRP ont été médiés principalement par le CD16. Nos études démontrent un lien entre la CRP, l'IL-8, le stress nitrosatif, l'activation des neutrophiles, des cellules endothéliales et des plaquettes, tous impliqués dans la prédiction des CAD. Ces résultats nous indiquent clairement qu'un réarrangement structurel de la CRP en la mCRP pourrait contribuer au développement des syndromes coronaires aigus.

MOTS CLÉS

Protéine C-réactive, neutrophile, endothélium, plaquette, cytokines, molécules d'adhésion, peroxy-nitrite, signal de transduction, inflammation, maladies coronaires aiguës.

ABSTRACT

Epidemiological and clinical studies have shown a strong relationship between circulating markers of inflammation and risk prediction of future coronary artery disease (CAD). Among these markers, elevated plasma levels of C-reactive protein (CRP) are predictive for subsequent acute coronary events in apparently healthy men and women and patients with stable or unstable angina. However, the key question whether CRP is a corollary marker or mediator of CAD remains hotly debated. Furthermore, both pro- and antiinflammatory actions of CRP have been reported, whereas little is known about the molecular mechanisms underlying these effects. We have found that structural rearrangement of CRP, yielding monomeric and/or modified form of CRP (mCRP) is a prerequisite for expression of its proinflammatory actions. Unlike CRP, mCRP, through a p38 MAPK dependent pathway, increased the release of the proinflammatory cytokines MCP-1 and IL-8 and the expression of the adhesion molecules ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 in human coronary artery endothelial cells (HCAEC). These phenotypic changes promoted neutrophil adhesion to the HCAEC. mCRP also induced ONOO⁻ formation in human neutrophil granulocytes, activation of nuclear factor- κ B and activator protein-1 and consequently IL-8 gene expression and secretion. In addition to neutrophil and endothelial cell activation, mCRP enhanced shear induced platelet P-selectin expression and increased the rate and extent of platelet capture of neutrophils and subsequently neutrophil aggregation under shear in human whole blood. On the other hand, native CRP decreased platelet P-selectin expression and prevented platelet capture of neutrophils. The actions of CRP were markedly reduced, though never completely inhibited, by a function-blocking anti-CD32 antibody whereas the mCRP effects were predominantly mediated via CD16. Our studies provide a link between CRP, IL-8, nitrosative stress, neutrophil, endothelial cell and platelet activation, all implicated in predicting future acute CAD. These results demonstrate that structural rearrangement of CRP in mCRP could contribute to the development of the acute coronary syndromes.

KEY WORDS

C-reactive protein, neutrophils, endothelium, platelets, cytokines, adhesion molecules, peroxynitrite, signal transduction, inflammation, acute coronary heart disease.

REMERCIEMENTS

Il m'aurait été impossible de produire cette thèse sans l'assistance et le support de plusieurs de mes collègues et amis. À ceux que je n'ai pas mentionné par leurs noms, je vous remercie de votre assistance et support pendant mes études de Doctorat à l'Université de Montréal.

J'aimerais exprimer des remerciements spéciaux à mon directeur qui m'a fourni l'occasion et l'assistance financière pour accomplir mes études. Ses conseils et son encouragement constant ont joué un rôle essentiel dans le succès de mes études de Doctorat et de mon développement comme scientifique.

Je suis aussi reconnaissant pour l'assistance et la coopération de mes collègues qui ont travaillé avec moi durant mes études. Ma gratitude va surtout à Levente József pour son encouragement, enthousiasme et support dans tous les aspects du travail.

J'aimerais prendre cette opportunité afin d'exprimer ma gratitude à ma famille, mon père Ali Khreiss, ma mère Samira Khreiss, ma soeur May Khreiss sans oublier ma petite nièce adorable Zeinab, mon frère Samir Khreiss, sa femme Malak et le petit Aly pour leur attention et leur amour ainsi que leur encouragement tout au long de mes études. Finalement, un merci infini à ma femme Paméla pour son amour, ses conseils ainsi que son soutien dans les moments les plus difficiles tout au long de mes études. À tous, je leur dédie ce mémoire.

CONTENU

SOMMAIRE.....	III
MOTS CLÉS	III
ABSTRACT.....	IV
KEY WORDS.....	IV
REMERCIEMENTS	V
LISTE D'ABRÉVIATIONS.....	IX
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	XII
LISTE DES CO-AUTEURS.....	XV
I. INTRODUCTION.....	1
1. L'inflammation et les maladies coronaires aiguës	1
1.1 Généralité de l'inflammation	2
2. Les neutrophiles	4
2.1 La fonction des neutrophiles.....	4
2.2 L'adhésion des neutrophiles	5
2.3 Les radicaux libres, la dégranulation et l'élimination bactérienne	5
2.4 L'apoptose et la résolution de l'inflammation aiguë	7
2.5 L'implication pathologique des neutrophiles.....	10
<i>L'ischémie et la réperfusion.....</i>	<i>11</i>
<i>Le syndrome coronaire aigu (ACS)</i>	<i>11</i>
3. Les plaquettes	12
3.1 L'adhésion des plaquettes	13
3.2 L'activation des plaquettes	15
3.3 L'aggrégation des plaquettes	17
3.4 Les plaquettes et la thrombose artérielle.....	18

4. Les cellules endothéliales.....	20
4.1 Adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales	21
<i>Roulement et "tethering"</i>	21
<i>État d'amorçage" (priming) des neutrophiles durant le roulement</i>	22
<i>Adhésion ferme et "spreading"</i>	22
4.2 L'extravasation et la diapédèse des leucocytes vers les stimuli inflammatoires	23
<i>La migration trans-endothéliale</i>	23
<i>La signalisation par les chemoattractants</i>	24
4.3 Réponse à une lésion endothéliale	25
5. La protéine C-réactive (CRP).....	27
5.1 Les récepteurs de CRP	29
5.2 L'implication de la protéine C réactive dans l'inflammation	29
5.3 La CRP comme un marqueur des maladies cardiovasculaires	32
6. L'interleukine-8.....	36
6.1 La structure et la biosynthèse de l'interleukine-8	36
6.3 Les récepteurs et la signalisation de l'interleukine-8.....	38
6.4 Les activités biologiques de l'interleukine-8	39
6.5 L'interleukine-8 comme un marqueur des maladies cardiovasculaires	41
Le peroxynitrite.....	43
7.1 L'activation des voies de signalisations par le peroxynitrite	44
7.2 Les nitrotyrosines comme un marqueur des maladies cardiovasculaires	46
II. HYPOTHESE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	49
III. RÉSULTATS	50
CHAPITRE I (Article 1)	50
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS	51
INTRODUCTION GÉNÉRALE DU CHAPITRE I	52
ABSTRACT	54
INTRODUCTION.....	56

METHODS	57
RESULTS	60
DISCUSSION	63
REFERENCES	68
FIGURES-LEGENDS	73
CHAPITRE II (Article 2)	79
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS	80
INTRODUCTION GÉNÉRALE DU CHAPITRE II	81
ABSTRACT	83
INTRODUCTION	84
METHODS	85
RESULTS	90
DISCUSSION	94
REFERENCES	100
FIGURES-LEGENDS	106
CHAPITRE III (Article 3)	114
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS	115
INTRODUCTION GÉNÉRALE DU CHAPITRE III	116
ABSTRACT	118
INTRODUCTION	120
METHODS	121
RESULTS	125
DISCUSSION	129
REFERENCES	134
FIGURES-LEGENDS	140
IV. DISCUSSION GÉNÉRALE	146
V. CONCLUSIONS	164
VI. DIRECTIONS FUTURES	167
VII. LISTE DES PUBLICATIONS	169
VIII. BIBLIOGRAPHIE	170

LISTE D'ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
Akt	Protéine kinase B
AP-1	Protéine activatrice-1
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BAD	Bcl-2 family associated death protein
CRP	Protéine C-réactive
DHR123	Dihydrorhodamine123
eNOS	Synthase d'oxide nitrique endothéliale
ERK	Kinase régulée par un signal extracellulaire
ET-1	Endothéline-1
FcγR	Récepteur Fcγ
FITC	Fluoresceine isothiocyanate
fMLP	Formyl methioninyl-leucyl-phenylalanine
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GP	Glycoprotéine
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HCAEC	Cellule endothéliale artérielle coronaire humaine
HOCl	Acide hypochlorique

ICAM-1	Molécule d'adhésion intercellulaire-1
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
IP ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate
JAM-3	Molécule d'adhésion de jonction-3
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-1	CD11b/CD18
MAPK	Protéine kinase activée par mitogène
mCRP	Protéine C-réactive monomérique/modifiée
NF-κB	Facteur nucléaire κB
NO	Monoxide d'azote
O ₂ ⁻	Superoxide
ONOO ⁻	Peroxynitrite
OxLDL	Lipoprotéine de faible densité oxydée
PAF	Facteur d'activation plaquettaire
PAR	Récepteur activé par protéases
PDTC	Prolinedithiocarbamate
PECAM	Molécule d'adhésion cellulaire des plaquettes/endothélium
PGI ₂	Prostacycline
PI-3K	Phosphatidyl inositol 3 kinase
PIP ₃	Phosphatidyl inositol 3,4,5-trisphosphate
PIP-K	Phosphatidyl inositol 4-phosphate kinase
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C

PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PMN	Leucocyte polymorphonucléaire
PSGL-1	Ligand glycoprotéique de la P-sélectine
RFU	Unité relative de fluorescence
ROS	Espèce reactive oxygénée
SAA	Protéine de sérum amyloïde A
TIMP	Inhibiteur tissulaire de métalloprotéinase
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
tPA	Activateur du plasminogène tissulaire
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Facteur de croissance endothéliale vasculaire
vWF	Facteur de von Willebrand

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Introduction

Figure 1 : Rôle possible des MAPKs et de PI3K dans la survie et l'apoptose des neutrophiles.....	10
Figure 2 : Interactions des plaquettes, des leucocytes et de l'endothélium.....	15
Figure 3 : Mécanismes d'activation et agrégation des plaquettes	17
Figure 4 : Représentation schématique de la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire.....	24
Figure 5 : Structure pentamérique de la protéine C-réactive humaine.	28
Tableau I: Actions pro- et anti-inflammatoires de la protéine C-réactive	30
Tableau II: Facteurs de risques "Odds ratio (OR)" pour le développement futur de CAD.....	33
Tableau III: Association des concentrations plasmatiques de CRP avec les maladies cardiovasculaires dans 22 études cliniques.....	34
Tableau IV: Effet de la protéine C-réactive sur l'athérosclérose chez les souris transgéniques.....	35
Figure 6 : Structure du gène humain de l'interleukine-8.....	37
Figure 7: Rôle possible d'IL-8 dans le recrutement et la transmigration des leucocytes dans un myocarde endommagé.....	40
Tableau V : Facteurs de chances "Odds ratio (OR)" pour le développement futur de CAD.....	42
Équation 1 : Réaction de formation du peroxy-nitrite.....	43
Figure 8 : Certaines voies intracellulaires activées par le peroxy-nitrite.....	45
Tableau VI: Facteurs de chances "Odds ratio (OR)" pour le développement futur de CAD.....	48

Résultats***Chapitre I (Article 1)***

- Figure 1:** Effects of CRP isoforms on IL-8 and MCP-1 release in HCAECs.....73
- Figure 2:** Effect of p38 MAPK inhibition on mCRP-stimulated IL-8 and MCP-1 release.....74
- Figure 3:** Effects of mCRP and native CRP on IL-8, MCP-1, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, L32 and GAPDH mRNA expression.....75
- Figure 4:** Induction of adhesion molecule expression by mCRP.....76
- Figure 5:** mCRP but not native CRP promotes neutrophil adhesion to HCAECs...77
- Figure 6:** Effect of anti-CD16 and anti-CD32 antibody on HCAEC responses to mCRP..... 78

Chapitre II (Article 2)

- Figure 1:** CRP isoforms induce IL-8 release from neutrophils and whole blood.106
- Figure 2:** Effects of mCRP and CRP on IL-8 mRNA expression.....107
- Figure 3:** mCRP induces formation of superoxide, NO, and ONOO⁻..... 108
- Figure 4:** Effect of mCRP on expression of NOS isoforms.....109
- Figure 5:** Involvement of intracellular Ca²⁺, PKC, and PI3-kinase in mCRP-induced peroxynitrite formation110
- Figure 6:** mCRP stimulation of nuclear accumulation of NF-κB and AP-1 and inhibition with L-NAME..... 111
- Figure 7:** Inhibition of NF-κB activation suppresses mCRP-induced IL-8 release..... 112
- Figure 8:** Involvement of CD16 in mCRP signalling..... 113

Chapitre III (Article 3)

- Figure 1:** Real-time flow cytometry analysis of neutrophil-platelet and neutrophil-neutrophil aggregates.....140

Figure 2:	Kinetics of neutrophil-platelet and neutrophil aggregate formation and its modulation by CRP isoforms.....	141
Figure 3:	Effects of CRP isoforms on kinetics of platelet P-selectin (CD62P) expression and association of platelets with singlet neutrophils.....	142
Figure 4:	Contribution of P-selectin (CD62P), L-selectin (CD62L), and β_2 -integrin (CD18) to platelet-neutrophil and neutrophil-neutrophil adhesion.....	143
Figure 5:	Dependence of platelet-neutrophil and neutrophil-neutrophil adhesion on Mac-1 (CD11b).....	144
Figure 6:	Involvement of CD32 in CRP signalling and CD16 in mCRP signalling.....	145

Discussion

Figure 9 :	Schéma proposé de l'activation des HCAECs par la forme modifiée de la protéine C-réactive.....	148
Figure 10 :	Action de mCRP sur le retardement de l'apoptose chez les neutrophiles humains.....	150
Figure 11 :	Modèle proposé pour l'activation des neutrophiles humains par la forme modifiée de la protéine C-réactive.....	152
Figure 12 :	Modèle proposé dans la régulation de l'adhésion plaquette-neutrophile par les différentes formes de la protéine C-réactive.....	156
Figure 13 :	Mécanisme récapitulatif proposé de l'action de CRP et de mCRP sur l'activation des interactions cellulaires lors des maladies coronaires aiguës.....	161
Figure 14 :	Mécanisme récapitulatif proposé de l'action de CRP et de mCRP dans l'implication du développement des pathologies athérotrombotiques.....	162

LISTE DES CO-AUTEURS

Janos G. Filep

Lawrence A. Potempa

Levente Jozsef

To Whom It May Concern:

We the undersigned agree and consent that Tarek Khreiss can use the following article in his Ph.D. thesis entitled: **“Régulation de l’adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales et de leurs survies par la protéine C-réactive”**, to be submitted to the faculté des études supérieures, Université de Montréal.

Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. (2004) Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation* 109: 2016-2022.

Name

Signature

Levente Jozsef

Lawrence A. Potempa

Janos G. Filep

To Whom It May Concern:

We the undersigned agree and consent that Tarek Khreiss can use the following article in his Ph.D. thesis entitled: **“Régulation de l’adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales et de leurs survies par la protéine C-réactive”**, to be submitted to the faculté des études supérieures, Université de Montréal.

Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. (2004) Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood. *Circulation* 110:2713-2720.

Name

Signature

Levente Jozsef

Lawrence A. Potempa

Janos G. Filep

To Whom It May Concern:

We the undersigned agree and consent that Tarek Khreiss can use the following article in his Ph.D. thesis entitled: **“Régulation de l’adhésion des leucocytes sur les cellules endothéliales et de leurs survies par la protéine C-réactive”**, to be submitted to the faculté des études supérieures, Université de Montréal.

Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. (2005) Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *Circulation Research* 97:690-697.

Name

Signature

Levente Jozsef

Lawrence A. Potempa

Janos G. Filep

I. INTRODUCTION

1. L'inflammation et les maladies coronaires aiguës

Les maladies cardiovasculaires sont présentement la principale cause de décès dans les pays industrialisés (Murray et al, 1997). L'athérosclérose, considérée une maladie inflammatoire progressive caractérisée par l'accumulation de lipides et d'éléments fibreux dans les artères, contribue principalement à la croissance du développement de ces maladies cardiovasculaires. L'athérosclérose est une maladie qui se développe lentement et peut commencer relativement en bas âge. Le développement des plaques athéromateuses dans les artères au cours des années et l'érosion de ces plaques mènent éventuellement aux complications thrombotiques de l'athérosclérose et à l'apparition des syndromes coronaires aiguës. Dans notre laboratoire, nos intérêts spécifiques s'attardent particulièrement aux phases aiguës de l'inflammation. L'association de l'inflammation avec l'initiation, la progression et la complication de l'athéromatose suggèrent que la détection de marqueurs de l'inflammation chez les personnes apparemment saines ou chez les patients malades serait probablement utile afin de prédire les risques des manifestations des maladies coronaires. Un de ces facteurs prédictifs de risques pour le développement des maladies cardiovasculaires est la protéine C-réactive (CRP). Durant les dernières années, l'importance de CRP dans la prédiction des maladies cardiaques fut le sujet de nombreux débats scientifiques et littéraires. Or dans cette étude, je discuterai des mécanismes moléculaires de la protéine C-réactive sur différentes cellules inflammatoires impliquées dans l'apparition et le développement des maladies cardiovasculaires.

1.1 Généralité de l'inflammation

La réponse inflammatoire est étroitement liée avec le processus de réparation. L'inflammation sert à détruire, diluer, ou bien éliminer les agents pathogènes, mais en retour, met en branle une série d'évènements nécessaire à la reconstitution des tissus endommagés. La réparation commence durant les premières phases de l'inflammation et se complète lorsque tous les agents pathogènes sont neutralisés. Durant la réparation, les tissus endommagés sont remplacés par la régénération de cellules parenchymateuses natives ou par des tissus de fibroblastes, ou bien de façon plus commune, par la combinaison des deux processus.

L'inflammation est fondamentalement une réponse protectrice dont le but ultime est de se débarrasser des organismes causant les dommages tissulaires (i.e. microbes, toxines) et des conséquences du dommage tissulaire telles que les cellules et tissus nécrotiques.

L'inflammation peut être soit aiguë ou chronique. L'inflammation aiguë est relativement de courte durée, et dure généralement quelques minutes, heures, ou bien jours. Ses principales caractéristiques sont l'exudation de fluide et les protéines plasmatiques (oedème) et la migration des leucocytes, principalement des neutrophiles. De l'autre côté, l'inflammation chronique est associée avec la présence de lymphocytes, de neutrophiles et de monocytes/macrophages, elle est d'une plus longue durée et occasionne la prolifération des vaisseaux sanguins et des tissus connectifs.

L'inflammation aiguë comporte trois composantes majeures : (1) L'altération de la vascularisation menant à une augmentation du flux sanguin. Le temps de durée de la vasodilatation dépend du stimuli, (2) des changements structuraux de la circulation capillaire (augmentation de perméabilité) permettant aux protéines plasmatiques et aux

leucocytes de quitter la circulation, et (3) la margination leucocytaire décrit comme la migration des leucocytes des capillaires et leur accumulation au locus du dommage telle que l'orientation périphérique des leucocytes, principalement les neutrophiles, le long de l'endothélium activé. Les leucocytes adhèrent lâchement à l'endothélium (processus appelé roulement), pour ensuite s'attacher plus fortement et finalement transmigrer dans les tissus interstitiels (voir section cellules endothéliales).

Cependant, l'inflammation et la réparation peuvent être potentiellement dangereuses. Les réactions inflammatoires, par exemple, peuvent déclencher des réactions d'hypersensibilités à des morsures d'insectes, des médicaments et des toxines, ainsi qu'à certaines des maladies chroniques/aiguës des temps modernes telles que la fibrose des poumons, l'arthrite rhumatoïde et l'athérosclérose/thrombose.

Dans le contexte des maladies cardiovasculaires, l'inflammation joue un rôle important dans toutes les étapes de l'athéromatose. Il est maintenant bien reconnu que parmi les cellules inflammatoires impliquées dans la progression de l'athéromatose, les cellules endothéliales, les neutrophiles et les plaquettes jouent un rôle important. L'activation de ces cellules, mène au relâchement de médiateurs pro-inflammatoires tels que les molécules d'adhésions, les chemokines, les espèces réactives oxygénées (ROS) ainsi que les protéines de phases aiguës telles que la protéine C-réactive (CRP) et la protéine de sérum amyloïde A (SAA). Bien que les mécanismes cellulaires et moléculaires menant à une inflammation ne sont pas complètement élucidés, il est maintenant clair que les différents médiateurs produits par ces cellules inflammatoires et l'interaction entre ces cellules sont des facteurs importants à prendre en considération pour bien comprendre les dommages causés par l'inflammation. Il serait ainsi crucial de bien comprendre l'initiation et l'amplification de la réponse inflammatoire afin de

développer des agents thérapeutiques qui apaiseraient l'inflammation et faciliteraient cette réponse sans compromettre l'intégrité et l'activité normale des cellules impliquées dans l'inflammation.

2. Les neutrophiles

La notion que l'inflammation est le résultat net des voies de signalisations pro et anti-inflammatoires (Fauve et al, 1980) est bien illustrée par le double rôle des neutrophiles combinant un rôle anti-infectieux et pro-inflammatoires (Klebanoff et al, 1992; Ward et al, 1999; Weiss et al, 1989). Les neutrophiles composent essentiellement une partie du système de défense de l'hôte. Ils sont fabriqués dans la moelle osseuse et leur tâche est de protéger et de maintenir l'environnement biologique interne de l'organisme. Plus précisément, le rôle primaire des neutrophiles est la destruction des microbes envahissants.

2.1 La fonction des neutrophiles

Les facteurs chimiotactiques générés par l'interaction des protéines plasmatiques avec les antigènes, pathogènes et chémokines attirent les neutrophiles de la circulation sanguine au site d'infection. Les neutrophiles ingèrent les micro-organismes opsonisés en les entourant grâce à leur pseudopodes afin de les fusionner avec une vésicule appelée phagosome et ensuite déchargent leur contenu; un processus nommé dégranulation. Les neutrophiles réduisent enzymatiquement l'oxygène moléculaire afin de générer des métabolites actifs tels que le superoxide (O_2^-), peroxide d'hydrogène (H_2O_2), et l'acide hypochlorique (HOCl) nécessaire à la destruction des microbes phagocytés (Kasper et al, 2005).

2.2 Le recrutement des neutrophiles

Les neutrophiles migrent au site d'infection grâce à l'expression d'une multitude de molécules d'adhésions (Anderson et al, 1984; Sleigh et al, 1993). Les interactions adhésives à l'endothélium enflammé se font par l'entremise de certaines de molécules d'adhésions exprimées sur l'endothélium et leurs contre-récepteurs sur les neutrophiles. Le contrôle de l'expression de ces molécules d'adhésions à la surface cellulaire peut être médié en partie par différents médiateurs pro-inflammatoires tels que les chimiokines (IL-6, IL-8) (Montrucchio et al, 2000, Watson et al, 1996), les protéines de phases aiguës (SAA, CRP) (Khreiss et al, 2004, Badolato et al, 1994) et les espèces réactives oxygénées "reactive oxygen species" ou ROS (Suzuki et al, 1989, Lo et al, 1993). (Le recrutement des neutrophiles aux cellules endothéliales sera discuté plus en détail dans la section 4).

2.3 Les radicaux libres, la dégranulation et l'élimination bactérienne

Les molécules microbicides dérivées des neutrophiles sont emmagasinées dans des granules et puis relâchées lors d'une activation cellulaire (Elsbach et al, 1998; Lehrer et Granz, 1999; Spitznagel et al, 1990). Le transport intracellulaire protéique, leur cheminement vers divers compartiments, et leur éventuel sécrétion dans le milieu extracellulaire représente un mécanisme crucial lors de l'activation des neutrophiles. La production des radicaux libres et la dégranulation des vésicules dans les phagolysosomes ou dans l'espace extracellulaire sont des événements clés de l'activité microbicide (Berton et al, 1999b). Les granules sont composées de trois types. Les *granules azurophiliques* contiennent des protéases, des défensines, des peptides microbicides, la myéloperoxidase et une enzyme oxydant l'ion Cl⁻. Les *granules spécifiques* contiennent

l'apolactoferrine et la collagénase alors que les *granules gélatinases* contiennent la gélatinase. Aussi, ces facteurs peuvent médier les dommages tissulaires induis par les neutrophiles (Topham et al, 1998).

La destruction des microbes impliquent deux actions de la part des neutrophiles : la dégranulation et l'activation de l'éclatement respiratoire "respiratory burst". La dégranulation réfère au processus dépendent du calcium par lequel les granules fusionnent avec la membrane plasmique et relâche leur contenu dans la vésicule phagocytaire ou dans l'environnement extérieur. Les granules azurophiliques dégranulent presque totalement dans les vésicules phagocytiques. L'acide hypochlorique (HOCl), formé par la réaction de la myéloperoxidase et le H_2O_2 , détruit alors les pathogènes ingérés. Quant aux granules spécifiques, ils dégranulent dans les vésicules phagocytiques ou dans l'environnement extérieur (Kasper et al, 2005).

L'éclatement respiratoire produit des microbicides oxydants puissants par la réduction partielle de l'oxygène. L'oxygène est réduit en O_2^- par la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). La majorité de l' O_2^- réagit avec lui même pour donner le H_2O_2 . Une portion du H_2O_2 est convertie en un radical hydroxyle (.OH) réactif. Tous ces oxydants attaquent et tuent les micro-organismes en oxydant leurs constituants cellulaires (Kasper et al, 2005). Cependant, un déséquilibre entre l'activation et l'inhibition de ces mécanismes de défenses peuvent induire un dommage excessif des tissus normaux et contribuer au développement de plusieurs maladies chroniques et aiguës.

2.4 L'apoptose et la résolution de l'inflammation aiguë

La majorité des réponses inflammatoires se terminent spontanément grâce au "programme d'arrêt" endogène qui met fin à l'inflammation et limite la destruction des tissus de l'hôte. Ce "programme d'arrêt" inclus l'élimination des agents infectieux par phagocytose, la diminution progressive du recrutement des neutrophiles par des "signaux d'arrêts" endogènes, et finalement, l'apoptose et la clairance des neutrophiles (Liles et Klebanoff, 1995).

L'apoptose des neutrophiles

Les neutrophiles possèdent un temps de vie relativement court qui est d'environ 12 heures. Ainsi, dès leur sortie de la moelle osseuse, les neutrophiles sont constitutivement programmés à mourir par apoptose à moins d'un signal de l'environnement retardant leur mort cellulaire. L'apoptose joue un rôle vital dans le maintien du nombre de neutrophiles en circulation, l'élimination efficace des pathogènes envahissant, ainsi que dans le contrôle de la durée et de l'intensité de la réponse inflammatoire et par conséquent l'ampleur du dommage tissulaire médié par les neutrophiles.

Les changements morphologiques et fonctionnels

Les changements morphologiques des neutrophiles en apoptose sont typiques du scénario apoptotique général. Les caractéristiques sont le rétrécissement de la cellule et des organelles intracellulaires, la condensation et la fragmentation de la chromatine nucléaire, la perte de la forme multilobée du noyau et la formation de corps apoptotiques

avec ou sans restes nucléaires. Tous ces événements sont discernables dans les cultures de neutrophiles, c'est-à-dire durant le vieillissement *in vitro*.

D'une manière primordiale, les changements apoptotiques sont accompagnés d'un déclin des fonctions cellulaires, particulièrement des réactions modérées par des récepteurs. Les neutrophiles qui entrent dans le processus apoptotique perdent les capacités de chémotaxie, de phagocytose, de l'éclat oxydant et de la dégranulation (Whyte et al, 1993; Dransfield et al, 1995). Ceci pourrait être dû à la perte d'expression des récepteurs et du dysfonctionnement des voies de signalisations qui y sont associées, car la stimulation récepteur-indépendante par exemple avec le PMA, reste moins altérée dans les cellules apoptotiques (Whyte et al, 1993). En dépit de l'hyperexpression des intégrines $\beta 2$ (CD18/CD11b), les neutrophiles apoptotiques ne peuvent pas adhérer, en raison de la dégradation des filaments d'actines et de la plus grande rigidité de la membrane plasmique, qui empêche l'aplatissement cellulaire sur le substrat (Dransfield et al, 1995; Greenstein et al, 2000; Kothakota et al, 1997). Ensemble, ces données indiquent que l'apoptose des neutrophiles mène en effet à la détérioration de leurs fonctions.

La régulation de l'apoptose et de la survie des neutrophiles

L'apoptose est contrôlée par deux voies principales: extrinsèque (par les récepteurs de la mort) et intrinsèque (via la mitochondrie) (Danial et al, 2004).

La signalisation extrinsèque est initiée par la liaison du ligand de la mort à son récepteur apparenté de la surface cellulaire (Ashkenazi et Dixit, 1998). Bien que cette voie soit présente chez les neutrophiles, elle ne semble pas jouer un rôle important dans l'apoptose constitutive ni lors du délai de ce dernier lors de l'inflammation (Brown et

Savill, 1999; Renshaw et al, 2000). Les neutrophiles de souris CD95 déficientes (manquant Fas) subissent l'apoptose constitutive (ou spontanée) au même taux que les souris témoins, témoignant contre un rôle pour le système Fas dans l'apoptose constitutive (Fecho et Kohen, 1998; Villunger et al, 2000).

Contrairement à la voie extrinsèque qui transmet un ensemble spécialisé de stimulus de la mort, la voie intrinsèque intègre un large éventail de stress extracellulaires et intracellulaires. Les stimuli extracellulaires incluent des insuffisances de facteurs de survies, les rayonnements, et tout autre stress chimiques et physiques, tandis que les stimuli intracellulaires incluent le stress oxydatif, les dommages à l'ADN, et le mauvais repliement des protéines.

La voie apoptotique intrinsèque reste encore évasive chez les neutrophiles, bien qu'elle doivent être d'importance majeure car les neutrophiles sont destinés à une mort cellulaire rapide sans influence externe (i.e. spontanément) (Scheel-Toellner et al, 2004).

L'apoptose des neutrophiles et leur ingestion subséquente par les macrophages est le mécanisme majeur pour l'élimination des neutrophiles qui ont été recrutés au site enflammé entraînant ainsi la résolution de l'inflammation (Cox et al, 1995; Savill, 1997). Cependant, des médiateurs de l'inflammation tels que le LPS (Colotta et al, 1992; Lee et al, 1993), GM-CSF (Klein et al, 2000; Ottonello et al, 2002), IL-1 (Rowe et al, 2002) et mCRP (Khreiss et al, 2002) peuvent retarder l'apoptose des neutrophiles en augmentant la stabilité mitochondriale, en réduisant l'activité de la caspase-3 et en activant la phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) et l'ERK (Watson et al, 1999; Klein et al, 2000, Khreiss et al, 2002) (Voir figure 1). Le retardement de l'apoptose lorsque les neutrophiles transmigrent à travers la couche de cellules endothéliales est associé avec un signal de

l'extérieur vers l'intérieur ("outside-in signaling") via les molécules d'adhésions CD11a et CD11b (Watson et al, 1997).

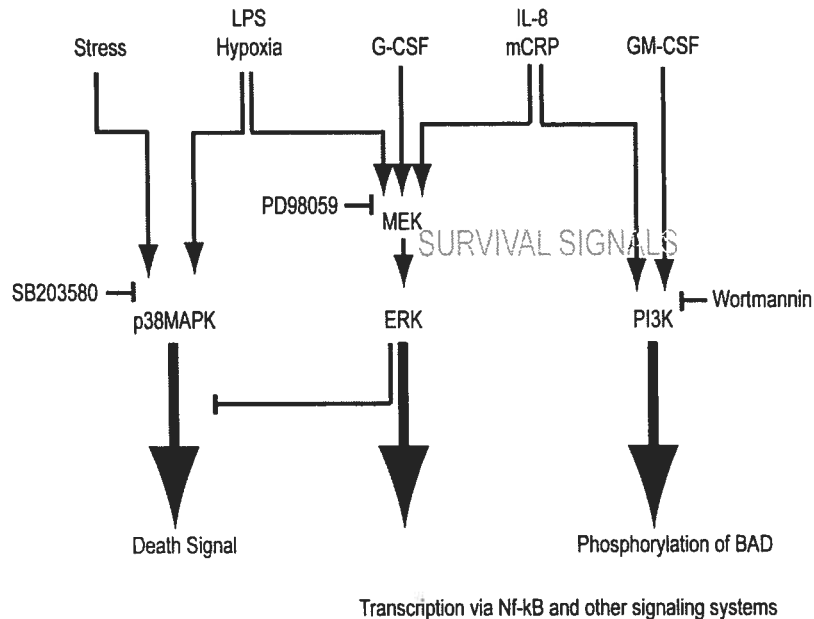


Figure 1: Rôle possible des MAPKs et de PI3K dans la survie et l'apoptose des neutrophiles. Modifié de Akgul et al, 2001.

2.5 L'implication pathologique des neutrophiles

Le rôle majeur des neutrophiles dans la défense de l'hôte est la réponse rapide contre des micro-organismes invasifs. Cependant, afin de différencier efficacement entre les antigènes de l'hôte et les antigènes étrangers, les neutrophiles ont besoin de composants solubles du système immunitaire (i.e. les anticorps, les compléments C3 et C5, et les cytokines) pour sélectionner leur cible. La réponse non spécifique des neutrophiles et leur puissante composante granulaire sont les deux principaux mécanismes par lesquels les neutrophiles peuvent endommager les tissus normaux. Ainsi, les neutrophiles sont impliqués dans plusieurs maladies, incluant les infections bactériennes, les maladies

associées aux dépôts de cristaux telle que l'arthrite, les maladies associées aux complexes immuns telle que le lupus érythémateux, les maladies occasionnées par l'ischémie et la réperfusion telle l'ischémie myocardique et les maladies coronariennes telles que l'athérombose.

L'ischémie et la réperfusion

Le phénomène de l'ischémie-réperfusion est une des pathologies les plus étudiées. Le dommage tissulaire après une ischémie semble être non seulement une conséquence de l'hypoxie mais aussi du processus de réperfusion qui mène à une réponse inflammatoire. Après l'évènement initial de l'ischémie, un grand nombre de cytokines, de composantes du complément, et contenu cellulaire sont relâchés activant ainsi l'endothélium et induisant le recrutement des neutrophiles. Les neutrophiles infiltrés sont une source potentielle d'espèces réactives oxygénées, d'enzymes protéolytiques, et de cytokines, qui durant la réperfusion peuvent jouer un rôle crucial (Bagge et al, 1980). Sous ces conditions, les cellules endothéliales sont activées, expriment à leur surface cellulaire des molécules d'adhésions telles que l'ICAM-1, l'E-sélectine et le VCAM-1, et relâchent une variété de substances telles que des cytokines, l'ET-1, le PAF et l'IL-8 (Takahashi et al, 2001, Zouki et al, 1999, Strieter et al, 1989).

Le syndrome coronaire aigu (ACS)

Lors du ACS, au stade final de l'athérosclérose, les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans le processus inflammatoire menant au dommage tissulaire des vaisseaux ainsi qu'à la thrombose. En effet, différentes équipes ont démontré une activité des neutrophiles chez les patients ayant une angine instable telles que la relâche d'élastase et

de myeloperoxydase (Dinerman et al, 1990, Buffon et al, 2002). De plus, récemment une autre équipe a démontré que le niveau de myéloperoxydase dans le sérum, une enzyme prédominante chez les neutrophiles, pouvait prédire la mort par l'infarctus du myocarde chez les patients à risque indépendamment du niveau de CRP dans le sérum (Baldus et al, 2003). Or, il serait primordial d'élucider les mécanismes reliant l'activation des neutrophiles et leurs interactions avec les autres cellules inflammatoires, telles que les plaquettes et les cellules coronaires artérielles endothéliales, impliquées dans le développement des maladies pro-thrombotiques.

3. Les plaquettes

Les plaquettes sont des cellules énucléées du sang qui proviennent du cytoplasme des mégacaryocytes dans la moelle osseuse et qui circulent afin de surveiller l'intégrité du système vasculaire discriminant entre les cellules endothéliales normales et les lésions vasculaires. Dans des conditions physiologiques, leur rôle contribue à l'hémostase, processus qui arrête l'hémorragie suite à un trauma tissulaire. Cependant, lors de maladies vasculaires, l'activation des plaquettes peut mener à l'occlusion thrombotique de la lumière du vaisseau, à l'obstruction du flux sanguin et au dommage tissulaire.

Le principal déclencheur de la thrombose hémostatique suite à un traumatisme vasculaire est la perte de la barrière cellulaire endothéliale exposant ainsi la circulation sanguine aux composantes de la matrice extracellulaire. La réponse des plaquettes suite à une dénudation de l'endothélium se développe en trois événements successifs et intimement liés : l'adhésion, l'activation et l'agrégation.

3.1 L'adhésion des plaquettes

Dépendamment de la profondeur de la lésion, les plaquettes viennent en contact avec différents constituants de la matrice extracellulaire. Les protéoglycans, le collagène type IV, la laminine et la fibuline sont les principaux constituants de la membrane basale qui sont exposés au sang suite à une rupture de l'endothélium. Le collagène peut éliciter l'adhésion et l'activation des plaquettes (Saelman et al, 1994). Deux glycoprotéines (GPs) membranaires plaquettaires, l'intégrine- $\alpha_2\beta_1$ (GPIa-IIa) et GPVI, interagissent directement avec le collagène. En effet, une déficience dans la sous-unité GPIa entraîne un saignement bénin et une incapacité aux plaquettes de changer de forme et d'agréger lorsque stimulées par le collagène de type I et III (Nieuwenhuis et al, 1985), et une diminution de leur adhérence (Nieuwenhuis et al, 1986).

D'autres résultats indiquent que l'adhésion des plaquettes au collagène est médiée par les deux récepteurs, le GPIa-IIa et le GPVI, et ces deux récepteurs contribuent à générer des signaux intracellulaires médiant l'activation des plaquettes (Watson et al, 2000). Un autre récepteur, la GPIb-IX-V reconnaît le facteur von Willebrand (vWF) (Weiss et al, 1978). Aussi, l'intégrine plaquettaire majeure, la GPIIb-IIIa, lie le vWF et/ou le fibrinogène afin de médier l'agrégation plaquettaire (Kroll et al, 1996, Xiong et al, 2003). Une fois les plaquettes activées, il y a formation d'agrégat ou de thrombus. En parallèle, la cascade de coagulation est activée, menant à la stabilisation du caillot. Les plaquettes activées expriment aussi le récepteur P-sélectine, un contre récepteur de PSGL-1 sur les leucocytes et de GPIb-IX-V sur les plaquettes (Sako et al, 1993, Andrews et al, 2003). Cependant, l'interaction de la P-sélectine avec le GPIb-IX-V sur les plaquettes reste à confirmer.

Tel que mentionné plus-haut, en plus de maintenir l'hémostase par la formation d'un thrombus, les plaquettes contribuent aussi à la formation des maladies thrombotiques telles que les maladies coronaires et les accidents cérébrovasculaires. La rupture d'une plaque athérosclérotique exposant la matrice subendothéliale mène à la formation d'un thrombus médié par des interactions GPIb-IX-V/vWF et/ou GPVI/collagène. Ces interactions sont dépendantes des forces de cisaillements sanguines. Alternativement, un flux sanguin irrégulier dans une artère bloquée peut induire la liaison du GPIb plaquettaire au vWF. Cette liaison mène à l'activation du GPIIb-IIIa, sa liaison au fibrinogène et à l'agrégation plaquettaire. Le thrombus résultant peut bloquer l'apport d'oxygène au coeur ou au cerveau causant ainsi les pathologies cardiaques et/ou cervicales (Kroll et al, 1996, Gawaz et al, 2004, Bhatt et al, 2003).

GPIb α peut induire l'interaction plaquette-cellule endothéliale en se liant à la P-sélectine endothéliale, ou au vWF lié à la P-sélectine (Romo et al, 1999). GPIb α peut aussi médier l'interaction plaquette-leucocyte en se liant à l'intégrine leucocytaire CD11b/CD18 (Simon et al, 2000). Les récepteurs leucocytaires PSGL-1 et CD11b/CD18 sont impliqués dans les interactions leucocyte-cellule endothéliale en liant la P-sélectine et ICAM-1 respectivement (Andrews et al, 2003, Smith et al, 1989). Ces mêmes récepteurs leucocytaires peuvent lier la P-sélectine et GPIb α respectivement sur les plaquettes activées (Simon et al, 2000, Andrews et al, 2003) (En résumé voir figure 2).

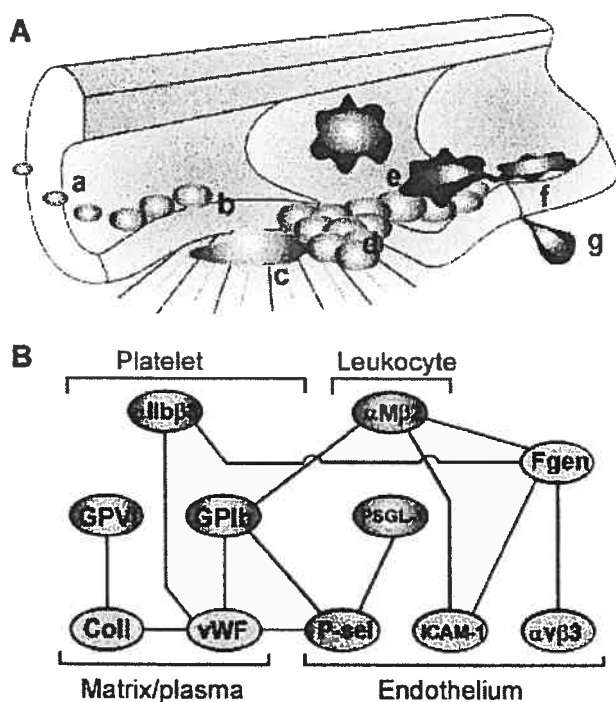


Figure 2: Interactions des plaquettes, leucocytes et de l'endothélium. **A,** Interactions des cellules vasculaires avec les plaquettes (bleues) et les leucocytes (mauves). **B,** Récepteurs des cellules vasculaires, de l'endothélium, des plaquettes, de la matrice sub-endothéliale/plasmatique et des leucocytes impliqués dans l'athéromatose. $\alpha\text{IIb}\beta_3$ est le GPIIb-IIIa et $\alpha\text{M}\beta_2$ est le CD11b/CD18 (Tiré de Andrews et al, 2004).

3.2 L'activation des plaquettes

Les interactions initiales des plaquettes avec le collagène et le vWF de la matrice sous-endothéliale et avec les agonistes relâchés ou générés au lieu du dommage vasculaire déclenchent des voies de signalisations intracellulaires afin de potentialiser les propriétés adhésives et coagulantes des plaquettes. En bref, l'activation des signaux intracellulaires des plaquettes peut être médiée entre autre par : les récepteurs couplés aux protéines G activés par une protéase (PARs) et par GPIb-IX-V qui sont des récepteurs de l' α -thrombine, les récepteurs puriginiques P2Y_1 et P2Y_{12} activés par l'ADP, le récepteur au thromboxane A_2 activé par ce dernier et le récepteur α_{2A} activé par l'épinéphrine (Ruggeri et al, 2002, Mazzucato et al, 1998). Une fois liés, ces récepteurs activent des signaux intracellulaires tels que les petites protéines G (G_q , G_i , G_{12} , Rho), et la

phosphatidylinositol-4,5-diphosphate qui va mener à la production de l'inositol-3-phosphate, impliqué dans la mobilisation du calcium intracellulaire, et du diacylglycérol qui active la protéine kinase C. La protéine kinase C joue aussi un rôle important dans la régulation de l'expression de la P-sélectine lorsque les plaquettes sont stimulées par la thrombine (Libersan et al, 2003). De plus, le calcium peut réguler l'activation de la phospholipase A₂ dépendante de la p38 MAPK. La phospholipase A₂ peut ensuite hydrolyser les phospholipides membranaires, menant à la production de l'acide arachidonique et à la synthèse de thromboxane A₂.

Les manifestations phénotypiques typiques des plaquettes activées incluent la polymérisation de l'actine, la sécrétion du contenu des granules et l'agrégation. La sécrétion du contenu des granules comprend; (1) la relâche dans le cytoplasme des ions calciques, (2) la relâche dans le milieu extracellulaire des vWFs, des facteurs de croissance et des nucléotides et (3) la relocalisation des protéines membranaires à la surface telle que la P-sélectine et aussi la transformation du GPIIb-IIIa d'une forme inactive à une forme active capable de lier le fibrinogène et d'induire l'agrégation des plaquettes (pour représentation schématique voir figure 3).

sur des récepteurs couplés aux protéines G, le P2Y₁ et le P2Y₁₂. Cette liaison renforce ainsi l'agrégation plaquettaire dépendante du GPIIb-IIIa (Nurden et al, 2003, Dorsam et al, 2004). L'activation de l'agrégat plaquettaire ou thrombus accélère la cascade de coagulation, ce qui mène à la stabilisation du caillot par des contractions dépendantes de la fibrine et du GPIIb-IIIa.

En plus de leur rôle de former des thrombus afin de maintenir l'hémostase, les plaquettes participent au développement des maladies cardiaques. Essentiellement la même séquence d'évènements se produit lors de maladies thrombotiques telle que l'infarctus ou l'anévrisme. La rupture d'une plaque athérosclérotique expose la matrice sub-endothéliale et mène à la formation d'un thrombus médié par des interactions GPIb-IX-V/vWF et/ou GPIV/collagène. Alternativement, des forces de cisaillements sanguines pathologiques dans une artère bloquée peut induire la liaison du GPIb-IX-V sur les plaquettes au vWF plasmatique initiant ainsi l'agrégation plaquettaire dépendante du GPIIb-IIIa (Kroll et al, 1996, Gawaz et al, 2004, Bhatt et al, 2003, Woodside et al, 2001). Une étude récente a démontré que le ligand CD40 (CD40L) exprimé à la surface des plaquettes activées était impliqué dans la stabilisation du thrombus en se liant au récepteur GPIIb-IIIa (Andre et al, 2002). Le CD40L est aussi impliqué dans la pathogenèse de l'athérosclérose et peut représenter un lien entre les plaquettes et le développement des plaques athérosclérotiques (Garlichs et al, 2001).

3.4 Les plaquettes et la thrombose artérielle

L'efficacité des inhibiteurs du GPIIb-IIIa qui préviennent les complications de revascularisation percutanée et, possiblement, dans le traitement des angines instables et

de l'infarctus du myocarde renforce les observations de l'implication des plaquettes dans ces maladies (Vivekananthan et al, 2002, Talley et al, 2001). Cependant, certains problèmes demeurent puisque des agents anti-GPIIb-IIIa donnés oralement donnaient des résultats négatifs, causant même une hausse des évènements adverses lors d'essais cliniques (Quinn et al, 2002).

D'autres études ont démontré que le CD40L était exprimé sur les plaquettes activées en réponse à la stimulation par des agonistes tels que l'ADP, le collagène et la thrombine (Nannizzi-Alaimo et al, 2003, Henn et al, 1998). Le Clopidogrel empêche la liaison de l'ADP à son récepteur sur les plaquettes, inhibant ainsi l'activation des plaquettes. Dernièrement, une étude a démontré que le Clopidogrel bloquait complètement l'expression de CD40L par les plaquettes lorsque celles-ci étaient stimulées avec l'ADP (Hermann et al, 2001). Bien que ces résultats semblent stimulant, l'effet de Clopidogrel sur l'expression de CD40L dans le contexte des maladies coronaires aiguës n'a pas encore été étudié.

L'agrégation plaquettaire est un processus important dans le développement des maladies coronaires aiguës. Cette agrégation homotypique est médiée entre autres par les récepteurs GPIIbIIIa exprimés à la surface des plaquettes activées. Les plaquettes activées relâche une grande quantité de sCD40L, et cette protéine proinflammatoire semble jouer deux rôles importants; (1) dans l'agrégation des plaquettes en se liant au récepteur GPIIbIIIa et (2) en stabilisant l'agrégat plaquettaire (Andre et al, 2002).

En plus de l'adhésion et de l'agrégation des plaquettes, l'interaction des plaquettes avec les neutrophiles semblent aussi jouer un rôle important dans les lésions myocardiques (Gabay et al, 1999, Buffon et al, 2002). En effet, les interactions plaquettes-neutrophiles ont été détectées chez des patients avec une angine instable

(Entman et al, 1996, Ott et al, 1996, Neumann et al, 1997) et chez des patients ayant subis une angioplastie coronaire (Mickelson et al, 1996). Ces interactions lient l'inflammation et la thrombose et peuvent aggraver l'occlusion thrombotique et l'ischémie (Entman et al, 1996, Libby et al, 2001). Cependant, il est encore inconnu si certains des prédictors des maladies cardiovasculaires tels que l'IL-8 et la CRP peuvent moduler ces interactions.

4. Les cellules endothéliales

L'endothélium est une couche de cellules endothéliales qui forme une barrière entre la matrice sub-endothéliale et la lumière du vaisseau sanguin. Ces cellules sont attachées entre elles par différents types de structures adhésives ou par des jonctions cellule-cellule. Présentement, on reconnaît trois types de jonctions chez les cellules endothéliales (Dejana et al, 1995, Schnittler et al, 1998) : jonction serrée, jonction adhésive et jonction communicante " gap junction ".

Les jonctions serrées viennent sceller la couche de cellules endothéliales et sont formées des membranes plasmiques avoisinantes partiellement fusionnées (Bazzoni et al, 1999, Vestweber et al, 2000). *Les jonctions adhérentes* sont formées par des cadhérines; les VE-cadhérines sont présentes à la surface des cellules endothéliales. Les cadhérines sont des molécules d'adhésions dont la partie intracellulaire ancre des protéines cytoplasmiques telles que les caténines (Dejana et al, 1996). *Les jonctions communicantes* sont des agrégats de canaux intercellulaires (Revel et al, 1967), composées de connexines (Willecke et al, 2002, Kumar et al, 1996) qui permettent le passage de second messagers, d'ions et de métabolites (Gilula et al, 1972).

Les structures adhésives sont impliquées dans le contrôle de la perméabilité vasculaire. Le changement de la perméabilité vasculaire est associé avec une

redistribution des cadhérines à la surface, la stabilité des liens adhésifs focaux et l'activation progressive des matrices métalloprotéinases (Alexander et al, 2002). La perte de la fonctionnalité de cette barrière mène à des situations pathophysiologiques. Des stimuli tels que l'histamine et la thrombine induisent une augmentation rapide et de courte durée de la perméabilité vasculaire, alors que des cytokines, par exemple l'IL-8, et le VEGF induisent une réponse soutenue. La plupart de ces agonistes sont produit dans des situations inflammatoires chroniques ou aiguës telles que les maladies coronaires artérielles.

4.1 Adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales

Roulement et "tethering"

La double fonction des neutrophiles dans la surveillance immune et dans l'élimination *in situ* de micro-organismes ou de débris cellulaires requiert une transition rapide d'un état circulant non-adhérent des neutrophiles à un état adhérent, leur permettant de migrer dans les tissus là où nécessaire. L'évènement initial est l'apparition, sur l'endothélium adjacent au site enflammé, de nouvelles molécules d'adhésions, induite par des médiateurs de l'inflammation telle que l'IL-8, la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et la E-sélectine, ainsi que la forme monomérique de la protéine C-réactive (mCRP). L'expression de ces nouvelles molécules relâchées ou formées par les tissus endommagés mène au roulement local des neutrophiles. Suite au premier contact des neutrophiles au site endommagé, l'attachement des neutrophiles est rapide. Cette première interaction est principalement médiée par les L-sélectines exprimées sur les neutrophiles et les résidus sialomucines sulfatées exprimées sur les cellules endothéliales. Ensuite, le roulement des neutrophiles sur les cellules endothéliales

est principalement médié par les PSGL-1 et les P-sélectines exprimées sur les neutrophiles et les cellules endothéliales respectivement (en résumé voir figure 4).

“État d’amorçage” (priming) des neutrophiles durant le roulement

L’endothélium des micro-vaisseaux enflammés produit des facteurs chemotactiques telle que l’IL-8, la leucotriène B₄, et plusieurs chemokines, immobilisés par des molécules de présentations (protéoglycans) sur la surface luminale des cellules endothéliales (Rollins et al, 1997). Les neutrophiles possèdent plusieurs récepteurs pour ces facteurs, appartenant à la superfamille des récepteurs couplés à la protéine-G. L’implication de ces récepteurs déclenche une variété de cascade de transduction du signal menant à l’activation de MAC-1 et à une ferme adhésion des leucocytes et à l’activation d’un mouvement directionnel spécifique (Premack et Schall, 1996).

Adhésion ferme et l’étalement

L’adhésion ferme aux cellules endothéliales implique en grande partie l’interaction des intégrines des neutrophiles de la sous-famille β_2 (CD11a, CD11b, CD11c/CD18) avec l’ICAM-1 et l’ICAM-2 (Anderson et al, 1984, Sleigh et al, 1993). Les β_2 -intégrines sont incapables d’interagir avec leur ligand physiologique chez les neutrophiles non-stimulés, un mécanisme de sécurité qui contrôle les réponses inflammatoires aiguës et chroniques. La capacité de liaison au ligand est acquise lors d’un signal d’activation (“inside-out signaling”) menant au regroupement (“clustering”) des intégrines et à un changement d’état de basse à haute affinité des β_2 -intégrines (Rieu et Arnaud, 1996, Stewart et Hogg, 1996, Tedder et al 2005). Plusieurs agonistes

provoquent l'activation des CD11b/CD18 chez les neutrophiles, incluant l'IL-8, l'ET-1, les facteurs de croissance (TNF- α , GMCSF), les produits bactériens (les peptides formylés, le LPS), l'état d'amorçage et le roulement des neutrophiles sur l'endothélium.

4.2 L'extravasation et la diapédèse des leucocytes vers les stimuli inflammatoires

La migration trans-endothéliale

La transmigration se manifeste surtout aux extrémités des cellules endothéliales, là où l'on peut observer des discontinuités dans les jonctions. La P-sélectine est concentrée à ces endroits et peut être ainsi responsable du ciblage de l'adhésion des neutrophiles (Burns et al, 1999). Les neutrophiles vont migrer à travers l'endothélium et vers le dommage tissulaire en s'orientant grâce au gradient de chemoattractants relâchés par les médiateurs pro-inflammatoires. À ce stade, le PECAM exprimée sur les neutrophiles et sur les cellules endothéliales est la molécule d'adhésion principalement impliquée dans la transmigration endothéliale (voir Figure 4).

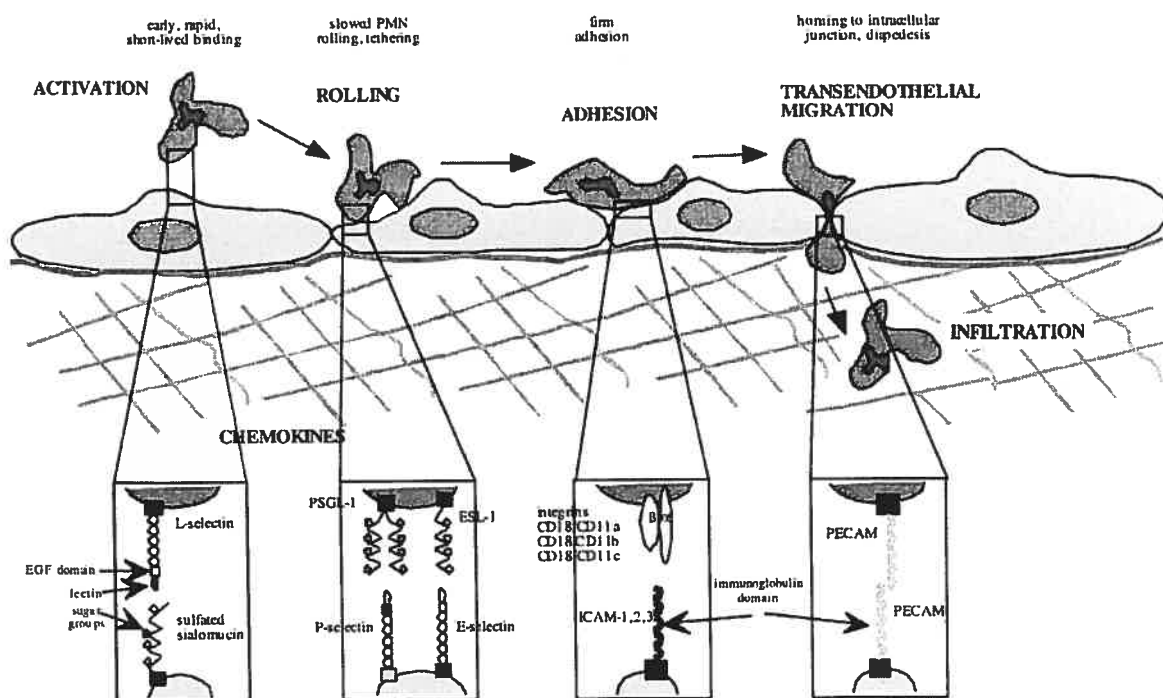


Figure 4 : Représentation schématique de la migration des neutrophiles vers le site inflammatoire. Tirée de Michiels et al, 2003.

La signalisation par les chemoattractants

Les neutrophiles possèdent plusieurs récepteurs aux différents chemoattractants qui sont responsables du déclenchement de l'adhésion, la migration cellulaire dirigée, et la dégranulation. Par exemple, la liaison de chemoattractants à leurs récepteurs respectifs activent des tyrosines kinases (Berton et al, 1999a; Ptasznik et al, 1996; Welch et Maridonneau-Parini, 1997) et la protéine liant le GTP Ras (Worthen et al, 1994). L'activation de Ras déclenche la cascade de la MAPK/ERK (Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-regulated kinase) (Leevers et al, 1992, Robbins et al, 1992), apparemment impliquée dans une variété de fonctions des leucocytes

polymorphonucleaires induites par les chemoattractants (Krumps et al, 1997, Nick et al, 1997, Pillinger et al, 1996).

4.3 Réponse à une lésion endothéliale

Un endothélium sain soutient un milieu anti-thrombotique en sécrétant une variété de facteurs qui exercent des effets anti-adhésifs et anti-agrégatoires sur les plaquettes, tel que l'oxyde nitrique (NO) et la prostacycline (PGI₂) (Cines et al, 1998), des facteurs ayant des effets anti-coagulants, tel que l'héparine et la protéine C/S (Stern et al, 1991, Esmon et al, 2000), ou bien des facteurs ayant des effets fibrinolytiques, tel que l'activateur plasminogène tissulaire (tPA) (Kato et al, 2002, Bonetti et al, 2003). Par contre, un dysfonctionnement de l'endothélium est caractérisé par une diminution de NO, de PGI₂ et de tPA, contribuant ainsi à la vasoconstriction médiée par l'endothéline, la sérotonine, la TxA₂ et la thrombine. Une diminution du potentiel anti-thrombotique de l'endothélium et une augmentation de la production de médiateurs pro-thrombotiques résultent en un environnement vasculaire thrombogénique qui va prédisposer l'endothélium à l'adhérence des leucocytes et des plaquettes. De plus, il y aura génération de stress oxydatif, d'inflammation vasculaire et éventuellement formation de thrombus. Ce thrombus sera induit principalement par l'exposition de substances hautement thrombogéniques relâchées des plaques athérosclérotiques en ruptures ou érosives (Bonetti et al, 2003, Verma et al, 2002).

Un lien entre la thrombose et l'inflammation peut être expliqué au niveau moléculaire et cellulaire de l'endothélium. Les premières molécules responsables pour l'adhésion des plaquettes et des leucocytes, le vWF et la P-sélectine respectivement, sont emmagasinées à l'intérieur de granules que l'on nomme Weibel-Palade (Weibel et al,

1964, Wagner et al, 1982, Wagner et al, 1991). Une fois les cellules endothéliales activées, les granules Weibel-Palade fusionnent à la membrane et exposent la P-sélectine et le vWF à la surface cellulaire (Wagner et al, 1993). De plus, les cellules endothéliales activées vont exprimer à leur surface diverses molécules d'adhésions telles que l'ICAM-1 et la E-sélectine. Ces processus participent à l'amplification de la réponse inflammatoire et promouvoient l'activation de l'endothélium et subséquemment de l'agrégation des plaquettes et des leucocytes. Éluclider les mécanismes d'actions des neutrophiles, des plaquettes et des cellules endothéliales révèlent d'une importance cruciale afin de cibler des stratégies anti-inflammatoires pour contrer les maladies cardiovasculaires.

La dysfonction de l'endothélium peut survenir bien avant les manifestations de l'athérosclérose et peut alors servir en tant que prédicteur indépendant des évènements cardiovasculaires futurs (Behrendt et al, 2002). Une façon de surveiller ou de contrôler le développement de ces maladies vasculaires est d'étudier les effets de certains marqueurs inflammatoires sur l'activation des cellules impliquées dans l'athéromatose. Durant les dernières années, nombreuses études ont identifié plusieurs marqueurs potentiels tels que l'interleukine-18 qui est hautement exprimée dans les plaques athérosclérotiques (Mallat et al, 2001), les métalloprotéinases matricielles (MMP) dont une activité excessive résulte au dysfonctionnement cardiaque, à la resténose et à l'athérosclérose (Galis et al, 1994), le ligand CD40 (CD40L) impliqué dans les pathophysiologies des maladies inflammatoires sévères incluant l'athéromatose (Schonbeck et al, 2001), les récepteurs activés par protéases (PARs) qui augmentent le recrutement des leucocytes, un évènement clé dans l'athérogénèse (Nakanishi-Matsui et al, 2000) et l'interleukine-6 (Chi et al, 2001) qui promouvoit la synthèse et l'expression de la CRP un des marqueurs les plus étudiés à ce jour (voir section de la CRP) (Ridker et al, 1997, Libby et al, 2002). De

plus, des niveaux plasmatiques élevés de l'IL-8 (voir section de l'IL-8) et des nitrotyrosines (voir section du peroxy-nitrite) ont été identifiés chez des patients ayant subi des événements coronaires aigus (Aukrust et al, 2001, Romuk et al, 2002, Shishehbor et al, 2003). De plus, les niveaux de myeloperoxydase relâchées par les neutrophiles corrélaient avec ceux de CRP chez les patients souffrant d'angine instable reflétant ainsi l'inflammation coronaire (Buffon et al, 2002). Ainsi, puisque l'inflammation est à la base des maladies coronaires artérielles, il est important de trouver, comprendre le/les mécanisme(s) moléculaire(s) et cibler les différents marqueurs qui jouent un rôle primordial dans la progression de ces maladies.

5. La protéine C-réactive (CRP)

La protéine C réactive (CRP) est considérée comme une protéine plasmatique associée à la phase aiguë puisque sa concentration plasmatique peut s'élever rapidement suite à une inflammation ou à un dommage tissulaire. Bien que la concentration peut grandement varier d'un individu à l'autre, la valeur médiane chez les adultes sains se situe entre 0.1 et 3 µg/mL (Pepys et al, 1981, Gabay et Kushner, 1999). Durant une phase aiguë, lorsqu'une réponse systémique se manifeste suite à un dommage tissulaire ou à une infection, la concentration plasmatique de CRP peut augmenter jusqu'à 1000 fois. La CRP est membre d'une famille hautement conservée des protéines des *pentaxines* qui circulent dans le sang et possèdent une structure non habituelle de cinq sous-unités de 206 acides aminés liées de façon non-covalentes formant ainsi un disque planaire (Figure 5) (Pepys et al, 1983). Le gène de CRP (une seule copie) possède un seul long intron et est situé dans la partie longue du bras du chromosome 1, dans la région q23-q24.

L'expression génique de CRP, essentiellement stimulée par la cytokine IL-6 et aussi par le TNF- α et l'IL-1 β (et les glucocorticoides), se fait essentiellement au niveau des hépatocytes. Plusieurs études récentes ont cependant démontré que la CRP peut être synthétisée par des tissus non-hépatiques. En effet, la CRP peut être exprimée par les cellules épithéliales du tractus respiratoire et par les cellules épithéliales rénaux (Gould et al, 2001, Jabs et al, 2003). Les cellules neuronales semblent aussi exprimer cette protéine et d'autres protéines de phases aiguës étant impliquées dans les maladies dégénératives telles que l'Alzheimer (Yasojima et al, 2000). Récemment, le laboratoire du Yeh a aussi identifié les cellules musculaires lisses et les adipocytes comme étant un lieu de synthèse de la CRP (Calabro et al, 2003, Calabro et al, 2005). Aussi, un autre laboratoire a démontré que les cellules endothéliales humaines aortiques synthétisent la CRP (Devaraj et al, 2004).



Figure 5: Structure pentamérique de la protéine C-réactive humaine. Voir texte pour plus de détail.

5.1 Les récepteurs de CRP

Durant les dernières années, des études provenant du laboratoire de DuClos ont fournies des évidences que le récepteur majeur de CRP sur les monocytes et neutrophiles humains est le récepteur Fc γ RIIa (Bharadwaj et al, 1999, Stein et al, 2000a, Stein et al, 2000b). De plus, les leucocytes ayant le récepteur de haute affinité Fc γ RI et liant la CRP ont été détectés chez la souris (Stein et al, 2000a) et chez les humains (Stein et al, 2000b). Toujours chez la souris, d'autres études ont démontré que la phagocytose des zymogènes opsonisés par la CRP est ingérée via le récepteur Fc γ RI (Bharadwaj et al, 2001). Des analyses additionnelles utilisant des souris avec une variété de délétions génétiques dans le récepteur Fc γ ont démontré que la CRP humaine peut aussi se lier sur les récepteurs Fc γ RIIb1, Fc γ RIIb2 et Fc γ RI (Stein et al, 2000a). Cependant, ces résultats ont été récemment débattus (Saeland et al, 2001).

5.2 L'implication de la protéine C-réactive dans l'inflammation

La CRP est traditionnellement décrite comme une molécule effectrice de défense antimicrobienne dû à son habilité d'activer le complément et de promouvoir la phagocytose (Steel et al, 1994, Koj et al, 1996, Mortensen et al, 2000). Le rôle de CRP est plus complexe qu'on le croyait puisqu'elle est aussi capable de réguler certains mécanismes anti-inflammatoires. Voici un tableau illustrant les principales actions opposées de la CRP.

Tableau I : Actions pro et anti-inflammatoires de la protéine C-réactive

Actions pro-inflammatoires	Modèle	Références	Actions anti-inflammatoires	Modèle	Références
Fonctionne comme une opsonine pour microorganismes	<i>In vitro</i>	Mold et al, 1981, Kilpatrick et al, 1985	Inhibe la chemotaxie des neutrophiles	<i>In vitro</i>	Kew et al, 1990
Active le système du complément	<i>In vitro</i>	Siegel et al, 1974	Atténue l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales	<i>In vitro</i>	Zouki et al, 1997
Induit la relâche de cytokines pro-inflammatoires par monocytes	<i>In vitro</i>	Ballou et al, 1992	Inhibe la migration des neutrophiles dans les tissus	Rats	Heurtz et al, 1993, Xia & Samols, 1997
Augmente l'expression de ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1 sur cellules endothéliales	<i>In vitro</i>	Pasceri et al, 2000	Inhibe la production de superoxide	<i>In vitro</i>	Filep et Foldes-Filep, 1989
Augmente la relâche de MCP-1	<i>In vitro</i>	Pasceri et al, 2001	Protège les cellules de l'assemblage du complexe d'attaque terminal membranaire	<i>In vitro</i>	Gershov et al, 2000
Diminue la production d'oxyde nitrique	<i>In vitro</i>	Venugopal et al, 2002, Verma et al, 2002	Promouvoit la clairance des cellules apoptotiques non-inflammatoires	<i>In vitro</i>	Gershov et al, 2000
Diminue l'activité du tPA	<i>In vitro</i>	Singh et al, 2005	Augmente les facteurs d'inhibitions du complément sur les cellules endothéliales	<i>In vitro</i>	Li et al, 2004

Malgré des études exhaustives durant les dernières années, le rôle exacte et le mécanisme d'action de CRP comme un modulateur de l'inflammation n'est pas très bien élucidé, puisque comme le démontre le tableau I, des actions pro et anti-inflammatoires ont été décrites pour cette protéine de phase aiguë. Plusieurs des études mentionnées plus haut ont utilisé une forme recombinante de CRP obtenue commercialement. Ainsi, certains des effets biologiques de CRP observés étaient en fait dû aux contaminants tels que le lipopolysaccharide et/ou l'azide de sodium (van den Berg et al, 2004, Taylor et al, 2005, Pepys et al, 2005, Nerurkar et al, 2005). D'autres part, ces résultats apparemment contradictoires peuvent en partie résulter de la formation d'espèces distinctes de CRP durant l'inflammation. En général, chez les neutrophiles, les effets de la forme native de CRP (pentamérique) sont largement inhibitoires. Des formes conformationnellement altérées de CRP, appelées CRP modifiée ou monomérique (mCRP), expriment plusieurs neo-épitopes qui ne se retrouvent pas sur la forme native de CRP (Ying et al, 1989), et possèdent des propriétés distinctes de la forme pentamérique de CRP (Potempa et al, 1987). La CRP peut être dissociée en plusieurs sous-unités *in vitro* (Potempa et al, 1987, Wang et Sui, 2001). Des néo-antigènes de mCRP (en particulier, l'épitope composant les acides aminés 198-206) ont été détectés dans les tissus enflammés des lapins (Rees et al, 1988) et sur la paroi des vaisseaux sanguins normaux humains (Diehl et al, 2000). La mCRP augmente l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales via l'induction de la surexpression des CD11b/CD18 à la surface des neutrophiles (Zouki et al, 2001), un phénomène essentiel afin de permettre l'adhésion ferme des neutrophiles à l'endothélium et subséquemment leur transmigration. De plus, l'exposition de CRP à des membranes liant des protéases à sérines mène au clivage de CRP et donne des peptides qui miment les actions de CRP au niveau de la chemotaxie des neutrophiles (Shephard et al, 1990) et

de l'adhésion aux cellules endothéliales (Zouki et al, 1997). Ainsi, l'existence des plusieurs isoformes de CRP, comme la CRP native et la mCRP, peut en partie expliquer les différentes actions contradictoires observées de CRP durant l'inflammation.

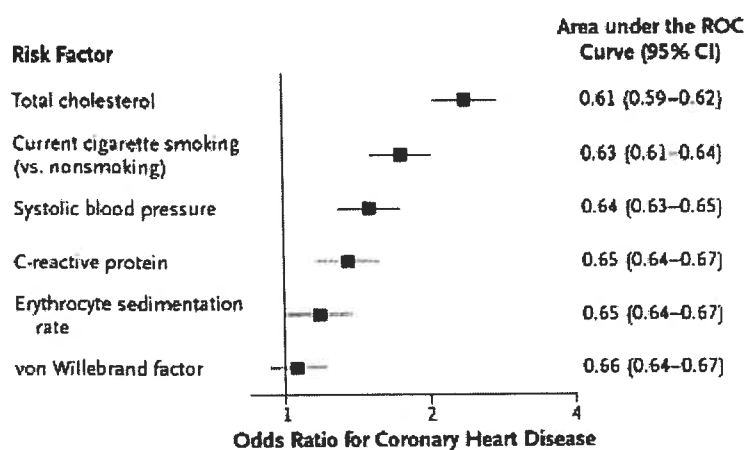
5.3 La CRP comme un marqueur des maladies cardiovasculaires

La phase aïgue de la réponse innée se manifeste en dedans de deux jours de l'initiation et implique un grand nombre de changements systémiques (Gabay et Kushner, 1999). Un des changements les plus dramatiques est la réorchestration de synthèse et de sécrétion protéique par les hépatocytes du foie en réponse aux cytokines pro-inflammatoires (Steel et Whitehead, 1994, Koj et al, 1996). Durant les dernières années, des ~20 protéines de phases aigues humaines connues, la CRP a été parmi la plus étudiée.

De nombreuses études épidémiologiques et cliniques ont montré que les augmentations très modestes dans les niveaux de CRP sont des indicateurs de pronostic excellentes et indépendantes pour les maladies cardiovasculaires (Liuzzio et al, 1994, Ridker et al, 1997, Haverkate et al, 1997, Ridker et al, 2000, Morrow et al, 2000, Libby et al, 2002). En effet, d'après la littérature, une légère augmentation du niveau de CRP dans le sang ($> 2.4 \mu\text{g/mL}$) prédit une augmentation du risque pour les infarctus du myocarde. La CRP est un marqueur de risque utile utilisé cliniquement pour le développement des maladies coronaires artérielles ainsi qu'un prédicteur des morbidités et mortalités cardiovasculaires puisque l'inflammation est aussi un facteur contribuant à l'athérogénèse et à la rupture de plaques (Ueda et al, 1996). Dernièrement, une étude a critiqué les observations épidémiologiques concernant la relation d'un niveau plasmatique élevé de CRP et la manifestation des CAD chez les patients malades (Danesh et al, 2004). Les tableaux II et III résument les résultats de cette étude. Ces études démontrent, pour les

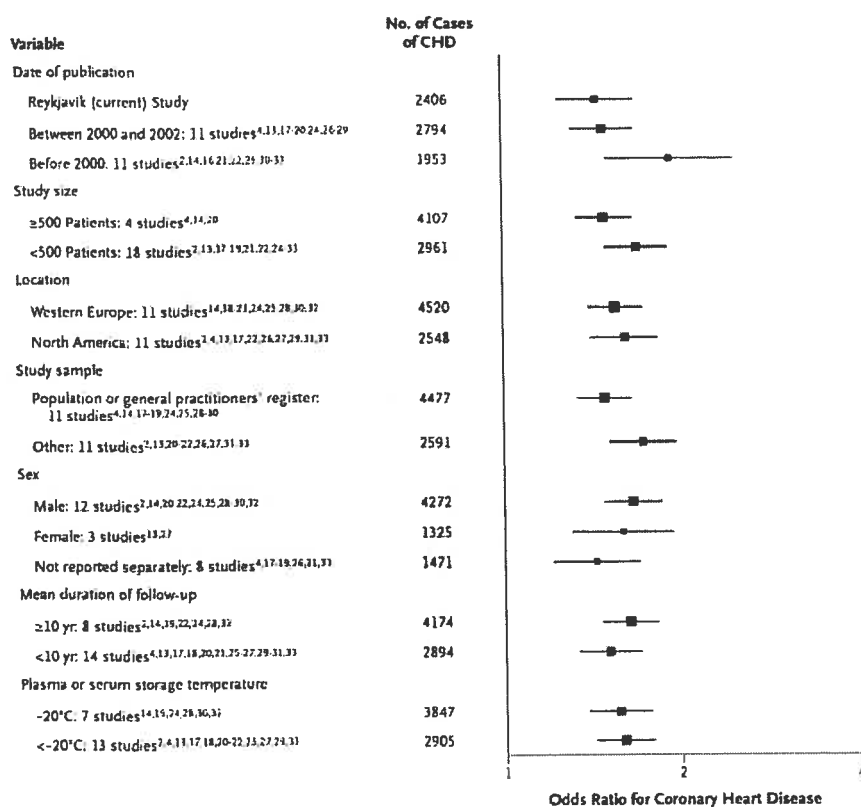
maladies cardiovasculaires, que la CRP est un facteur de risque plus faible que le facteur de risque de la pression sanguine systolique, et plus fort que le taux de sédimentation des érythrocytes. Dans le tableau III, les résultats des études cliniques démontrent que les études antérieures avaient peut-être sur-estimé la valeur prédictive de CRP pour les maladies cardiovasculaires. Néanmoins, une limitation majeure de ces études épidémiologiques est qu'ils ne distinguent pas entre la cause et l'effet.

Tableau II: Facteurs de risques “Odds ratio (OR)” pour le développement futur de CAD



Tiré de Danesh et al,
NEJM 350 :1387 2004

Tableau III: Association des concentrations plasmatiques de CRP avec les maladies cardiovasculaires dans 22 études cliniques



Tiré de Danesh et al,
NEJM 350 :1387 2004

Dans le contexte des maladies cardiovasculaires, le développement de souris transgéniques susceptibles de former des plaques athérosclérotiques à susciter beaucoup d'intérêt récemment. Malgré les efforts soutenus de différents laboratoires indépendants, la controverse entourant le rôle de CRP dans les maladies coronaires demeure puisque les résultats obtenus de ces études ont démontré des données contradictoires. Voici un tableau résumant ces résultats.

Tableau IV: Effet de la protéine C-réactive sur l'athérosclérose chez les souris transgéniques

Pro-athérosclérotique	Références	Aucun effet	Références
Accélère la formation des lésions athérosclérotiques chez les souris Apo E ^{-/-}	Paul et al, 2004	N'est ni athérogénique ni athéroprotecteur	Hirshfield et al, 2005
Augmente la thrombose suite à une blessure artérielle	Danenberg et al, 2003	Pas d'effet apparent sur les lésions athérosclérotiques chez les souris Apo E ^{-/-}	Reifenberg et al, 2005
Augmente les plaques athérosclérotiques chez les souris Apo E ^{-/-}	Schwedler et al, 2005	Ne contribue pas au développement de l'athérosclérose	Trion et al, 2005

Par le fait même, différentes formes structurelles de la CRP pourrait aussi expliquer en partie les résultats discordants dans le contexte des maladies coronaires.

De nouvelles découvertes suggèrent que la CRP possède un rôle anti-inflammatoire (Mortensen et Zhong, 2000). De plus, des études découlant de notre laboratoire ont démontré que la CRP peut inhiber la production de superoxide et la dégranulation des neutrophiles suggérant ainsi un rôle important protecteur pour la CRP durant la phase aigues des réactions inflammatoires (Filep et Foldes-Filep; 1989). Toujours d'après des observations issues de notre laboratoire, il a été démontré que CRP induisait une diminution d'expression de la molécule d'adhésion L-sélectine sans induction d'activation cellulaire (Zouki et al, 1997). Par contre, la mCRP induisait le largage de la L-sélectine, une augmentation d'expression de CD11b/CD18 à la surface des leucocytes PMN (Zouki et al, 2001) et un retardement du déclenchement de l'apoptose chez les neutrophiles (Khreiss et al, 2002) suggérant ainsi un rôle pour la mCRP dans la circulation leucocytaire à travers les cellules endothéliales. Finalement,

chez les souris transgéniques, la CRP possède un rôle protecteur contre le dommage tissulaire induit par les neutrophiles (Heuertz et al, 1993, Lin et al, 1995) dans le choc septique (Xia et al, 1997) et l'encéphalomyélite (Szalai et al, 2002). Cependant, la signalisation intracellulaire par lequel la CRP induit ces différentes actions n'est pas bien connue.

6. L'interleukine-8

L'interleukine-8 (IL-8) a été purifiée et clonée pour la première fois comme étant un facteur chemotactique des neutrophiles (Matsushima et al, 1988, Yoshimura et al, 1987). Puisque cette cytokine démontre une activité chemotactique, elle est à présent nommée chemokine (cytokine chemotactique) dans la littérature (Baggiolini et al, 1997, Luster et al, 1998). Les chemokines sont des protéines de faible poids moléculaire contenant des résidus cystéines à des positions précises, ayant une charge nette basique et une affinité pour l'héparine. Les chemokines sont divisées en quatre groupes; les CXC, CC, CX₃C contenant chacun de quatre à six résidus cystéines et les chemokines C contenant seulement deux cystéines.

6.1 La structure et la biosynthèse de l'interleukine-8

Le gène codant pour la protéine de l'IL-8 est situé sur le chromosome 4q12-q21. Le précurseur de la protéine de l'IL-8 comprend 99 acides aminés et possède une séquence signal qui est clivée pour donner une protéine mature de 77 ou 72 acides aminés (Matsushima et al, 1988). L'IL-8 peut être encore clivée en NH₂-terminal afin de

donner des analogues tronqués; leurs longueurs varient entre 77, 72, 71, 70 et 69 acides aminés. *In vivo*, la forme majoritairement sécrétée par les leucocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales est la forme comprenant 72 acides aminés. Voir figure 6.

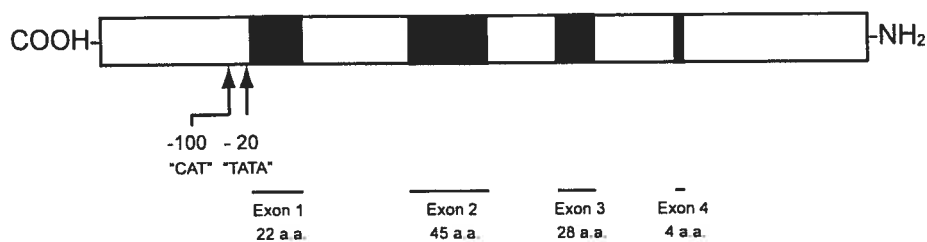


Figure 6: Structure du gène humain de l'interleukine-8. Les boîtes noires correspondent aux exons du gène totalisant 99 acides aminés. (Tiré de Mukaida et al, 1992).

L'IL-8 est produite par les leucocytes (monocytes, cellules T, neutrophiles et cellules tueuses naturelles) et par les cellules somatiques (cellules endothéliales, fibroblastes et cellules épithéliales) (Baggiolini et al, 1997, Mukaida et al, 2000, Mukaida et al, 1992, Oppenheim et al, 1991). La synthèse d'IL-8 n'est pas constitutive mais inductible par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1 et le TNF- α (Matsushima et al, 1988). De plus, la production d'IL-8 peut être influencée par les bactéries (*Helicobacter pylori*) (Aihara et al, 1997), des produits bactériens, comme le lipopolysaccharide (Baggiolini et al, 1997) et l'ADN bactérien (Luster et al, 2004, Jozsef et al, 2006) et des virus (adénovirus) (Alcorn et al, 2001). Chez plusieurs types de cellules

tumorales, des conditions hypoxiques peuvent aussi induire la synthèse d'IL-8 via l'activation des facteurs de transcriptions NF-kB et AP-1 (Kunz et al, 1999, Xu et al, 1999). De plus, les espèces oxygénées réactives peuvent aussi induire la transcription d'IL-8 via le NF-kB (Janssen-Heininger et al, 2000). Finalement, la synthèse protéique d'IL-8 est régulée au niveau de la transcription génique et de la stabilité de l'ARNm. Dans la plupart des cas, son induction est dépendante des facteurs de transcriptions NF-kB et AP-1 (Mukaida et al, 2000).

6.3 Les récepteurs et la signalisation de l'interleukine-8

L'IL-8 se lie à deux récepteurs distincts, le CXCR1 et le CXCR2, avec une affinité semblable (Holmes et al, 1991, Murphy et al, 1991). Ce sont des molécules liées à la membrane, composées de sept domaines transmembranaires et couplées aux protéines G à leur extrémité COOH-terminale (Murdoch et al, 2000, Murphy et al, 1991). Ces deux récepteurs possèdent une grande homologie dans leur séquence en acides aminés (>80%) exceptés dans la portion NH₂-terminale.

Une fois lié, le récepteur de l'IL-8 est internalisé pour ensuite être recyclé et réapparaître rapidement à la surface de la cellule en-dedans de 60 min (Samanta et al, 1990). En effet, l'inhibition du recyclage du récepteur réduit la chemotaxie médiée par l'IL-8 (Murdoch et al, 2000). Le récepteur activé induit la dissociation de la protéine G en deux sous-unités; la G α et la G $\beta\gamma$. La sous-unité G $\beta\gamma$ générée demeure près du récepteur et va recruter et activer la phosphatidylinositol 3-kinase- γ (PI-3K γ), ce qui va permettre la

génération de la phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP₃) (Servant et al, 2000). La PIP₃ active la protéine kinase B (Akt) ainsi que les GTPases ce qui va permettre une migration chemotactique dirigée et l'adhérence. La sous-unité Gβγ peut activer la phosphatidylinositol 4-phosphate kinase (PIP-K), engendrant l'activation de l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG). Ces derniers peuvent ensuite induire l'activation de la protéine kinase C (PKC) et augmenter la concentration intracellulaire de Ca²⁺ nécessaire pour la génération d'ions superoxydes et l'exocytose respectivement (Mukaida et al, 2003). Chez les leucocytes, l'IL-8 peut médier l'activation de la NADPH oxydase et de la phospholipase D et cette activation est engendrée prédominairement par le CXCR1 (Jones et al, 1996). De plus, l'IL-8 peut aussi activer Ras et éventuellement la protéine kinase activée mitogéniquement (MAPK) et la kinase régulée par un signal extracellulaire (ERK1/2) chez les neutrophiles (Knall et al, 1996).

6.4 Les activités biologiques de l'interleukine-8

Les actions de l'IL-8 sur les différentes cellules immunitaires et son rôle dans les réactions inflammatoires sont nombreux. En ce qui concerne notre champ d'intérêt, de plus en plus d'évidences démontrent que l'IL-8 est impliquée dans le processus de la transmigration des neutrophiles dans les tissus. L'IL-8 est internalisée par les cellules endothéliales, transcytosée à la surface luminale et présentée aux neutrophiles (Middleton et al, 1997). À ce moment, l'IL-8 induit le largage de la molécule d'adhésion L-sélectine, régule l'expression des β₂-intégrines (CD11b/CD18, CD11c/CD18) sur les neutrophiles et altère l'avidité des intégrines constitutivement exprimées (Carveth et al, 1989, Detmers et

al, 1990, Huber et al, 1991) (Voir figure 7). L'IL-8 promouvoit l'adhésion des neutrophiles aux protéines de la matrice extracellulaire, aux cellules endothéliales non-stimulées ainsi qu'à ceux pré-stimulées avec des cytokines via des interactions avec la CD11b/CD18 (Carveth et al, 1989). L'IL-8 stimule la migration à travers l'endothélium (Burns et al, 1996), l'épithélium pulmonaire (Huber et al, 1991) et les fibroblastes (Mul et al, 2000). De plus, l'IL-8 peut activer d'autres fonctions chez les neutrophiles telles que la dégranulation et l'éclatement respiratoire (Mukaida et al, 2000, Oppenheim et al, 1991).

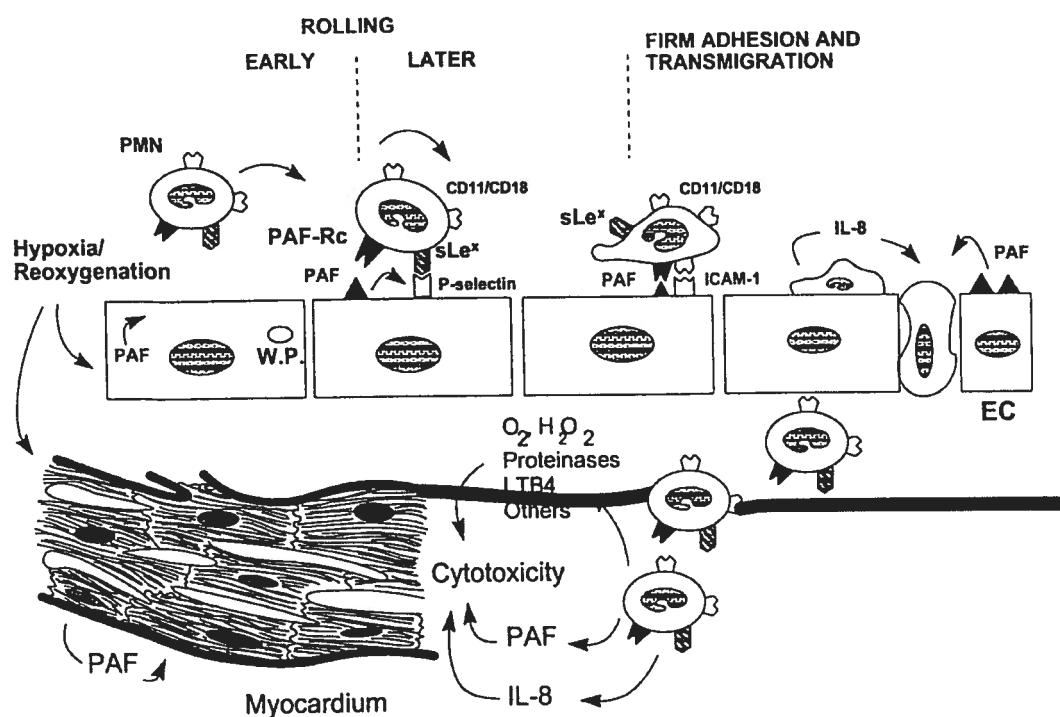


Figure 7 : Rôle possible d'IL-8 dans le recrutement et la transmigration des leucocytes dans un myocarde endommagé. (Modifié de Montrucchio et al, 2000).

6.5 L'interleukine-8 comme un marqueur des maladies cardiovasculaires

Le processus inflammatoire qui médie le développement des maladies coronaires est médié par une multitude de cytokines. L'IL-8 est produite par différents types cellulaires impliqués dans l'athérogénèse, incluant les cellules endothéliales (Schroder et al, 1989), les leucocytes (Peveri et al, 1988) et les cellules musculaires lisses (Wang et al, 1991). L'action de l'IL-8 dans l'athérogénèse peut être induite par ses effets mitogéniques et chemoattractants (Yue et al, 1994). En effet, des modèles expérimentaux d'athérosclérose peuvent être largement diminués en éliminant l'expression génique de l'IL-8 ou bien de son récepteur (Boisvert et al, 1998, Dawson et al, 1999). De plus, le niveau plasmatique de l'IL-8 chez les patients ayant une maladie coronaire artérielle (CAD) instable est supérieur que chez des volontaires sains (Romuk et al, 2002, Kato et al, 1999, Waehre et al, 2003, Aukrust et al, 2001). Récemment, une étude clinique a démontré pour la première fois qu'un niveau plasmatique d'IL-8 pouvait prédire le développement des CAD chez des hommes et des femmes apparemment en santé (Boekholdt et al, 2004). Ces études ont démontré qu'une augmentation de la concentration plasmatique d'IL-8 pouvait augmenter de près de deux fois les risques de développement des maladies cardiovasculaires futurs. Voici un tableau décrivant leurs résultats.

Tableau V : Facteurs de chances "Odds ratio (OR)" pour le développement futur de CAD

Quartile d'IL-8	1	2	3	4	Patients/Contrôles	P
Répartition des quartiles, pg/mL	<2.1	2.1-3.2	3.2-4.8	>4.8		
Hommes/Femmes						
OR non ajusté	1.00	1.27	1.45	1.72	785/1570	<0.0001
OR ajusté*	1.00	1.21	1.31	1.58	709/1467	0.002
OR ajusté†	1.00	1.60	1.49	1.77	445/920	0.01

- *ajusté pour l'âge, pression sanguine systolique, cholestérol, cigarette, diabète
- †ajusté pour facteurs de risque traditionnels et la CRP

En plus de son rôle dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose, l'IL-8 peut accroître le risque de CAD en déstabilisant les plaques athérosclérotiques. Les macrophages présents dans les plaques athérosclérotiques produisent des MMPs qui dégradent la matrice extracellulaire et conséquemment déstabilisent la plaque (Shin et al, 2002, Moreau et al, 1999). Ce processus est cependant contrôlé par la relâche d'inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinases (TIMPs). Il a été démontré que l'expression des TIMPs est diminuée par les lipoprotéines de faibles densités oxydées (oxLDL), et que cette diminution est médiée par l'IL-8 (Moreau et al, 1999). Une autre évidence vient appuyer cette hypothèse par la démonstration d'un niveau supérieur d'IL-8 plasmatique chez les patients CAD que chez les patients apparemment sains (Romuk et al, 2002, Kato et al, 1999, Waehre et al, 2003, Aukrust et al, 2001). Par ailleurs, comme l'IL-8, le peroxy-nitrite semble être un marqueur des CAD chez les humains.

7. Le peroxyinitrite

Le peroxyinitrite est un puissant agent oxydant et nitrosylant découlant de la réaction du superoxyde avec le monoxyde d'azote (NO) (Équation 1) avec une constante du deuxième ordre de $10^{10} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Huie et al, 1993, Kissner et al, 1997). Bien que la génération de peroxyinitrite puisse être bénéfique en terme de défense de l'hôte contre les micro-organismes, un excès de peroxyinitrite peut être néfaste et peut impliquer des dommages aux biomolécules. *In vitro*, une grande variété de biomolécules peut être oxydée par le peroxyinitrite via une réaction directe ou par des radicaux secondaires ($\text{CO}_3^{\cdot-}$, $\cdot\text{NO}_2$, $\cdot\text{OH}$).



Équation 1: Réaction de formation du peroxyinitrite

Le peroxyinitrite promouvoit la nitration (incorporation d'un groupe nitro $-\text{NO}_2$) des résidus aromatiques et aliphatiques. Préférentiellement, les résidus tyrosines des protéines constituent la cible par excellence pour les nitrations médiées par le peroxyinitrite. La présence de 3-nitrotyrosines dans les protéines représente une modification généralement introduite par la formation biologique du peroxyinitrite (Ischiropoulos et al, 1998). Un mécanisme alternatif pour générer ces dérivés oxydants implique la myeloperoxydase (Eiserich et al, 1998), une enzyme dérivée des leucocytes (principalement des neutrophiles)

7.1 L'activation des voies de signalisations par le peroxy-nitrite

Étant un puissant oxydant généré durant les réactions inflammatoires, le peroxy-nitrite peut aussi engendrer des réponses biologiques suite à un stress cellulaire. Les différentes voies de signalisations activées par le peroxy-nitrite ont été résumées dans le chapitre publié par notre laboratoire (Jozsef et al, 2003). En autres, le peroxy-nitrite peut activer les trois familles des MAPKs; la p38 MAPK, la JNK et ERK1/2 (voir figure 8) dans une variété de types cellulaires incluant les cellules épithéliales hépatiques chez les rats (Schieke et al, 1999), les fibroblastes des rats (Bapat et al, 2001), les cellules endothéliales bovines (Go et al, 1999), les neuroblastomes humains (Oh-hashii et al, 1999) et les neutrophiles humains (Lee et al, 2000, Zouki et al, 2001). Par exemple, l'activation de ERK par le peroxy-nitrite chez les neutrophiles humains mène à l'expression de la β_2 -intégrine CD11b/CD18 et à l'augmentation de l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales traitées avec le LPS (Zouki, 2001). L'activation de la NADPH oxidase est connue d'être médiée par la kinase ERK1/2 (Dewas et al, 2000). Ainsi, l'activation de la NADPH oxidase par le phorbol ester est augmentée par une concentration micromolaire de peroxy-nitrite via la MAPK kinase MEK1/2 (Lee et al, 2000). En plus d'activer ces voies intracellulaires, le peroxy-nitrite peut aussi induire l'expression de gènes associés au stress cellulaire telles que c-fos (Müller et al, 1997), l'hème oxygénase (Foresti et al, 1999), les protéines inductibles qui endommagent l'ADN (GADD-34, 45, 153) et qui arrêtent la croissance cellulaire (Oh-hashii et al, 2001).

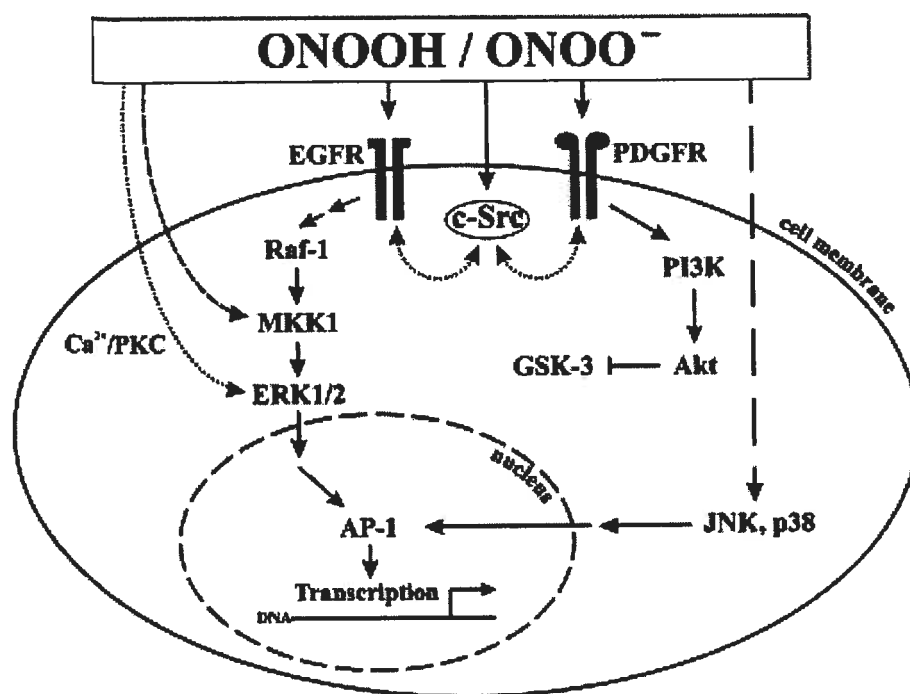


Figure 8: Certaines voies intracellulaires activées par le peroxynitrite. Tirée de Klotz et al, 2002.

La formation de résidus 3-nitrotyrosines sur les protéines peut interférer avec des processus cellulaires dépendant de l'état de phosphorylation de ces mêmes résidus. En effet, il a été démontré que la nitration des résidus tyrosines pouvait empêcher la phosphorylation de la protéine (Kong et al, 1996, Gow et al, 1996). La nitration de la tyrosine peut alors empêcher la tâche de la protéine qui serait normalement phosphorylée ou bien mimer le changement conformationnel qui serait induit par une phosphorylation et ainsi induire les conséquences de la phosphorylation. L'interférence avec le processus cellulaire peut découler du fait que le peroxynitrite peut non seulement nitrer mais aussi oxyder les protéines. Or, la formation et les réactions du peroxynitrite peuvent contribuer à la pathogenèse d'une série de maladies incluant le sepsis, les désordres

neurodégénératifs, l'ischémie-réperfusion et les maladies cardiovasculaires chroniques et aiguës (Haddad et al, 1994, Beckmann et al, 1993, Szabo et al, 1996, Hooper et al, 1994).

7.2 Les nitrotyrosines comme un marqueur des maladies cardiovasculaires

L'oxide nitrique (NO) est un vasodilatateur et un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, de l'adhésion des leucocytes et de la prolifération des cellules musculaires lisses (Kinlay et al, 2001, Moncada et al, 1999, Ignarro et al, 2002). Cependant, sous des conditions pathologiques, le NO peut être convertit en un puissant agent nitrosylant. Comme mentionné plus haut, un mécanisme possible pour la génération d'un oxydant dérivé du NO implique la réaction de ce dernier avec le superoxide, menant à la formation du peroxynitrite. Un mécanisme alternatif pour générer ces dérivés oxydants implique la myeloperoxydase (Hazen et al, 1999, Eiserich et al, 1998, Abu-Soud et al, 2000, Zhang et al, 2001, Brennan et al, 2002), une enzyme dérivée des leucocytes (principalement des neutrophiles) et enrichie dans les lésions athérosclérotiques qui sert de prédicteur indépendant des risques cardiovasculaires (Zhang et al, 2001).

Plusieurs lignes d'évidences supportent un lien potentiel entre la formation des oxydants dérivés du NO et le développement des CAD. Plusieurs études suggèrent qu'un déséquilibre entre la formation du NO et de superoxide à l'intérieur des vaisseaux coronaires dysfonctionnels mène à une déficience en NO, et conséquemment, à la génération d'oxydants dérivés de NO telles que le peroxynitrite et d'espèces nitrogènes dérivés de la myeloperoxydase (Kinlay et al, 2001, Moncada et al, 1999, Ignarro et al, 2002, Podrez et al, 1999, Cai et al, 2000). D'autres mécanismes alternatifs ont établi un

lien entre les oxydants dérivés de NO, l'activation des MMPs et le développement des plaques instables (Galis et al, 2002), et le développement d'un état pro-thrombotique (Freedman et al, 1998, Loscalzo et al, 2001). Une autre étude récente a démontré que le CD40L via le peroxy-nitrite causait la nitration et l'inhibition de la PGI₂, initiant ainsi la formation d'une lésion athérosclérotique et thrombotique (Bradley et al, 2005). Dans la même ligne d'intérêt, une étude a démontré que le peroxy-nitrite est capable de réduire *in vitro* la fonction du tPA (Nielsen et al, 2004). Il est connu que l'interface de l'endothélium vasculaire et les macrophages expose une quantité significative de nitrotyrosines dans les plaques athérosclérotiques (Depre et al, 1999, Esaki et al, 2000). Conséquemment, puisque le tPA est relâché par l'endothélium vasculaire stimulé par la formation de thrombine, il est concevable que l'inactivation du tPA par le peroxy-nitrite puisse diminuer la lyse du caillot sanguin, contribuant ainsi à un état thrombotique. De plus, une étude clinique a démontré que le niveau de nitrotyrosines peut servir comme un marqueur inflammatoire des CAD. En effet, un niveau systémique de protéines ayant des résidus nitrotyrosines était associé à des patients ayant une CAD même après un ajustement des facteurs de risques traditionnels et de CRP (Shishehbor et al, 2003). Voici un tableau résumant leurs résultats.

Tableau VI: Facteurs de chances “Odds ratio (OR)” pour le développement futur de CAD

Caractéristiques	Quartiles				P
	1	2	3	4	
Nitrotyrosines, umol/mol tyrosines	<3.6	3.6-6.3	6.4-10.0	>10.1	
	CAD, Patients (n = 100), Contrôles (n = 108)				
Nombre de patients	17	19	26	38	
Nombre de contrôles	38	29	27	14	
OR (95% IC)					
Non ajusté	1.0	1.4	2.2	6.1	<.001
Modèle ^{1†}	1.0	2.3	2.1	5.4	<.001
Modèle ^{2‡}	1.0	2.3	1.1	4.4	<.001

- [†]ajusté pour les facteurs de risques traditionnels
- [‡]ajusté pour les facteurs de risques traditionnels et CRP

Alors, l'activation de différentes cellules inflammatoires, les interactions entre ces cellules et l'augmentation des niveaux plasmatiques des marqueurs de maladies coronaires aiguës tels que la CRP, l'IL-8 et les nitrotyrosines semblent jouer un rôle crucial dans le développement des maladies cardiovasculaires.

Somme toute, bien que plusieurs études suggèrent une association entre un niveau élevé de la CRP et les CAD, peu est connu sur les mécanismes intracellulaires d'activations des neutrophiles et des cellules endothéliales ainsi que les mécanismes d'interactions entre les neutrophiles et les plaquettes par la CRP; tous étant des médiateurs importants dans le développement des maladies athéro-thrombotiques. Or, nous avons étudié si un réarrangement structurel de la forme native de la CRP était capable d'activer les neutrophiles, les plaquettes et les cellules endothéliales et d'induire un changement phénotypique à leurs surfaces afin de promouvoir les interactions entre elles.

II. HYPOTHESE ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Principalement, ces études visent à comprendre les mécanismes par lesquels la CRP peut moduler la fonction des neutrophiles, des plaquettes et des cellules endothéliales humains au site de l'inflammation, une étape importante de la réponse inflammatoire aiguë associée avec le CAD. Pour ce faire, nous avons testé l'hypothèse qu'un réarrangement conformationnel de la CRP est un pré-requis pour (1) médier l'activation des cellules endothéliales coronaires artérielle humaines (HCAEC), (2) promouvoir l'adhésion des plaquettes sur les neutrophiles et (3) induire la sécrétion de l'IL-8 via le peroxy-nitrite chez les neutrophiles humains. Tous ces événements étant impliqués dans le développement des maladies coronaires aiguës.

Les principaux objectifs spécifiques sont :

1. Étudier les mécanismes intracellulaires qui modulent les changements d'expression des molécules d'adhésions ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1 à la surface des HCAECs lorsque stimulées par la CRP ou par la forme monomérique/modifiée de la CRP.
2. Vérifier si les deux différentes formes de la CRP peuvent moduler la capture des neutrophiles par les plaquettes et ensuite induire l'agrégation homotypique des neutrophiles. Étudier les différentes molécules d'adhésions impliquées dans les interactions neutrophiles-plaquettes et plaquettes-plaquettes.
3. Examiner si les deux formes de la CRP peuvent induire la sécrétion de l'IL-8 chez les neutrophiles et élucider les mécanismes intracellulaires.
4. Étudier le ou les récepteur(s) étant impliqué(s) suite à une activation des trois types cellulaires mentionnés ci-haut par les deux formes de la CRP.

III. RÉSULTATS

CHAPITRE I (Article 1)

Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. (2004) Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation* 109: 2016-2022.

(Reproduced with the kind permission of *Circulation*, Journal of the AMERICAN HEART ASSOCIATION)

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Tarek Khreiss

Dans ce projet, j'ai effectué presque la totalité des expériences. J'ai analysé les résultats découlant de ces expériences et participé à la rédaction de l'article.

Levente Jozsef

Dans ce projet, Levente Jozsef a étroitement collaboré avec moi afin de mettre au point et d'effectuer certaines expériences. Il a participé à l'étude des molécules d'adhésions exprimées à la surface des cellules endothéliales par cytométrie en flux lorsque stimulées par la CRP. De plus, il a participé dans la création des figures.

Lawrence A. Potempa

Chimiste de profession, Dr. Lawrence A. Potempa nous a gracieusement fourni les différentes formes de la CRP et a participé à la caractérisation de la forme modifiée de la CRP. De plus, il a participé dans la revue critique du manuscrit.

Dr. Janos G. Filep

Étant mon directeur de recherche, Dr. Janos G. Filep, m'a guidé et m'a supervisé durant toutes les étapes du projet.

INTRODUCTION GÉNÉRALE DU CHAPITRE I

Dans ce présent chapitre, nous avons examiné l'impact de la CRP et de mCRP sur la production de la protéine chemoattractrice des monocytes-1 (MCP-1) et de l'IL-8, deux régulateurs clés du recrutement des leucocytes, et sur l'expression des molécules d'E-sélectine, de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) et de la molécule d'adhésion vasculaire-1 (VCAM-1) chez les cellules endothéliales coronaires artérielles humaines (HCAEC).

Nous avons trouvé que la forme mCRP, après 4 heures d'incubation, augmente la transcription génique et la sécrétion de MCP-1 et d'IL-8 et de l'ARNm et l'expression des molécules d'adhésions ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1 sur les HCAECs. D'autres part, la forme native de CRP avait un effet significatif seulement après une durée d'incubation plus longue, c'est-à-dire une durée variant entre 6-24 heures. Les actions de mCRP sur les HCAECs étaient inhibées par un anticorps anti-CD16 alors que l'anticorps anti-CD32 n'avait pas d'effets. La mCRP induisait la phosphorylation de la p38 MAPK et l'inhibiteur spécifique de cette kinase renversait les actions de mCRP. Ainsi, un réarrangement structurel de CRP en mCRP est nécessaire afin de promouvoir des actions pro-inflammatoires sur les HCAECs via la voie intracellulaire de la p38 MAPK. Ces observations suggèrent que seulement la forme modifiée de CRP semble contribuer au développement de l'inflammation vasculaire.

MS ID#: CIRCULATIONAHA/2003/414474 Version:2

Conformational Rearrangement in C-Reactive Protein is Required for Proinflammatory
Actions on Human Endothelial Cells

Tarek Khreiss, MSc; Levente József, MSc; Lawrence A. Potempa, PhD; János G. Filep,
MD

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Department of Medicine (T.K.,
L.J., J.G.F.), University of Montreal, Montreal, QC, Canada; Immtech International, Inc.
(L.A.P.), Vernon Hills, IL

First author surname: Khreiss

Short title: Loss of Symmetry in CRP and Inflammation

Corresponding author: János G. Filep, MD

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital
5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec
Canada H1T 2M4

Phone: (514)252-3400 ext.4662; Fax: (514)252-3430

E-mail: [REDACTED]

Total word count: 4494

Subject Codes: [3], [134], [138], [142], [97]

ABSTRACT

Background – C-reactive protein (CRP) has been suggested to actively amplify the inflammatory response underlying coronary heart diseases by directly activating endothelial cells. In this study, we investigated whether loss of the cyclic pentameric structure of CRP, resulting in formation of modified or monomeric CRP (mCRP) is a prerequisite for endothelial cell activation.

Methods and Results – We examined the impact of native CRP and mCRP on the production of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), key regulators of leukocyte recruitment, and on the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human cultured coronary artery endothelial cells (HCAEC). Incubation with mCRP for 4 hours increased MCP-1 and IL-8 secretion and mRNA levels, and ICAM-1, E-selectin and VCAM-1 protein and mRNA expression. Significant induction occurred at 1-5 $\mu\text{g/mL}$; reached a maximum at 30 $\mu\text{g/mL}$, and did not require the presence of serum. Native CRP was without detectable effects at 4 hour, whereas it enhanced cytokine release after a 24-hour incubation. An anti-Fc γ RIII (CD16), but not an anti-Fc γ RII (CD32), antibody produced a 14-32% reduction of the mCRP effects ($P < 0.05$). mCRP, but not CRP, evoked phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase, and inhibition of this kinase with SB 203580 reversed the mCRP effects. Furthermore, culture of HCAEC in the presence of SB203580 markedly decreased mCRP-stimulated E-selectin and ICAM-1-dependent adhesion of neutrophils to HCAEC ($P < 0.001$).

Conclusions – Loss of pentameric symmetry in CRP, resulting in formation of mCRP, promotes a proinflammatory HCAEC phenotype through a p38 MAPK-dependent mechanism.

Key Words: protein, C-reactive; cell adhesion molecules; signal transduction, endothelium; inflammation

Condensed Abstract: We investigated whether loss of the pentameric symmetry of C-reactive protein (CRP), resulting in formation of modified/monomeric CRP (mCRP) is a prerequisite for endothelial cell activation. Culture of human coronary artery endothelial cells for 4 hours with mCRP, but not native CRP, induced release of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8, and protein and mRNA expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and E-selectin through activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and binding to FC γ RIII. Pharmacological inhibition of p38 MAPK markedly decreased E-selectin and ICAM-1-dependent neutrophil-endothelium attachment. These results indicate that mCRP rather than native CRP may contribute to vascular inflammation.

INTRODUCTION

Acute coronary artery diseases are associated with evidence of inflammation both systemically and in the arterial wall.^{1,2} Elevated plasma levels of C-reactive protein (CRP) are predictive of subsequent acute coronary events among apparently healthy subjects and patients with stable or unstable angina.³⁻⁵ However, the exact role and mechanisms of action of CRP as a modulator of inflammation has not been well defined, for both pro- and anti-inflammatory actions have been reported.⁶⁻¹² Recent results suggest that CRP may directly contribute to endothelial dysfunction by inducing cytokine release and surface expression of adhesion molecules.¹³⁻¹⁵ Intriguingly, these actions were evident only after 12 to 24 hours incubation, whereas maximum increases in adhesion molecule expression can be detected within 4 to 6 hours in response to pro-inflammatory cytokines or bacterial lipopolysaccharide (LPS). These observations raise the possibility that CRP may undergo structural changes in order to activate endothelial cells. Indeed, it has been proposed that distinct isoforms of CRP are formed during inflammation. Conformationally altered forms of CRP express several epitopes that are not present on native CRP¹⁶ and display properties distinct from those of native CRP.¹⁷⁻¹⁹ Native, pentameric CRP dissociates into free subunits within a few hours following binding to plasma membrane.²⁰ These subunits expressing several neoepitopes are referred to as modified or monomeric CRP (mCRP). mCRP antigens were detected in the wall of human normal blood vessels²¹ and in inflamed tissues.²²

In this study, we investigated whether conformational rearrangement of native CRP, resulting in formation of mCRP, may be required for induction of release of interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), key regulators of leukocyte recruitment, and expression of adhesion molecules in human coronary artery

endothelial cells (HCAEC). To gain insight into the underlying mechanisms, we also examined whether the mCRP actions on HCAEC are mediated through binding to one of the IgG receptor subtypes similarly to that reported for leukocytes;^{18,23,24} and via activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK).

METHODS

CRP isoforms

High purity (>99%) human native CRP (Calbiochem) was stored in a NaN_3 -free buffer containing CaCl_2 to prevent spontaneous formation of mCRP from the native pentamer. A recombinant form of mCRP (r_m -CRP) that cannot rearrange into a pentameric structure was engineered as described.¹⁸ Native CRP was distinguished from mCRP by binding and antigenicity differences using monoclonal antibodies described for each form of the molecule,^{16,17} and by their secondary structure.¹⁸ The endotoxin levels of all peptide solutions were below the detection limit (0.125 EU/ml corresponding to ~ 0.01 ng/mL LPS) of the *Limulus* assay (Sigma).

HCAEC Stimulation

HCAEC (passage 3, from Clonetics) were cultured in EGM-MV medium (Clonetics) supplemented with 10% FBS.¹¹ Monolayers of HCAEC (passages 4 through 6) in 24-well or 96-well microplates (confluence >97%, $\sim 28,000$ cells/cm²) were incubated with native CRP or mCRP. In some experiments, HCAEC were pretreated with the MAPK kinase inhibitor PD98059 (50 μM), the p38 MAPK inhibitor SB203580 (0.1-1 μM), the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin (100 nM), the anti-Fc γ RIII (CD16) antibody 3G8, anti-Fc γ RIIa (CD32) antibody FL18.26 or the irrelevant antibody MOPC-

21 (each at 2.5 µg/mL, Pharmingen) for 30 min before addition of mCRP. At the indicated times, culture supernatants were collected and the cells were processed as described below.

Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Interleukin-8 Production

The concentrations of MCP-1 and IL-8 in culture supernatants were determined in duplicate by selective ELISAs (BD Pharmingen). Intra-, and interassay coefficient of variation were typically <4% and <6%, respectively. There was no cross-reactivity with CRP isoforms in the assays.

Cell Adhesion Molecule Expression

After incubation for 4 hours, HCAEC were detached with EDTA (0.01% in PBS) from the 24-well microplates, and then stained for ICAM-1, E-selectin or VCAM-1 using fluorescent dye-conjugated anti-ICAM-1, anti-VCAM-1 (Pharmingen) or anti-E-selectin (Serotec) antibodies as described.¹⁹ Nonspecific binding was evaluated by using appropriately labeled mouse IgG₁. Immunofluorescence (10,000 cells for each sample) was analyzed with a FACScan flow cytometer with CellQuestPro software.

RNase Protection Assay

For multi-probe RNase protection assays, HCAEC were lysed with 50 µL of lysis/denaturation solution (Ambion). [³²P]-labeled anti-sense RNA probes were generated using templates for IL-8, MCP-1, ICAM-1, E-selectin, VCAM-1, L32 and GAPDH (RiboQuant, BD Pharmingen), and the assays were performed with the Direct Protect kit (Ambion) as described.²⁵

Neutrophil-Endothelial Cell Adhesion Assay

The adhesion assay was performed as described previously.^{11,19} In brief, monolayers of HCAEC in 96-well microplates were cultured with CRP, mCRP or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a positive control) for 4 hours at 37°C, washed extensively, and 2×10^5 human ^{51}Cr -labeled neutrophils in 100 μL were then added. In some experiments, mCRP was added back together with neutrophils to mCRP-treated HCAEC. Some experiments were repeated using function-blocking monoclonal antibodies against E-selectin (ENA-2, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, purified F(ab')₂, Monosan), L-selectin (DREG-56, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CD18 (L130, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or the irrelevant antibody MOPC-21 (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, all from BD Biosciences). HCAEC were incubated with neutrophils for 30 min at 37°C on an orbital shaker at 90 rpm. Loosely adherent or unattached cells were removed by washing, and the endothelial monolayer plus the adherent neutrophils were lysed. The number of adherent neutrophils in each experiment was calculated from the radioactivity of a control sample.

Western blot for p38 MAPK

Protein extracts were prepared by lysing 5×10^4 HCAEC in 100 μL of lysis buffer.

Western blot analysis of phosphorylated and total p38 MAPK was performed using the PhosphoPlus p38 MAPK antibody kit (New England Biolabs).^{18,19}

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. Statistical comparisons were made by analysis of variance using ranks (Kruskal-Wallis test) followed by Dunn's multiple contrast hypothesis test to identify differences between various treatments or by the Mann-

Whitney U test for unpaired observations. Values of $P < 0.05$ were considered significant for all tests.

RESULTS

mCRP Induces p38 MAPK-dependent Expression of IL-8 and MCP-1 in HCAEC

Culture of HCAEC with mCRP for 4 hours resulted in concentration-dependent increases in IL-8 and MCP-1 release, whereas native CRP was without effect (Figure 1A).

Significant induction was detected even with 1 $\mu\text{g/mL}$ that peaked at 100 $\mu\text{g/mL}$ mCRP.

The maximal effects of mCRP were ~50% of those of LPS 1 $\mu\text{g/mL}$ (IL-8: 3.9 ± 0.2 ng/mL; MCP-1: 11.4 ± 0.5 ng/mL). Native CRP induced significant release of IL-8 and MCP-1 at 24-hours; however, it was a considerable less potent inducer of cytokine production than mCRP (Figure 1B). The absence of serum did not affect the responses to mCRP (Figure 1C).

Preincubation of HCAEC with SB203580 concentration-dependently decreased mCRP-induced IL-8 and MCP-1 release at 4-hours, whereas neither wortmannin nor PD98059 affected the responses to mCRP (Figure 2A). Furthermore, mCRP, but not native CRP, induced phosphorylation of p38 MAPK relative to unstimulated controls. Phosphorylation was rapid in onset (peak about 30 min) and occurred in a concentration-dependent fashion (Figure 2B).

We performed RNase protection assays on RNA extracted from HCAEC following 4 hours incubation with mCRP. Consistent with the observations at protein levels, mCRP stimulated IL-8 and MCP-1 mRNA levels, that was suppressed by SB203580, but not by PD98059 or wortmannin (Figure 3). Native CRP did not produce detectable changes (Figure 3).

mCRP Induces Expression of Adhesion Molecules

Under our experimental conditions, 2%, 39% and 1% of untreated HCAEC expressed E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1, respectively (Figure 4A). Treatment with mCRP for 4 hours evoked concentration-dependent increases in the overall expression and in the percentage of HCAEC expressing these adhesion molecules, whereas native CRP was without effect (Figure 4A). As a positive control, LPS produced on average 10-, 10- and 5-fold increases in E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 expression, respectively (Figure 4A). SB203580 markedly attenuated mCRP-stimulated expression of these adhesion molecules, whereas PD98059 or wortmannin was without effect (Figure 4B). Likewise, mCRP induced increases in E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 mRNA levels, that were markedly attenuated by SB203580 (Figure 3). Native CRP (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) increased ICAM-1 and VCAM-1 expression on HCAEC from 22.9 ± 1.6 to 52.9 ± 2.0 RFU and from 3.2 ± 0.2 to 7.6 ± 0.5 RFU, respectively ($n=4$, $P<0.05$); though it was less potent than mCRP (ICAM-1, 107.9 ± 8.9 ; VCAM-1, 10.7 ± 0.5 RFU, $n=4$, $P<0.05$ vs. native CRP). Cell viability assessed by propidium iodide staining was $>92\%$ in all experiments.

mCRP Promotes Neutrophil Adhesion to HCAEC

The biological significance of adhesion molecule expression was confirmed by the significant increase of adhesion of neutrophils to HCAEC cultured with mCRP (Figure 5A). Enhanced neutrophil attachment was evident with mCRP at 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and reached an apparent maximum at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. By contrast, native CRP even at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ failed to promote adherence (Figure 5A). The number of adherent neutrophils to mCRP-activated

HCAEC was further enhanced when the adhesion assay was performed in the presence of mCRP (Figure 5B), indicating that mCRP activates both neutrophils and HCAEC.

Since multiple receptors are involved in neutrophil adhesion to HCAEC under non-static conditions,¹¹ and mCRP affects adhesion molecule expression on both neutrophils¹⁹ and endothelial cells (the present study), we assessed the contribution of L-selectin, β_2 -integrins and E-selectin to the binding interaction by using function-blocking monoclonal antibodies. mCRP-stimulated neutrophil attachment to mCRP-activated HCAEC was blocked by antibodies against CD18 (57±4%, n=6), E-selectin (38±3%) and L-selectin (14±2%) (Figure 5C). The combination of these antibodies inhibited neutrophil adhesion by 92±3% (Figure 5C). The number of adherent neutrophils was reduced from $2.8 \pm 0.2 \times 10^4$ cells/well to $1.4 \pm 0.1 \times 10^4$ cells/well when HCAEC were cultured with mCRP (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the absence and presence of SB203580 (n=6, $p < 0.01$). Neither PD98059 nor wortmannin affected significantly the neutrophil-HCAEC attachment (data not shown).

Search for mCRP Receptors on HCAEC

Since CRP binds predominantly to the low affinity IgG Fc γ RIIa (CD32)^{23,24} and mCRP utilizes the low affinity immune-complex Fc γ RIII (CD16)¹⁸ on leukocytes, we used function-blocking antibodies as competitors to assess the possible involvement of these receptors in mediating the actions of mCRP on HCAEC. Pre-incubation of HCAEC with the anti-CD16 antibody resulted in 14-32% attenuation of the responses to mCRP (Figure 6). Neither the anti-CD32 antibody (Figure 6) nor the irrelevant MOPC-21 antibody (data not shown) affected the responses to mCRP.

DISCUSSION

The present results provide evidence for a novel molecular mechanism by which CRP may activate endothelial cells. This bioactivity of CRP is expressed when the pentameric structure dissociates and undergoes a conformational rearrangement, resulting in formation of mCRP.

Formation of mCRP from native CRP involves the dissociation of the CRP pentameric disk. This is accompanied by a loss of predominantly β -sheet secondary structure with an increase in α -helix,¹⁸ exposure of inter-subunit contact residues, in particular residues 198-206, the predominant neoepitope expressed on mCRP,¹⁶ and expression of distinct biological activities.¹⁷⁻¹⁹ For instance, native CRP inhibits, whereas mCRP promotes adhesion of neutrophils to LPS-activated HCAEC.^{11,19} Furthermore, recent results suggest that aggregated (i.e. structurally modified) CRP rather than native CRP may promote uptake of low-density lipoproteins by macrophages.^{26,27} To avoid the confounding effects of spontaneous formation of mCRP from native CRP during prolonged storage in the absence of calcium (our unpublished observation), we utilized CRP preparations devoid of mCRP contamination, and engineered mCRP that cannot reassemble to form a pentamer.

Our study shows that mCRP, unlike native CRP, can induce cytokine release and expression of adhesion molecules on HCAEC after a 4-hour incubation period. We also examined the mechanisms of mCRP signaling in HCAEC, observing a predominant role for the p38 MAPK pathway.

At low $\mu\text{g/mL}$ concentrations, mCRP induced transcription of IL-8, MCP-1, E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 genes within 4-hour of its addition to HCAEC. These

effects were comparable in magnitude to those observed with LPS, a well-known activator of endothelial cells. Consistent with previous studies,¹³⁻¹⁵ native CRP did not evoke detectable changes at 4-hours. The CRP induction became detectable only after 6 to 12 hours incubation, reaching maximal effects at 24-hour,¹³⁻¹⁵ coinciding with *in vitro* kinetic of dissociation into subunits.²⁰ While CRP clearly enhanced IL-8 and MCP-1 production at 24-hour culture, it was a significantly less potent inducer of cytokine production than mCRP. These observations suggest that conformational rearrangement of CRP is a prerequisite for activation of HCAEC, and that the amounts of mCRP generated from CRP within 4 hours are not sufficient to evoke detectable responses. Another important difference between the actions of CRP and mCRP is that the mCRP effects do not depend on, whereas the CRP effects are dependent on a yet unidentified serum cofactor(s).¹³ Since the mCRP action is based on a tissue rather than a serum environment, thus minimizing the need for serum cofactors.

The present study did not address the functional significance of mCRP-induced expression of IL-8 and MCP-1. MCP-1 and IL-8 play important roles in recruitment of monocytes into the vessel wall,^{28,29} IL-8 is a key regulator of neutrophil trafficking and activation.³⁰ Thus, by enhancing chemokine production, mCRP may contribute to the evolution of atherogenesis,²⁸ and to the widespread neutrophil activation observed in patients with unstable angina.² The biological significance of adhesion molecule expression was confirmed by the significant increase of adhesion of neutrophils to mCRP-activated HCAEC. These observations extend previous findings that mCRP promoted neutrophil adhesion to LPS-activated HCAEC through up-regulation of CD11b/CD18 on neutrophils.¹⁹ Our results show that mCRP-induced expression of ICAM-1 and E-selectin also contributes to neutrophil-HCAEC attachment. Significantly

higher number of neutrophils adhered to mCRP-activated HCAEC when the adhesion assay was performed in the presence than in the absence of mCRP, indicating that mCRP can promote adhesion by activating both HCAEC and neutrophils. Leukocyte-endothelial cell interaction involves a complex interplay among adhesion molecules.³¹ Indeed, the anti-CD18, anti-E-selectin and anti-L-selectin antibody alone inhibited 57, 34 and 14% of neutrophil attachment, respectively, whereas combination of the three antibodies blocked ~90% of adhesion. We also detected enhanced VCAM-1 expression after 4-hour culture of HCAEC with mCRP, indicating that mCRP closely mimics the effect of 24-hour incubation with CRP,^{13,15} though the possible role of VCAM-1 in neutrophil adhesion was not investigated.

Our results indicates that mCRP activation of HCAEC involves p38 MAPK. mCRP stimulated rapid phosphorylation of this kinase, and the specific p38 MAPK inhibitor SB203580 markedly inhibited HCAEC responses to mCRP, although the inhibition was incomplete. These results are consistent with those observed with SB203580 on thrombin-induced endothelial chemokine production and ICAM-1 expression,^{32,33} and suggest involvement of other intracellular signaling mechanism(s). Unlike in neutrophils,^{18,19} mCRP does not appear to activate the MAPK kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in HCAEC, because there was no reduction in the presence of PD98059 and wortmannin.

Little is known at present about the CRP or mCRP receptor(s) on endothelial cells. Human aortic endothelial cells may express the receptors FcγRII and FcγRI,³⁴ which bind CRP on leukocytes.^{23,24} In HCAEC, an anti-FcγRII antibody failed to affect the responses to mCRP, whereas an anti-FcγRIII antibody, that effectively blocked the apoptosis delaying action of mCRP in neutrophils,¹⁹ produced a slight attenuation of

mCRP-induced HCAEC activation. While these observations would suggest the involvement of Fc γ RIII, additional studies are needed to confirm the presence of this receptor on HCAEC, and to identify the major binding site(s) for mCRP on HCAEC.

Limitations of this study are that the mechanisms regulating mCRP formation *in vivo* are still unidentified and that mCRP levels are difficult to estimate *in vivo* for, unlike CRP, mCRP is expressed on cell membranes, rather than in the plasma.^{21,22} Since the ratio of membrane-bound mCRP to mCRP in the culture medium is unknown, it is extremely complicated to measure the amount of native CRP that dissociated into free subunits *in vitro*. If indeed mCRP is a tissue-associated mediator, at the sites of injury it may come in contact with the endothelium and leukocytes, amplifying the pro-inflammatory response triggered by the initial endothelial injury.

In summary, the present results indicate that loss of pentameric symmetry in CRP, resulting in formation of mCRP, is prerequisite for the appearance of pro-inflammatory actions on HCAEC. Indeed, mCRP directly facilitates endothelial cell adhesion molecule expression, leukocyte adhesion, and MCP-1 and IL-8 production. Importantly, these effects are, in part, mediated by activation of the p38 MAPK pathway. These findings indicate that mCRP rather than native CRP may contribute to the development of vascular inflammation and suggest that inhibition of p38 MAPK may be a target for anti-inflammatory strategies in vascular diseases.

Acknowledgments

This work was supported by grants (to J.G.F.) and a Doctoral Award (to J.L.) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Heart and Stroke Foundation of Canada, and the Endothelium Subnetwork of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

1. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:1135-1143.
2. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, et al. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med*. 2002;347:5-12.
3. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997;336:973-979.
4. Ridker PM, Buring JE, Shih J, et al. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation*. 1998;98:731-733.
5. Haverkate F, Thompson SG, Pyke SDM, et al. Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. *Lancet*. 1997;349:462-466.
6. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999;340:448-454.
7. Mortensen RF. C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. *Immunol Res*. 2001;20:163-176.
8. Volanakis JE. Complement activation by C-reactive protein complexes. *Ann N Y Acad Sci*. 1982;389:235-250.
9. Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL, et al. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med*. 1999;190:1733-1739.

10. Gershov D, Kim SJ, Brot N, et al. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from the assembly of the terminal complement components, and sustains an anti-inflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med.* 2000;192:1353-1364.
11. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, et al. Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest.* 1997;100:522-529.
12. Xia D, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein (CRP) are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:2575-2580.
13. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ETH. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation.* 2000;102:2165-2168.
14. Pasceri V, Chang J, Willerson JT, et al. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerotic drugs. *Circulation.* 2001;103:2531-2534.
15. Verma S, Li SH, Badiwala MV, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation.* 2002;105:1890-1896.
16. Ying SC, Gewurz H, Kinoshita CM, et al. Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein using monoclonal antibodies. *J Immunol.* 1989;143:221-228.
17. Potempa LA, Siegel NJ, Fiedel BA, et al. Expression, detection and assay of neoantigen (neo-CRP) associated with a free C-reactive protein subunit. *Mol Immunol.* 1987;24:531-541.

18. Khreiss T, József L, Hossain S, et al. Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *J Biol Chem.* 2002;277:40775-40781.
19. Zouki C, Haas B, Chan, JSD, et al. Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with promotion of neutrophil-endothelial cell adhesion. *J Immunol.* 2001;167:5355-5361.
20. Wang HW, Sui SF. Dissociation and subunit rearrangement of membrane-bound human C-reactive proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288:75-79.
21. Diehl EE, Haines GK, Radosевич JA, et al. Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal human vascular tissue. *Am J Med Sci.* 2000;319:79-83.
22. Rees RF, Gewurz H, Siegel JN, et al. Expression of a C-reactive protein neo-antigen (neo-CRP) in inflamed rabbit liver and muscle. *Clin Immunol Immunopathol.* 1988;48:95-107.
23. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, et al. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fc γ receptor type II. *J Exp Med.* 1999;190:585-590.
24. Stein MP, Edberg JC, Kimberly RP, et al. C-reactive protein binding to Fc γ RIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific. *J Clin Invest.* 2001;105:369-376.
25. Filep JG, Beauchamp M, Baron C, et al. Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J Immunol.* 1998;161:5656-5662.

26. Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J. C-reactive protein-mediated low-density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation*. 2001;103:1194-1197.
27. Fu T, Borensztajn J. Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam cell formation in atherosclerotic lesions. *Biochem J*. 2002;366:195-201.
28. Boring L, Gosling J, Cleary M, et al. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveal a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998;394:894-897.
29. Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, et al. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature*. 1999;398:718-723.
30. Luster AD. Chemokines: chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*. 1998;338:436-445.
31. Butcher EC. Leukocyte endothelial cell migration: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*. 1991;67:1033-1036.
32. Marin V, Famarier C, Gres S, et al. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in thrombin-induced endothelial chemokine production and leukocyte recruitment. *Blood*. 2001;98:667-673.
33. Rahman A, Anwar KN, Uddin S, et al. Protein kinase C- δ regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol*. 2001;21:5554-5565.

34. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 2003;107:398-404.

FIGURES-LEGENDS

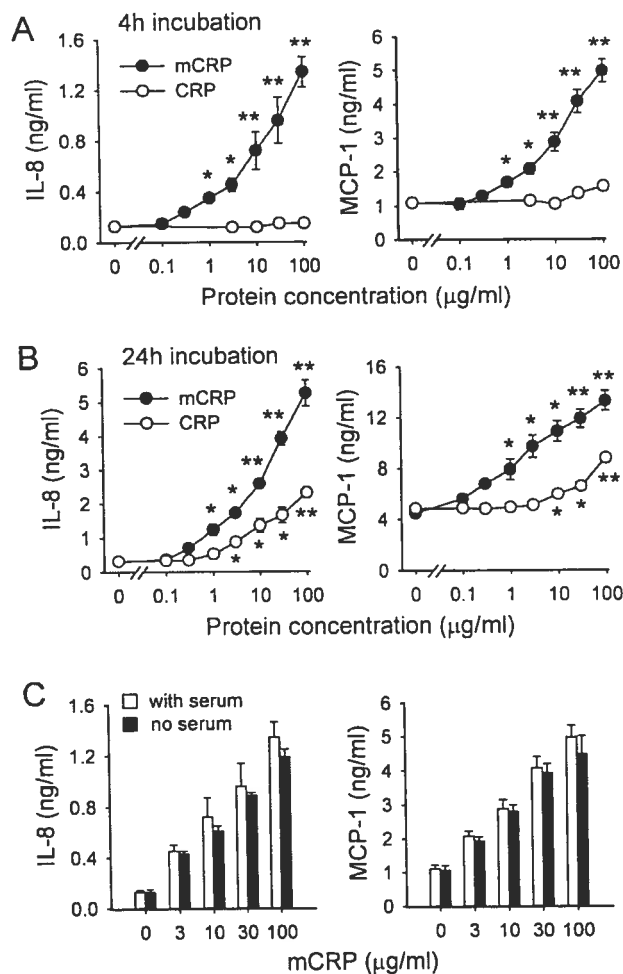
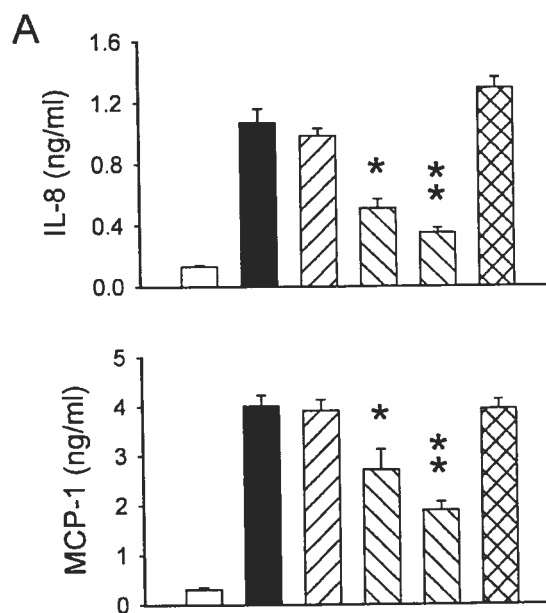
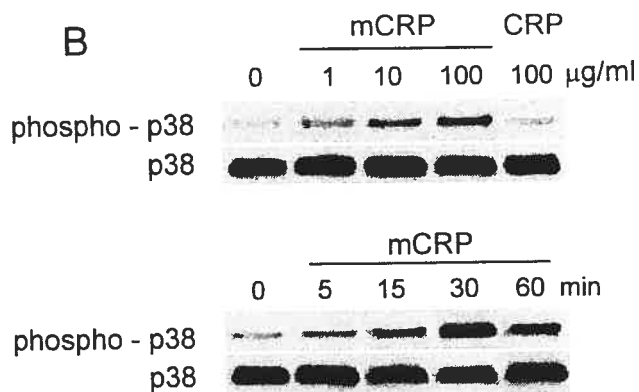


Figure 1. Effects of CRP isoforms on IL-8 and MCP-1 release in HCAEC. HCAEC were cultured with native CRP or mCRP for 4 hours (A) or 24 hours (B) in the presence of 10% FBS. (C) Comparison of the effects of 4-hour incubation with mCRP in presence of 10% FBS ('with serum') or in serum-free conditions ('no serum'). Results are the mean±SEM for 4 to 8 experiments. *P<0.05; **P<0.01 (compared with vehicle).

Figure 2. Effect of p38 MAPK inhibition on mCRP-stimulated IL-8 and MCP-1 release. (A) HCAEC were preincubated with PD98059 (an MEK inhibitor), SB203580 (p38 MAPK inhibitor) or wortmannin (phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor) for 20 min, and then were cultured with mCRP (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4 hours. $n=5$ to 6 per group. $^{\#}P<0.05$; $^{\#\#}P<0.01$ (vs. mCRP alone). (B) Time and concentration-dependent induction of phosphorylation of p38 MAPK by mCRP. HCAEC were challenged for 30 min with various concentrations of mCRP or CRP, or with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mCRP for the indicated times. The experiments were repeated four times with similar results.



	mCRP	-	+	+	+	+	+
PD98059 (μM)	-	-	50	-	-	-	-
SB203580 (μM)	-	-	-	0.1	1	-	-
Wortmannin (nM)	-	-	-	-	-	-	100



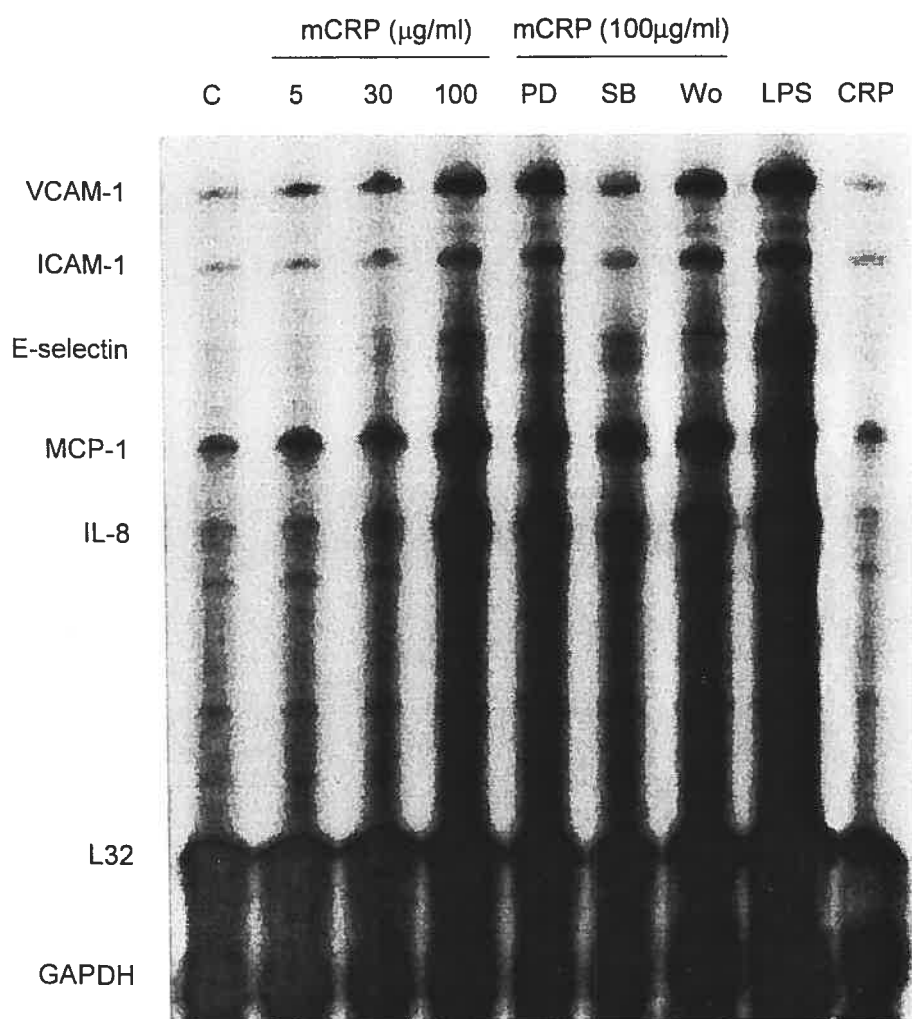


Figure 3. Effects of mCRP and native CRP on IL-8, MCP-1, E-selectin, ICAM-1, VCAM-1, L32 and GAPDH mRNA expression. HCAEC were cultured with CRP (100 $\mu\text{g/mL}$) or mCRP in the presence of PD98059 (PD), SB203580 (SB) or wortmannin (Wo) for 4 hours. C, control (medium only). The effects of LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) are shown for comparison. Shown is a representative multiprobe RNase protection assay of four independent experiments.

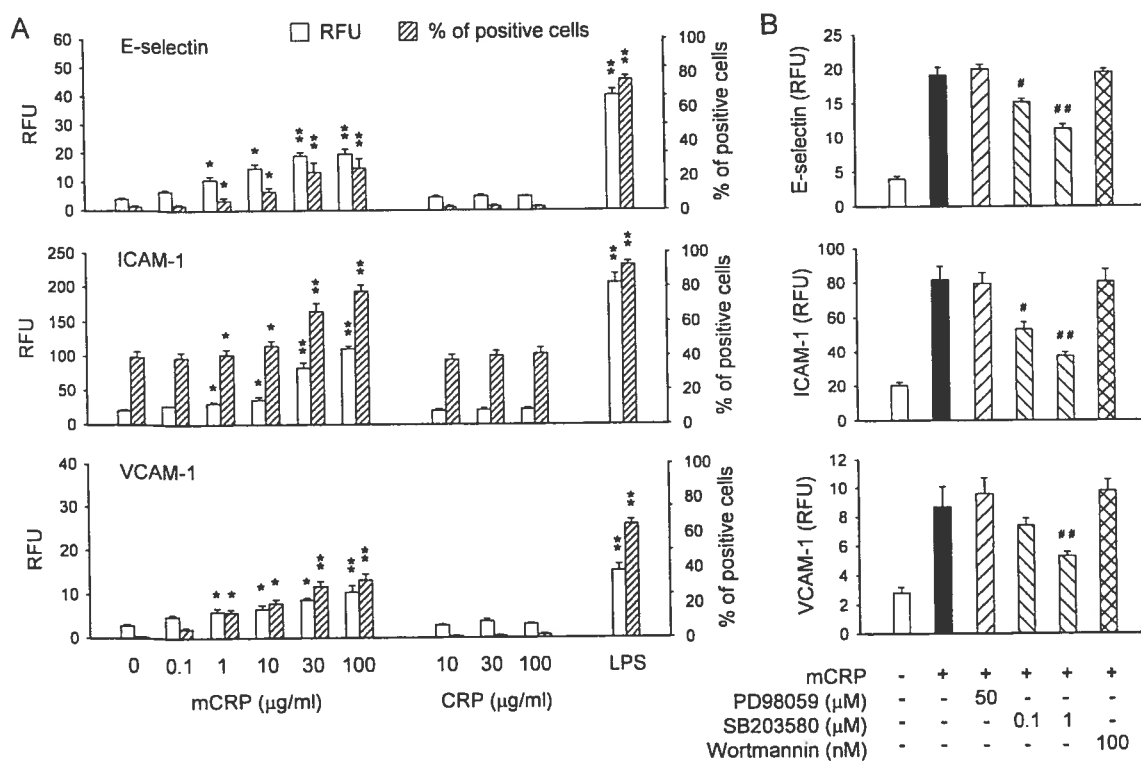


Figure 4. Induction of adhesion molecule expression by mCRP. (A) Monolayers of HCAEC were cultured for 4 hours with mCRP, native CRP or LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Adhesion molecule expression was assessed by flow cytometry and is expressed as relative fluorescence intensity (RFU) after subtracting nonspecific immunostaining. Positive cells represent the % of HCAEC that stained positive for the indicated adhesion molecule. (B) HCAEC were preincubated with PD98059, SB203580 or wortmannin for 20 min, and then challenged with mCRP (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4 hours. Values are the mean \pm SEM for 4-6 independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. control (cells cultured in medium alone). # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$ vs. mCRP alone.

Figure 5. mCRP, but not

native CRP, promotes

neutrophil adhesion to

HCAEC. Confluent

HCAEC monolayers were

cultured in medium only

(control) or challenged with

mCRP, CRP or LPS for 4

hours, then radiolabeled

neutrophils (PMN) without

(A) or together with mCRP

(B) were added, and

incubated with HCAEC for

30 min at 37°C. (C)

Inhibition of mCRP-

stimulated neutrophil adhesion by function-blocking anti-E-selectin, anti-CD18 and anti-

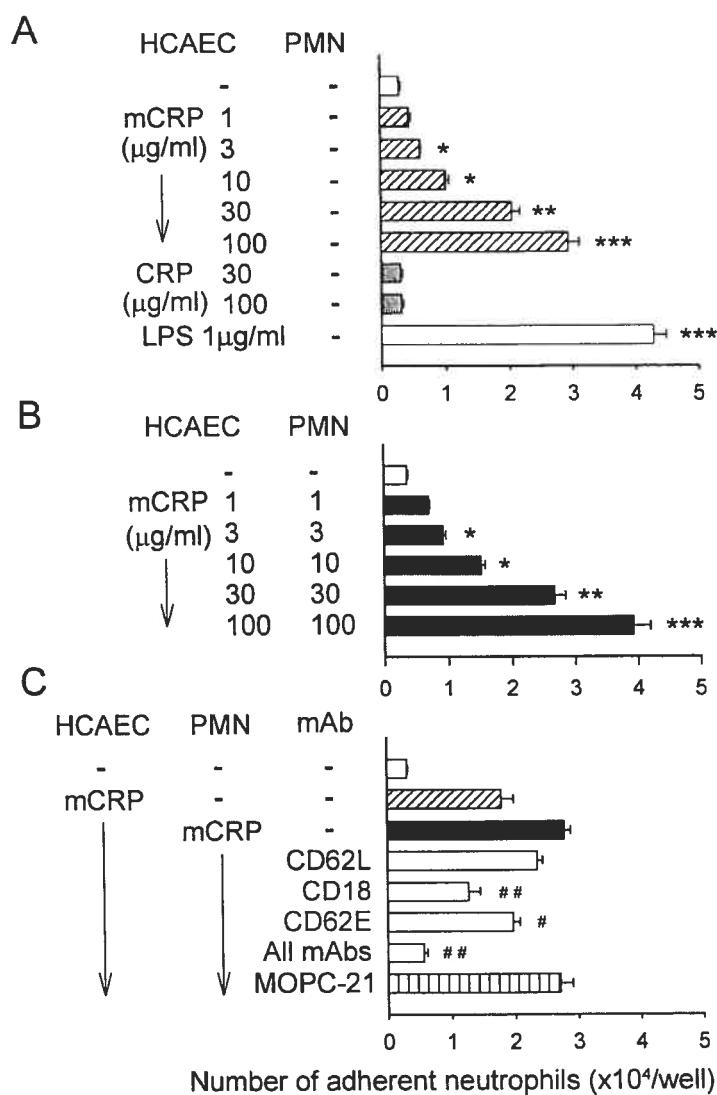
L-selectin monoclonal antibodies (mAb). HCAEC were cultured with mCRP (30 µg/mL,

4 hours), then neutrophils together with mCRP (30 µg/mL) were added for 30 min in the

presence of mAbs, as indicated. The irrelevant antibody MOPC-21 served as a negative

control. Results are the mean±SEM of 6 experiments. *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001

vs. control (medium only); #P<0.05; ##P<0.01 vs. mCRP without mAbs (filled column).



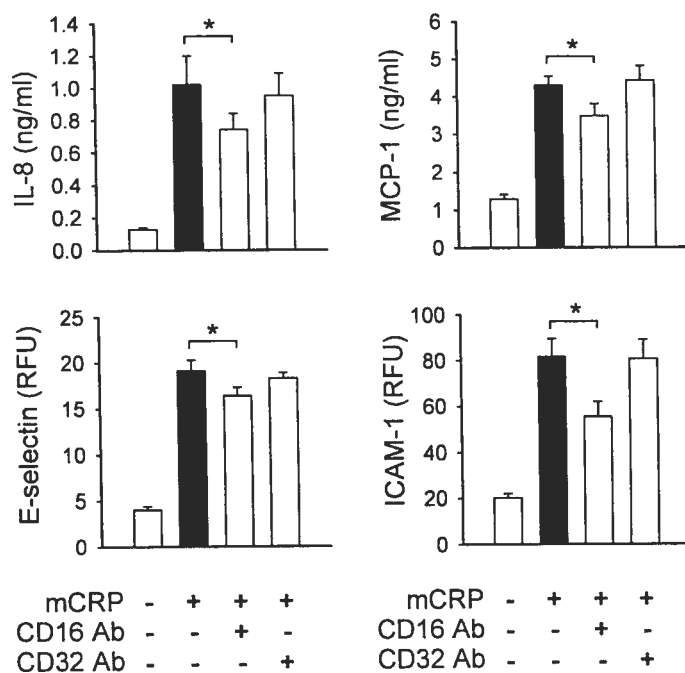


Figure 6. Effect of anti-CD16 and anti-CD32 antibody on HCAEC responses to mCRP. HCAEC were cultured with or without mCRP (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) plus an anti-CD16 antibody (Ab), anti-CD32 antibody, or the irrelevant antibody MOPC-21 (all at 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Culture medium was assayed for IL-8 and MCP-1; surface expression of E-selectin and ICAM-1 was assessed by flow cytometry. $n=4$ for each group. $*P<0.05$.

CHAPITRE II (Article 2)

Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. (2005) Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *Circulation Research* 97:690-697.

(Reproduced with the kind permission of *Circulation Research*, Journal of THE AMERICAN HEART ASSOCIATION)

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Tarek Khreiss et Levente Jozsef

Dans ce projet, j'ai travaillé en étroite collaboration avec Levente Jozsef. Ensemble, nous avons mis au point et effectué toutes les expériences décrites dans l'article. De plus, j'ai analysé tous les résultats découlant de cet article et j'ai contribué à la rédaction de l'article.

Dr. Lawrence A. Potempa

Dr. Lawrence A. Potempa nous a gracieusement fourni les différentes formes de la protéine C-réactive et a participé à la caractérisation de la forme modifiée de la protéine C-réactive. De plus, il a participé dans la revue critique du manuscrit.

Dr. Janos G. Filep

Étant mon directeur de recherche, Dr. Janos G. Filep, m'a guidé et m'a supervisé durant toutes les étapes du projet.

INTRODUCTION GÉNÉRALE DU CHAPITRE II

Dans ce présent chapitre, nous avons examiné les effets de la forme native de la CRP et de mCRP sur la production de l'IL-8 via la signalisation du peroxy-nitrite chez les neutrophiles humains.

Nous avons trouvé que l'incubation du sang total ou des neutrophiles humains isolés avec le mCRP provoque une augmentation du gène et de la sécrétion de l'IL-8 et cette induction était inhibée de $\approx 70\%$ par l'inhibiteur de la NO synthase L-NAME. Chez les neutrophiles humains, la mCRP a induit la formation de superoxyde et de l'oxide nitrique menant à la production du peroxy-nitrite et subséquemment à l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP-1. D'autres part, la forme native de CRP a induit une augmentation de la sécrétion d'IL-8 seulement après une période d'incubation de 24 heures. Les actions de mCRP étaient inhibées de 60-70% par un anticorps anti-CD16 alors que l'anticorps anti-CD32 n'avait pas d'effets. Or, ces résultats suggèrent qu'un réarrangement structurel de la CRP en une forme modifiée mène à la sécrétion de l'IL-8 via la signalisation du peroxy-nitrite et l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP-1 chez les neutrophiles humains. Ces observations soulignent l'importance des neutrophiles en tant que source majeure de stress nitrosatif et d'IL-8 et peut fournir un lien entre CRP, l'activation des neutrophiles, le stress nitrosatif et IL-8, tous étant impliqués dans la prédiction des maladies cardiovasculaires.

Loss of Pentameric Symmetry in C-Reactive Protein Induces Interleukin-8 Secretion through Peroxynitrite Signaling in Human Neutrophils

Tarek Khreiss,* Levente József,* Lawrence A. Potempa, János G. Filep

From the Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital, University of Montréal (T.K., L.J., J.G.F.), Montréal, Québec, Canada, and Immtech International, Inc. (L.A.P.), Vernon Hills, Ill.

* The first 2 authors contributed equally to this work.

Short title: CRP and peroxynitrite signaling in neutrophils

Address for correspondence: Dr. János G. Filep

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital

5415 boulevard de l'Assomption

Montréal, Québec, Canada H1T 2M4

Phone: (514) 252-3400 ext. 4662; FAX: (514) 252-3430

E-mail: XXXXXXXXXX

Subject codes: [3] Acute coronary syndromes, [135] Risk factors, [138] Cell signalling/signal transduction, [147] Growth factors/cytokines, [91] Oxidant stress

ABSTRACT - Plasma levels of C-reactive protein (CRP), nitrotyrosine, and interleukin-8 (IL-8) are known predictors of acute cardiovascular events. Peroxynitrite (ONOO-) may function as an intracellular signal for the production of IL-8. However, it is not known whether CRP regulates these events. Emerging evidence suggests that some bioactivities of CRP are expressed only when the pentameric structure of CRP is lost, resulting in formation of monomeric or modified CRP (mCRP). We studied the impact of human native CRP and bioengineered mCRP that cannot rearrange into the pentameric structure on ONOO- formation and ONOO--mediated IL-8 gene expression in human leukocytes. Incubation of human whole blood or isolated neutrophils with mCRP (0.1-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 4 hours increased IL-8 gene expression and secretion that was blocked ~70% by the NO synthase inhibitor L-NAME. In neutrophils, mCRP simultaneously increased superoxide production and eNOS-mediated NO formation, leading to enhanced ONOO- formation, and consequently activation of NF- κ B and AP-1. Native CRP was without detectable effect at 4 hours, whereas it enhanced IL-8 release after a 24-hour incubation that was blocked by L-NAME. An anti-CD16 antibody, but not an anti-CD32 antibody, produced 60 to 70% reductions in mCRP-stimulated NO formation and IL-8 release (both $P < 0.05$). These results suggest that loss of the pentameric symmetry in CRP, resulting in formation of mCRP, leads to IL-8 release from human neutrophils via peroxynitrite-mediated activation of NF- κ B and AP-1.

Key Words: C-reactive protein, leukocytes, interleukins, signal transduction, inflammation

INTRODUCTION

Epidemiological and clinical studies have shown strong and consistent relationships between circulating markers of inflammation and risk prediction of future coronary artery disease (CAD). Among these markers, elevated plasma levels of C-reactive protein (CRP) are predictive for subsequent acute coronary events among apparently healthy men and women, and patients with stable or unstable angina.^{1,2} The C-X-C chemokine, interleukin-8 (IL-8) is a sensitive marker of unstable CAD.³ Increases in IL-8 levels may coincide with increased CRP levels,⁴ though IL-8 does not stimulate directly CRP gene expression.^{5,6} Increased plasma levels of nitrotyrosine, a “molecular fingerprint” for nitric oxide-derived oxidants,⁷ are also associated with the presence of CAD.⁸ Statin therapy produced reductions in nitrotyrosine concentrations similar to those in total cholesterol and CRP.⁸ However, it is uncertain whether changes in these inflammatory markers occur independently or are interrelated.

Widespread neutrophil activation has also been detected in patients with acute CAD, though the existence of a correlation between neutrophil activation and plasma CRP remains controversial.^{9,10} Neutrophil infiltration into plaques was found to be actively associated with acute coronary events.¹¹ Recent results suggest that peroxynitrite (ONOO⁻), formed in a reaction of superoxide with NO,⁷ functions as an intracellular messenger to mediate IL-8 gene expression in lipopolysaccharide (LPS) or cytokine-stimulated human leukocytes through activation of the transcription factors nuclear factor (NF)- κ B and activator protein-1 (AP-1).¹²⁻¹⁵ CRP induces cytokine release from endothelial cells.¹⁶⁻¹⁸ Recent results suggest that conformational rearrangement in native CRP, leading to the formation of monomeric or modified CRP (mCRP) is required for activation of endothelial cells.¹⁹ CRP and mCRP bind to distinct receptors, Fc γ RIIa (CD32) and

Fc γ RIII (CD16), respectively, on human neutrophils,²⁰⁻²² and exert opposing actions. For instance, native CRP inhibits neutrophil activation, adherence and trafficking,^{5,23-25} whereas mCRP promotes neutrophil adhesion to endothelial cells,¹⁹ and suppresses neutrophil apoptosis.²⁶

In the present study, we investigated the impact of native pentameric CRP and mCRP on IL-8 production in human whole blood and isolated neutrophils. To gain insight into the underlying molecular mechanisms in neutrophils, we characterized the IgG receptor subtype (i.e. the CRP receptor) involved and examined whether induction of IL-8 gene and protein expression is mediated through stimulation of ONOO⁻-dependent activation of NF- κ B and AP-1.

METHODS

CRP Isoforms

High purity (>99%) human native CRP (Calbiochem) was stored in NaN³-free 20 mM Tris, 150 mM NaCl buffer (pH 7.5) containing 2 mM CaCl² to prevent spontaneous formation of mCRP from the native pentamer. A recombinant form of mCRP (rmCRP, purity >97%) that cannot rearrange into a pentameric structure was engineered, characterized and compared with mCRP prepared from native CRP by urea chelation as described.²⁶ Native CRP was distinguished from mCRP by binding and antigenicity differences²⁷ and by their secondary structure.²⁶ The endotoxin level of all protein solutions was below the detection limit (0.125 endotoxin units/mL, corresponding to ~0.01 ng/mL lipopolysaccharide of the *Limulus* assay (Sigma)).

Cell Stimulation

Venous blood (anticoagulated with sodium heparin, 50 U/mL) was obtained from 24 healthy volunteers who had denied taking any medication for at least 2 weeks. The Clinical Research Committee approved the experimental protocols. Neutrophil granulocytes (purity >95%, viability >97%) were isolated as described.²³ Whole blood aliquots or isolated neutrophils (5x10⁶ cells/mL) in microcentrifuge tubes were placed on a rotator and challenged with native CRP or mCRP with or without the NO synthase inhibitor L-NAME (1 mM) at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. In additional experiments, the responses to CRP and mCRP were studied in the presence of the specific NF-κB inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, 100 μM), function-blocking anti-CD16 monoclonal antibody (mAb) 3G8 (isotype: IgG1), anti-CD32 mAb FLI-8.26 (isotype: IgG1) or the irrelevant class-matched MOPC-21 antibody (all at 2.5 μg/mL, BD PharMingen). At the designated time points, the plasma was harvested, and stored at -20°C for later cytokine analysis. Cells were processed as described below.

Measurements of IL-8 mRNA Expression and Secretion

Levels of IL-8 in plasma or culture medium were determined by a selective enzyme immuno-assay (OptEIA, BD Biosciences). Intra-assay and interassay coefficients of variation were typically <4% and <6%, respectively. IL-8 and GAPDH mRNA expression was assayed in RNase protection assays with the Direct Protect kit (Ambion) as described previously.¹²

Nitric Oxide and Superoxide Formation

Intracellular formation of NO was monitored by flow cytometry following incorporation of diaminofluorescein diacetate (5 μ M, Clontech) into neutrophils.¹⁵ Superoxide production was determined as superoxide dismutase-inhibitable reduction of ferricytochrome c.¹⁵

Expression of NO Synthase Isoforms

Total RNA was isolated from 1×10^7 neutrophils using TriZol reagent (Invitrogen). cDNA was prepared with Superscript reverse transcriptase (Invitrogen). The following primers were used for subsequent PCR analysis: human inducible NOS (iNOS), sense 5'-TCTC-TCGGCCACCTTTGATGAG-3' and antisense 5'-GGTTGCATCCAGCTTGACCAG-3'; human endothelial NOS (eNOS), sense 5'-GTGATGGCGAAGCGAGTGAAG-3' and antisense 5'-CCGAGCCCGAACACACAGAAC-3'; human neuronal NOS, sense 5'-CT-TCTGGCAACAGCGGCAATTTG-3' and antisense 5'-TGGACTCAGATCTAAGGCG-GTTG-3'; β -actin, sense 5'-ATGCCATCCTGCGTCTGGAC-3' and antisense 5'-AGCA-TTTGCGGTGCACGATGG-3'.²⁸ The corresponding 412-base pair, 421-base pair, 458-base pair and 500-base pair fragments were amplified enzymatically by 40, 35, 40 and 25 repeated cycles, respectively and subjected to electrophoresis on 1.2 % agarose containing ethidium bromide.

Detection of Peroxynitrite

NO-dependent fluorescence of rhodamine, an oxidation product of dihydrorhodamine 123 (DHR 123)²⁹ and nitrotyrosine formation were measured as markers of ONOO-

formation. DHR 123 (20 μ M, Molecular Probes) was added to some samples during the last 60 min of incubation in the presence or absence of L-NAME (1 mM), and fluorescence was analyzed by a flow cytometer (FACScan, Becton Dickinson).¹² The NO synthase blocker-inhibitable proportion of DHR 123 oxidation can be attributed to ONOO-, because ONOO- readily oxidizes DHR 123, while NO does not.²⁹ DHR 123 oxidation by mCRP was also determined in neutrophils pretreated with the calmodulin inhibitor W7 (20 μ M), the broad PKC inhibitor GF109203X (200 nM), the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin (100 nM) or the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium chloride (DPI, 5 μ M). In additional experiments, neutrophil extracts (prepared as in Ref. 15) were analyzed for the presence of nitrotyrosine, a “molecular fingerprint” of ONOO- (Ref. 7) by an enzyme immunoassay (detection limit: 2 ng/ml) (Cayman Chemicals) using nitrotyrosine as standard.¹⁵ Intra-, and interassay coefficients of variation were typically <6%.

Nuclear Factor- κ B and AP-1

Intranuclear, DNA bound, NF- κ B/p65 and AP-1/c-Fos were measured with a flow cytometry assay^{13,15} and were used as an estimate of NF- κ B and AP-1 activation, respectively. In brief, leukocyte nuclei prepared with the Cycletest Plus DNA reagent kit (Becton Dickinson) were stained with rabbit polyclonal anti-human NF- κ B/p65 or c-Fos antibodies, or with normal rabbit IgG (to assess non-specific binding of IgG to nuclei) and then with FITC-conjugated anti-rabbit IgG antibody (all from Santa Cruz Biotechnology) and propidium iodide. Singlet neutrophil nuclei were gated using the

doublet-discrimination module and fluorescence intensity was analysed with a FACScan flow cytometer using the Cell Quest Pro software.

Calcium Mobilization Assay

Intracellular Ca^{2+} concentration was monitored in Fura-2/AM (1 μM)-loaded neutrophils in a Perkin-Elmer spectrofluorometer (excitation: 340 nm, emission: 510 nm) as previously described.³⁰

Western Blot Analysis

Protein extracts were prepared by lysing 2×10^6 neutrophils in 100 μL of lysis buffer, and immunoblot analysis of phosphorylated and total Akt was performed using the Phospho Plus Akt antibody kit (New England Biolabs) as described.²⁶

Neutrophil Viability

Neutrophil viability was assessed by flow cytometry immediately after staining with propidium iodide (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Statistical Analysis

Results are expressed as means \pm SEM. Statistical comparisons were made by ANOVA using ranks (Kruskal-Wallis test) followed by Dunn's multiple contrast hypothesis tests to identify differences between various treatments. Repeated measures were analysed by the Friedman test followed by the Wilcoxon-Wilcon test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Effects of CRP and mCRP on IL-8 Production and IL-8 mRNA Expression

Incubation of human whole blood with mCRP for 4 hours resulted in concentration-dependent IL-8 release, whereas native CRP was without effect (Figure 1). Significant induction was detected with 5 $\mu\text{g/mL}$, which peaked at 100 $\mu\text{g/mL}$ mCRP (Figure 1B). Native CRP started to increase IL-8 release only after 8 hours of incubation; however, it was a considerable less potent inducer of IL-8 production than mCRP at any time points studied (Figure 1A). Both mCRP and CRP-induced IL-8 release was markedly, though never completely, inhibited by L-NAME (Figure 1A). Likewise, mCRP, but not CRP, induced concentration-dependent IL-8 release from isolated neutrophils after 4 hours of incubation (Figure 1C). On a molar basis, bioengineered mCRP and mCRP prepared from native CRP evoked similar IL-8 release (Figure 1D). Recombinant mCRP (50 $\mu\text{g/mL}$)-induced IL-8 release (5.6 ± 0.7 ng/mL) was unaffected by the formyl-peptide receptor antagonist N-t-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu-Phe (50 μM) (5.4 ± 0.5 ng/mL, $n=6$, $P > 0.1$). Therefore, because of the enhanced solubility, bioengineered mCRP was used in subsequent experiments. Heat inactivation of native CRP (60 minutes at 100°C) resulted in a complete loss of its activity (data not shown). Also, LPS (*Escherichia coli* serotype

O111:B4) at 0.02 ng/mL, a concentration \approx 2-fold higher than the maximum level of LPS contamination in our protein solutions) did not induce detectable IL-8 release (0.24 ± 0.03 ng/mL vs. 0.23 ± 0.03 ng/mL in unstimulated neutrophils, $n=4$, $P>0.1$).

We performed RNase protection assays on RNA extracted from leukocytes after 4 hours incubation with mCRP. Consistent with the observations at the protein level, mCRP evoked concentration-dependent increases in IL-8 mRNA expression, which was suppressed by L-NAME (Figure 2). Native CRP at 100 μ g/mL did not produce detectable changes (Figure 2).

mCRP Induces NO, Superoxide and Peroxynitrite Formation in Neutrophils

Incubation of neutrophils for 4 hours with mCRP led to simultaneous increases in $O^{2\cdot-}$ and NO production. Significant increases were detected with 5 μ g/mL, which peaked at 100 μ g/mL mCRP (Figure 3). The increases in $O^{2\cdot-}$ and NO production coincided with increases in NO-dependent DHR123 oxidation, indicating enhanced ONOO⁻ formation (Figure 3). Addition of the NO donor spermine NONOate (0.5 mM) to L-NAME-treated neutrophils restored DHR123 oxidation (rhodamine fluorescence in RFU, control: 22 ± 4 ; mCRP: 50 ± 4 ; L-NAME+mCRP: 29 ± 3 ; spermine NONOate+L-NAME+mCRP: 48 ± 4 , $n=4$, $P>0.1$ compared with mCRP). To confirm ONOO⁻ formation, we measured cellular nitrotyrosine content. Neutrophils exposed to mCRP for 4 hours contained significantly higher amounts of nitrotyrosine than unchallenged cells, and the increases in nitrotyrosine correlated with those in DHR 123 oxidation (Figure 3).

To identify the NOS isoform(s) responsible for enhanced NO production, we performed RT-PCR on cDNA prepared from neutrophils. These assays resulted in the amplification of eNOS mRNA, but not neuronal NOS and iNOS, in freshly isolated cells

and in response to mCRP at 2 and 4 hours after addition of the protein (Figure 4). mCRP did not affect eNOS mRNA expression (Figure 4).

To characterize the proximal signaling events associated with mCRP-induced ONOO-formation, we monitored calcium mobilization. mCRP evoked a rapid increase in intracellular Ca^{2+} similar to that observed with fMLP (Figure 5A), and transiently enhanced (peak at around 2 min) phosphorylation of Akt (Figure 5B), indicating PI3-kinase activation. Consistently, calmodulin blockade with W7 or inhibition of PI3-kinase with wortmannin significantly reduced mCRP-induced DHR 123 oxidation, and these actions were not additive with L-NAME (Figure 5C). Inhibition of NADPH oxidase with DPI effectively attenuated mCRP-evoked DHR 123 oxidation to the same degree in the absence and presence of L-NAME (Figure 5C). By contrast, the PKC inhibitor GF109203X produced only modest decreases in mCRP-induced DHR 123 oxidation that were further enhanced by L-NAME (Figure 5C).

mCRP Stimulates Nuclear Accumulation of AP-1 and NF- κ B in Neutrophils

Because transcription of IL-8 gene requires activation of NF- κ B and AP-1,³¹ we examined whether mCRP can activate these pathways in neutrophils. We prepared nuclei from unstimulated and mCRP-stimulated neutrophils, and analysed nuclear accumulation of NF- κ B and AP-1 using flow cytometry. Figure 6A shows representative results illustrating mobilization of NF- κ B/p65 and AP-1/c-Fos to the nucleus (i.e. the increased fluorescence represents increased amounts of NF- κ B or AP-1 bound to DNA) in response to mCRP. Nuclear immunostaining was completely blocked by preincubation of the antibodies with the appropriate blocking peptides. The actions of mCRP were

concentration-dependent and were markedly attenuated by L-NAME (Figure 6A and B), consistent with inhibition of IL-8 mRNA expression and production.

Preincubation of neutrophils with PDTC markedly attenuated, though never completely inhibited, mCRP-induced IL-8 production (Figure 7), confirming that increased nuclear accumulation of NF- κ B correlated with induction of IL-8 production.

Involvement of CD16 in mCRP Signaling

Previous studies identified CD16 (Fc γ RIII) as a neutrophil receptor for mCRP.^{22,26} We used function-blocking mAbs to CD16 and CD32 (Fc γ RIIa) as competitors to confirm whether the mCRP actions described above were also mediated via CD16. The anti-CD16 mAb partially prevented mCRP-induced NO formation assessed at 4 hours, and IL-8 release assessed at 4 and 24 hours after addition of mCRP, whereas the anti-CD32 or the irrelevant MOPC-21 antibody had no detectable effects (Figure 8). Increasing the concentration of the anti-CD16 mAb did not result in further inhibition (data not shown). At 24 hours culture, native CRP-induced IL-8 release was also attenuated by the anti-CD16 mAb, but not by the anti-CD32 mAb or MOPC-21 (Figure 8B).

Effect of mCRP on Neutrophil Viability

Since increased NO and ONOO⁻ formation could affect cell viability,^{7,32} we assessed neutrophil survival. Consistent with previous studies,²⁶ after 4 hours culture *in vitro*, the percentage of viable neutrophils was slightly higher in the presence of mCRP (95 \pm 2%, n=5, P<0.05) than in untreated (control) samples (89 \pm 2%) or in the presence of native CRP (88 \pm 3%, n=5, P<0.05 vs. mCRP).

DISCUSSION

The present results provide evidence for a novel mechanism by which CRP may affect the inflammatory process by stimulating ONOO⁻ formation and signaling in human neutrophils. However, these actions are expressed when the pentameric structure undergoes a conformational rearrangement, leading to formation of mCRP. Our results also suggest a potential link between CRP, IL-8, nitrotyrosine and neutrophil activation, as it may occur in the blood of patients with acute CAD.

Our study using human whole blood and isolated neutrophils demonstrates that mCRP stimulates a rapid (within 4 hours) and potent synthesis of IL-8. This is a primary response to mCRP that requires de novo protein synthesis and transcription of the IL-8 gene. Comparison of plasma and culture medium IL-8 levels suggests that ~70% of IL-8 release was of neutrophil origin in blood. Native CRP did not evoke detectable changes at 4 hours. This was unexpected, for native CRP induced rapid (within minutes) shedding of L-selectin from the surface of neutrophils,²³ and cannot be explained by the slight differences in the viability of mCRP or CRP-treated neutrophils. Human blood contains all the yet unidentified serum cofactors that were required for CRP activation of endothelial cells.¹⁶ The CRP stimulation became detectable only after 8 hours of incubation, coinciding with in vitro kinetics of dissociation into subunits.³³ Although CRP clearly enhanced IL-8 production at 8 to 24 hours of incubation, it was a considerably less potent inducer of IL-8 release than mCRP. These observations suggest that conformational rearrangement of CRP is required to induce IL-8 production in neutrophils, and that the amounts of mCRP generated from CRP within 4 hours are not sufficient to evoke detectable increases in IL-8. The time course of neutrophil activation

by native CRP appears to be similar to that of CRP activation of endothelial cells.¹⁹ Neither LPS (at a concentration 2-fold higher than might be present in our protein preparations) nor heat-inactivated CRP evoked detectable IL-8 release, indicating that CRP and mCRP signaling was responsible for the observed effects.

Blockade of NO synthesis with L-NAME inhibited to a similar degree mCRP-induced IL-8 release, nuclear accumulation of NF- κ B and AP-1 in neutrophils, coinciding with suppression of IL-8 mRNA expression. Interestingly, L-NAME also attenuated native CRP-induced IL-8 release, and the degree of inhibition was comparable to that detected with mCRP. These results pointed to the involvement of NO in mediating these responses. Previous studies have shown that ONOO⁻ rather than NO by itself mediates IL-8 release from human neutrophils in response to LPS or cytokines.^{12,34,35} Accordingly, we found that mCRP simultaneously enhanced superoxide and NO formation, coinciding with increases in NO-dependent oxidation of DHR123 and nitration of protein tyrosine residues. A significant portion of rhodamine fluorescence in mCRP-stimulated neutrophils can be attributed to ONOO⁻, because it depends on NO-related species –it can be inhibited by L-NAME- whereas NO *per se* does not oxidize DHR 123.²⁹ Further, the NO donor spermine NONOate restored DHR 123 oxidation in L-NAME-treated neutrophils, indicating that L-NAME does not inhibit NADPH oxidase activation. Although nitrotyrosine is often considered as a distinct “molecular fingerprint” of ONOO⁻ formation,⁷ peroxidase-dependent tyrosine nitration has also been described.^{36,37} Interestingly, in human neutrophils, ONOO⁻ appears to be the predominant mechanism for tyrosine nitration.³⁸

RT-PCR amplified eNOS, but not iNOS and neuronal NOS-specific products in unchallenged neutrophils and in neutrophils treated with mCRP for up to 4 hours. These

results point toward increased eNOS activity as the source for enhanced NO production in response to mCRP. Previous studies on constitutive NOS expression in human neutrophils yielded contradictory results, as both the absence and presence of eNOS and neuronal NOS have been reported.^{28,39-41} Contaminating cells or differences in the NOS assays used might account for this apparent discrepancy. Unstimulated human neutrophils do not express iNOS, whereas iNOS positive neutrophils have been detected in tissue exudates,^{28,41} and after more than 16 hours incubation with cytokines.⁴¹ Whether mCRP could induce iNOS expression after prolonged incubation periods remains to be investigated. There is compelling evidence that eNOS-derived NO contributes to ONOO⁻ formation in amounts sufficient to activate signaling mechanisms and even to induce cell damage.³²

Ca²⁺ mobilization and activation of calmodulin and PI3-kinase appears to be required for mCRP-induced ONOO⁻ formation. Ca²⁺ transients control calmodulin-mediated eNOS activation and the activity of PLC γ 1 and PLC γ 2, which through formation of diacylglycerol and activation of PI3-kinase lead to activation of NADPH oxidase.⁴² The inhibitory actions of W7, wortmannin and DPI on DHR 123 oxidation were not additive with those of L-NAME, suggesting that these compounds inhibited the same reaction, i.e. the ONOO⁻-dependent oxidation through suppression of either NO or O₂⁻ formation. PKC appears to play a minor role in mCRP signaling, for GF109203X inhibited only a small portion of DHR 123 oxidation by mCRP.

The IL-8 gene contains *cis*-regulatory elements for NF- κ B, AP-1 and NF-IL-6.³¹ Of these transcription factors, NF- κ B plays a key role in the induced expression of IL-8. Accordingly, we found that mCRP stimulates nuclear accumulation of NF- κ B and AP-1, and inhibition of NF- κ B activation with PDTC decreased IL-8 production by 66%. The

mechanism of action of PDTC has not been fully defined, but likely involves inhibition of formation of oxidants that would result in activation of I κ B- α kinase and/or enhancing phosphorylation of I- κ B.^{43,44} Thus, NF- κ B activation could be attributed to decomposition products of ONOO-, rather than the parent molecule itself.

Our results indicate that mCRP-induced IL-8 gene expression and release are predominantly mediated through the low affinity immune complex binding IgG receptor CD16, for the function-blocking anti-CD16 mAb 3G8, but not anti-CD32 mAb, markedly, though never completely, inhibited NO formation and IL-8 production in neutrophils. Furthermore, only the anti-CD16 mAb attenuated native CRP-induced IL-8 release at 24 hours incubation. These observations imply that during 24 hours culture, conformational rearrangement might have occurred in native CRP, yielding mCRP, because native CRP does not bind to CD16.²⁰⁻²² We cannot exclude the possibility that mCRP may bind different sites from IgG on CD16, for blockade of the epitope defined by the mAb 3G8 reduced \approx 80% of mCRP binding at 0°C.²² Alternatively, mCRP might interact other as yet unidentified cell surface molecules. These may include direct binding to positively charged residues on proteins and direct interaction with the lipid membrane (Potempa et al., unpublished observations). The slight inhibition of mCRP activation of endothelial cells by anti-CD16 mAb¹⁹ lends support to the existence of mCRP receptor(s) other than CD16.

The mechanisms that induce conformational rearrangement in native CRP in vivo are still unknown. Native, pentameric CRP dissociates into free subunits after binding to plasma membranes³³ or in denaturing or oxidative environment,²⁷ yielding mCRP. However, the percentage of CRP that might have dissociated into subunits during a 24 hours incubation period remains to be determined. Unlike CRP, mCRP appears to be

predominantly membrane-bound,^{45,46} therefore making its detection rather difficult. Since the commercial CRP antibody (clone 8) mainly recognizes mCRP,⁴⁷ tissue immunostaining attributed to native CRP in previous studies might have been due to mCRP. Neutrophils may come into contact with mCRP expressed in the arterial wall at sites of endothelial injury⁴⁵ or perhaps on other leukocytes, thereby aggravating the inflammatory response and contributing to plaque destabilization.¹¹ Stimulated neutrophils release ONOO⁻, though the ratio of intracellularly retained and released ONOO⁻ cannot be deduced.¹² Increased ONOO⁻ release is consistent with enhanced nitration of plasma proteins and may contribute to tissue damage. Finally, our results do not exclude contribution of other cells to elevated plasma levels of nitrotyrosine and IL-8. Indeed, mononuclear leukocytes and endothelial cells also release IL-8 in response to native CRP or mCRP, thereby increasing plasma cytokine levels in patients with CAD. In summary, the present results indicate that loss of pentameric symmetry in CRP, resulting in formation of mCRP, stimulates IL-8 production by human neutrophils through ONOO⁻-mediated activation of NF- κ B and AP-1. These observations point towards neutrophils as a major source of nitrosative stress and IL-8, and may provide a potential link between CRP, neutrophil activation, plasma nitrotyrosine and IL-8, all implicated in predicting future acute CAD.

Acknowledgments

This study was supported by grants (to J.G.F.) and Doctoral Research Awards (to T.K. and L.J.) from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-64283) and the Heart and Stroke Foundation of Quebec.

Conflict-of-Interest Disclosure Statement: Dr. Potempa was employed by NextEra Therapeutics, and is currently employed by Immtech International Inc., of Vernon Hills, Ill. Immtech is a minority owner of the modified C-reactive protein technology. Dr. Potempa received support for his work on modified C-reactive protein from Immtech (until 1999) and from NextEra (from 1998 to 2002).

REFERENCES

1. Bassuk SS, Rifai N, Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: clinical importance. *Curr Probl Cardiol.* 2004;29:439-493.
2. Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield G, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 2004;350:1387-1397.
3. Kanda T, Hirao Y, Oshima S, Yuasa K, Taniguchi K, Nagai R, Kobayashi I. Interleukin-8 as a sensitive marker of unstable coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1996;77:304-307.
4. Kushner I, Broder ML, Karp D. Control of the acute-phase response. Serum C-reactive protein kinetics after acute myocardial infarction. *J Clin Invest.* 1978;61:235-242.
5. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340:448-454.
6. Black S, Kushner I, Samols D. C-reactive protein. *J Biol Chem.* 2004;279:48487-48490.
7. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol.* 1996;271:C1424-C1437.
8. Shishehbor MH, Aviles RJ, Brennan ML, Fu X, Goormastic M, Pearce GL, Gokce N, Keaney JF, Penn MS, Sprecher DL, Vita JA, Hazen SL. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. *JAMA* 2003;289:1675-1680.

9. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med*. 2002;347:5-12.
10. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, Simoons ML, Hamm CW; CAPTURE Investigators. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2003;108:1440-1445.
11. Naruko N, Ueda M, Haze K, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh A, Komatsu R, Ikura Y, Ogami M, Shimada Y, Ehara S, Yishiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2002;106:2894-2900.
12. Filep JG, Beauchamp M, Baron C, Paquette Y. Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J Immunol*. 1998;161:5656-5662.
13. Zouki C, József L, Ouellet S, Paquette Y, Filep JG. Peroxynitrite mediates cytokine-induced IL-8 gene expression and production by human leukocytes. *J Leuk Biol*. 2001;69:815-824.
14. Matata BM, Galinanes M. Peroxynitrite is an essential component of cytokines production mechanism in human monocytes through modulation of nuclear factor-kappa B DNA binding activity. *J Biol Chem*. 2002;277:2330-2335.
15. József L, Zouki C, Petasis NA, Serhan CN, Filep JG. 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 USA*. 2002;99:13266-13271.
16. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ETH. Direct proinflammatory effects of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000;102:2165-2168.

17. Pasceri V, Chang J, Willerson JT, Yeh ETH. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerotic drugs. *Circulation*. 2001;103:2531-2534.
18. Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, Dhillon B, Mickle DA. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation*. 2002;105:1890-1896.
19. Khreiss T, József L, Potempa LA, Filep JG. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation*. 2004;109:2016-2022.
20. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fc γ receptor type II. *J Exp Med*. 1999;190:585-590.
21. Stein MP, Edberg JC, Kimberly RP, Mangan EK, Bharadwaj D, Mold C, Du Clos TW. C-reactive protein binding to Fc γ RIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific. *J Clin Invest*. 2001;105:369-376.
22. Heuertz RM, Schneider GP, Potempa LA, Webster RO. Native and modified C-reactive protein bind different receptors on human neutrophils. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:320-3335.
23. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG. Prevention of *in vitro* neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest*. 1997;100:522-529.
24. Heuertz RM, Webster RO. Role of C-reactive protein in acute lung injury. *Mol Med Today*. 1997;3:539-545.

25. Xia D, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein (CRP) are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2575-2580.
26. Khreiss T, József L, Hossain S, Chan JSD, Potempa LA, Filep JG. Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *J Biol Chem*. 2002;277:40775-40781.
27. Potempa LA, Siegel NJ, Fiedel BA, Potempa RT, Gewurz H. Expression, detection and assay of neoantigen (neo-CRP) associated with a free C-reactive protein subunit. *Mol Immunol*. 1987;24:531-541.
28. Wheeler MA, Smith SD, Garcia-Cardena G, Nathan CF, Weiss RM, Sessa WC. Bacterial infection induces nitric oxide synthase in human neutrophils. *J Clin Invest* 1997;99:110-116.
29. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Rad Biol Med* 1994;16:149-156.
30. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with generally improved fluorescence properties. *J Biol Chem*. 1985;260:3440-3450.
31. Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leuk Biol*. 1994;56:554-558.
32. Szabó C. The role of peroxynitrite in the pathophysiology of shock, inflammation and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 1996;6:79-88.
33. Wang HW, Sui SF. Dissociation and subunit rearrangement of membrane-bound human C-reactive proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:75-79.
34. Cuthbertson BH, Galley HF, Webster NR. The effects of nitric oxide and peroxynitrite on interleukin-8 and elastase from lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Anesth Analg* 1998;86:427-431.

35. Iho S, Tanaka Y, Takauji R, Kobayashi C, Muramatsu I, Iwasaki H, Nakamura K, Sasaki Y, Nakao K, Takahashi T. Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF- κ B. *J Leukoc Biol.* 2003;74:942-951.
36. Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998;391:393-397.
37. Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT, Lusic AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL. A tale of two controversies: defining the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 2002;277:17415-17427.
38. Galinanes M, Matata BM. Protein nitration is predominantly mediated by a peroxynitrite-dependent pathway in cultured human leucocytes. *Biochem J.* 2002;367:467-473.
39. Schmidt HHHW, Seifert R, Böhme E. Formation and release of nitric oxide from human neutrophils and HL-60 cells induced by a chemotactic peptide, platelet-activating factor and leukotriene B4. *FEBS Lett.* 1989;244:357-360.
40. Wallerath T, Gath I, Aulitzky WE, Pollock JS, Kleinert H, Förstermann U. Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb Haemostasis.* 1997;77:163-167.

41. Evans TJ, Buttery LDK, Carpenter A, Springall DR, Polak JM, Cohen J. Cytokine-treated human neutrophils contain inducible nitric oxide synthase that produces nitration of ingested bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9553-9558.
42. Sánchez-Mejorada G, Rosales C. Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol*. 1998;63:521-533.
43. Schreck R, Meier B, Mannel DN, Dröge W, Bauerle PA. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor κ B activation in intact cells. *J Exp Med*. 1992;175:1181-1194.
44. Suzuki YJ, Mitzuni M, Packer L. Signal transduction for nuclear factor- κ B activation. Proposed location of antioxidant-inhibitable step. *J Immunol*. 1994;153:5008-5015.
45. Diehl EE, Haines GK, Radosevich JA, Potempa LA. Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal human vascular tissue. *Am J Med Sci*. 2000;319:79-83.
46. Rees RF, Gewurz H, Siegel JN, Coon J, Potempa LA. Expression of a C-reactive protein neo-antigen (neo-CRP) in inflamed rabbit liver and muscle. *Clin Immunol Immunopathol*. 1988 ;48 :95-107.
47. Schwedler S, Guderian F, Dammrich J, Potempa LA, Wanner C. Tubular staining of modified C-reactive protein in diabetic chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:2300-2307.

FIGURES-LEGENDS

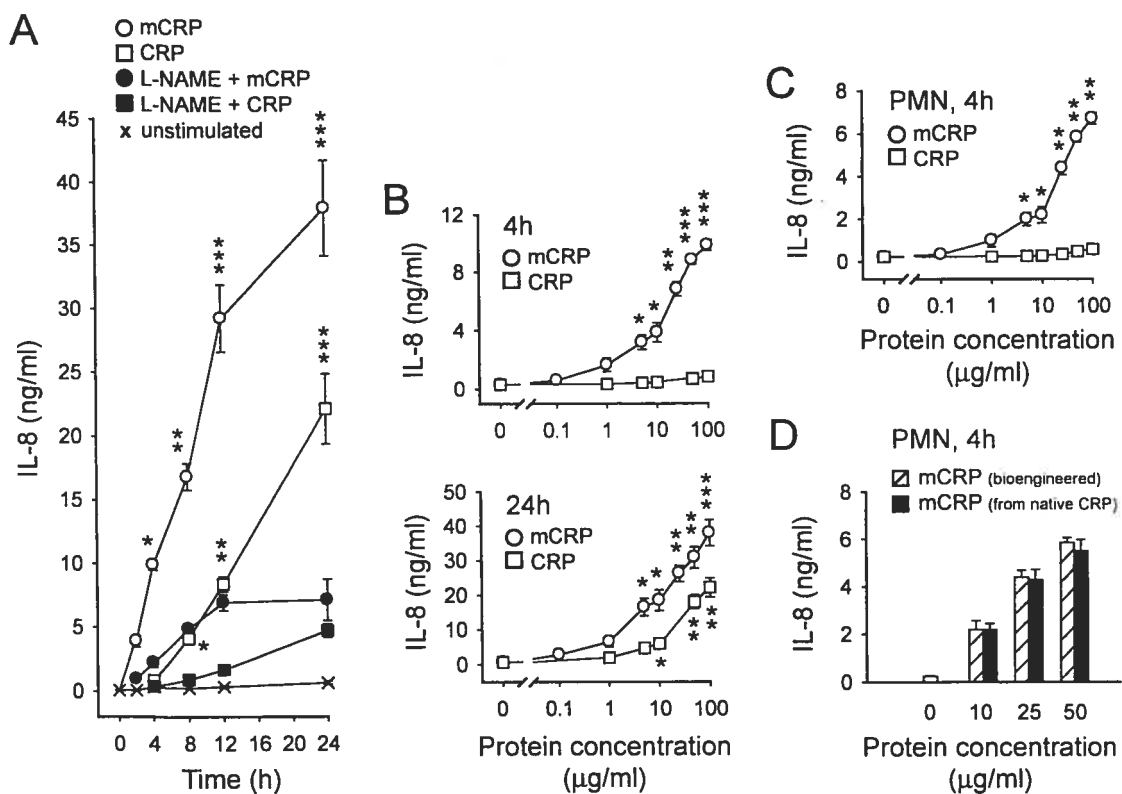


Figure 1. CRP isoforms induce IL-8 release from neutrophils and whole blood. Blood samples (A, B) or isolated neutrophils (PMN, 5×10^6 cells/mL) (C) were incubated (A) with CRP or mCRP (100 μ g/mL) in the absence and presence of L-NAME (1 mM) or (B, C) with various concentrations of CRP and mCRP or (D) with bioengineered mCRP or mCRP prepared from native CRP at 37°C for the indicated times. Secreted IL-8 was determined by ELISA. Results are mean \pm SEM for 4 to 6 experiments with different donor cell preparations. Blood/neutrophils obtained from the same persons were used to study CRP and mCRP plus L-NAME. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. unstimulated (control). L-NAME inhibited mCRP or CRP (100 μ g/mL)-stimulated IL-8 release by $\geq 70\%$ ($P < 0.01$ at all time points studied; for the sake of clarity symbols are not shown).

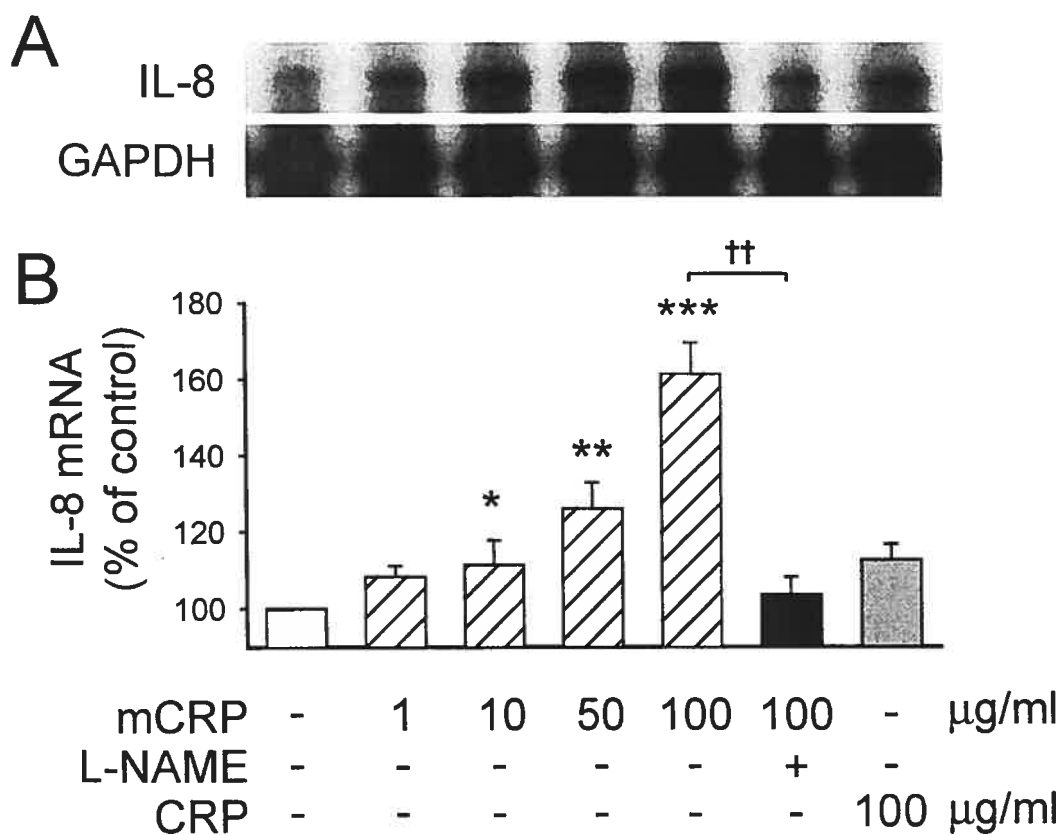


Figure 2. Effects of mCRP and CRP on IL-8 mRNA expression. Neutrophils were incubated for 20 min with L-NAME (1 mM) and challenged with CRP or mCRP for 4 h at 37°C. (A) Representative RNase protection assay using probes for IL-8 and GAPDH. (B) Densitometry analysis of autoradiographs of the samples probed for IL-8 and GAPDH. The IL-8 results are expressed as percentage of control (unstimulated) after normalization with the GAPDH values. The results represent means \pm SEM from 4 assays with different blood donors. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs. unstimulated. †† $P < 0.01$.

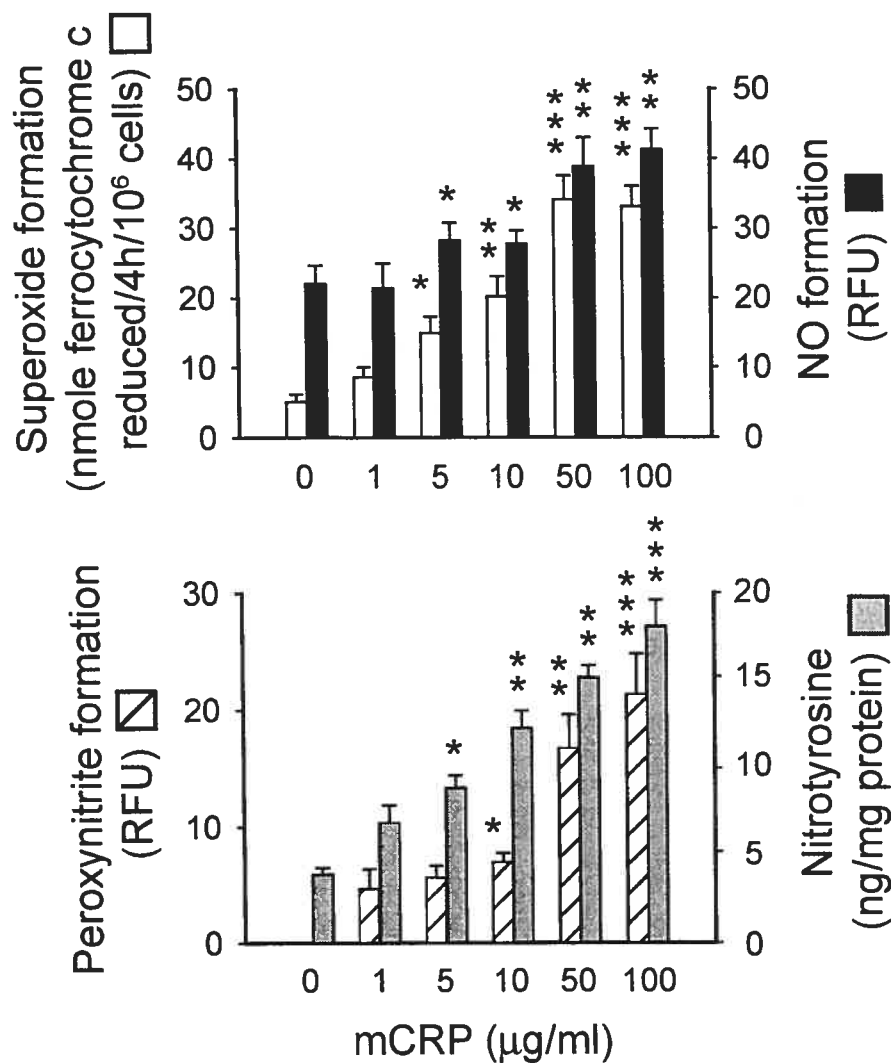


Figure 3. mCRP induces formation of superoxide, NO and ONOO⁻. Neutrophils (5×10^6 cells/mL) were challenged with mCRP at 37°C for 4 h. Intracellular formation of NO was monitored using diaminofluorescein, and is expressed as relative fluorescence units (RFU). Diaminofluorescein fluorescence was reduced 98% by L-NAME (1 mM). Superoxide formation was measured as superoxide dismutase-inhibitable reduction of ferricytochrome c in the culture medium. ONOO⁻ formation was assessed as L-NAME-inhibitable oxidation of DHR 123 to rhodamine, and is expressed as RFU. Values are means \pm SEM (n=4-7). *P<0.05, **P<0.01; ***P<0.001 vs. unstimulated (control).

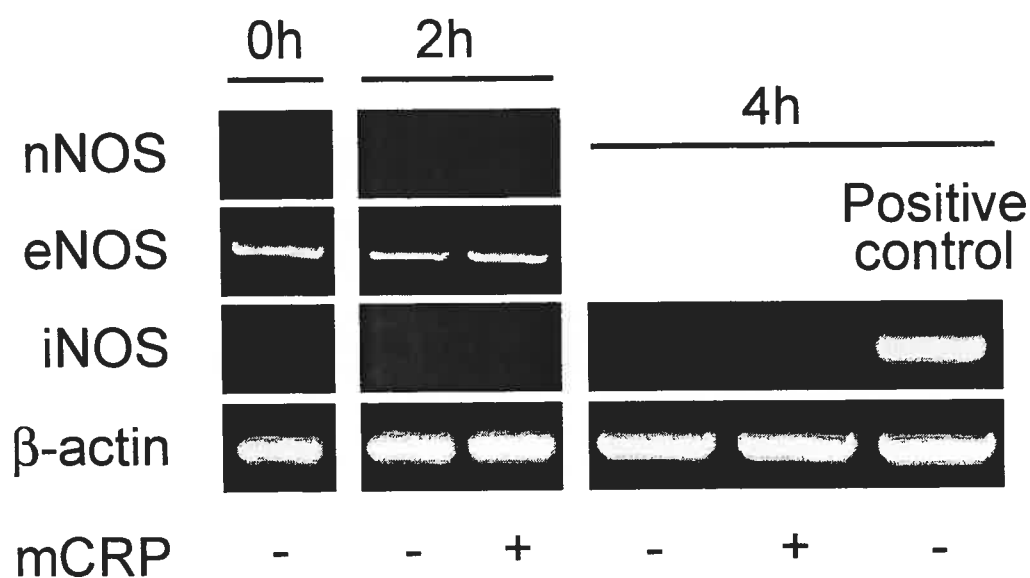
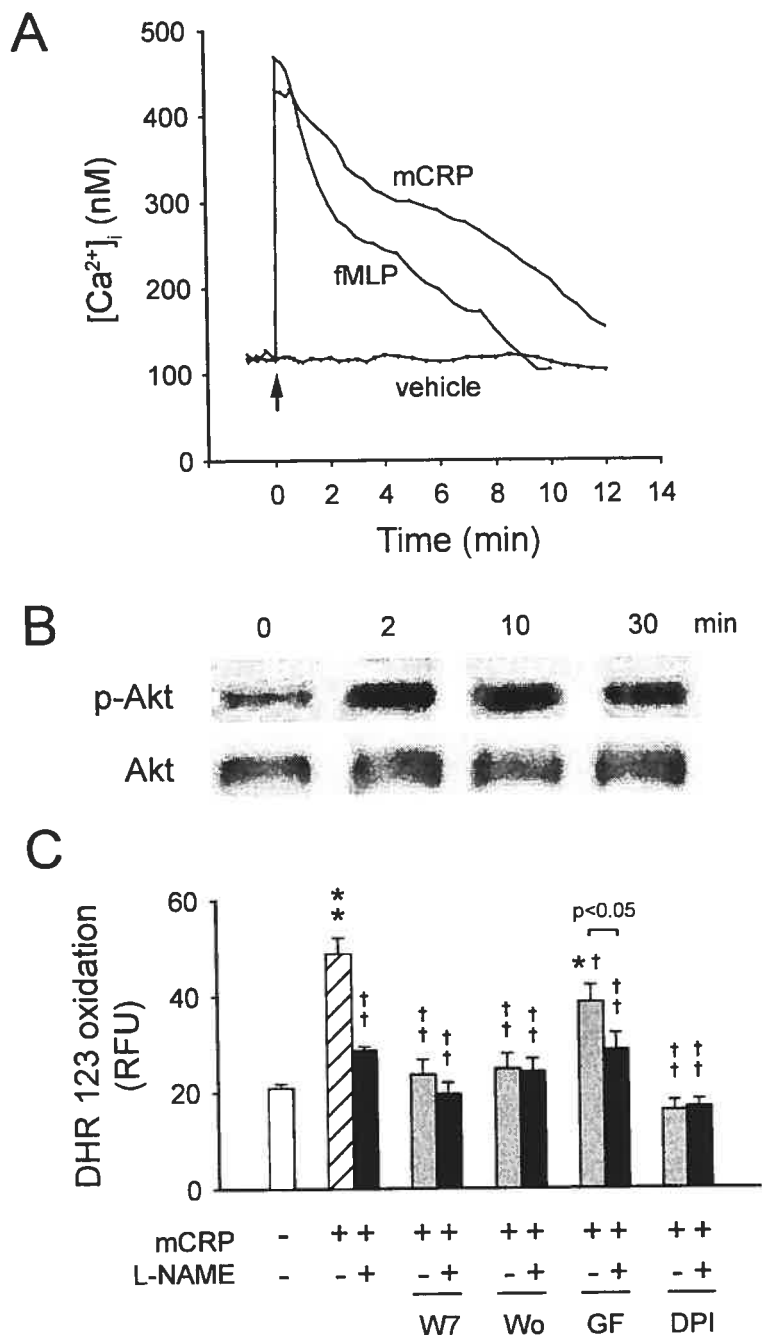


Figure 4. Effect of mCRP on expression of NOS isoforms. Neutrophils incubated without or with mCRP (50 μ g/mL) for 2 and 4 hours, were harvested for RNA preparation. RT-PCR was performed with specific primers for human nNOS, iNOS, eNOS and β -actin. The PCR products were resolved on a 1.2% agarose gel by electrophoresis and stained with ethidium bromide. RNA isolated and amplified from human chondrocytes stimulated with IL-1 β for 4 hours served as a positive control for iNOS. The results are representative for 3 neutrophil preparations.

Figure 5. Involvement of intracellular Ca^{2+} , PKC and phosphatidylinositol 3-kinase in mCRP-induced peroxynitrite formation. (A) Fura-2/AM-loaded neutrophils were challenged with mCRP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or fMLP (10⁻⁶ M). (B) mCRP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)-induced phosphorylation of Akt. The results are representative of four independent experiments. (C) Dihydrorhodamine 123 oxidation by mCRP (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was determined in the absence or presence of L-NAME (1 mM), W7 (20



μM), wortmannin (Wo, 100 nM), GF109203X (GF, 200 nM) or DPI (5 μM) 4 hours post-mCRP, and is expressed as relative fluorescence units (RFU). Values are means \pm SEM (n=5-7). *P<0.05, **P<0.01 vs. unstimulated. † P<0.05; ††P<0.01 vs. mCRP.

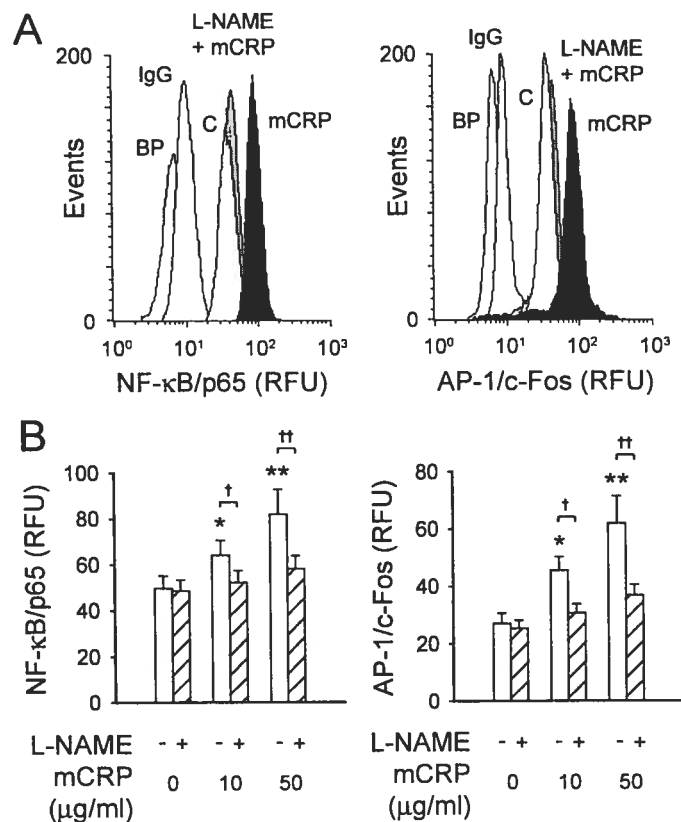


Figure 6. mCRP stimulation of nuclear accumulation of NF- κ B and AP-1, and inhibition with L-NAME. Neutrophils were incubated with mCRP for 30 min in the presence of L-NAME as indicated. Leukocyte nuclei were prepared for immunostaining as described under Methods. (A) Representative fluorescence histograms of singlet nuclei of neutrophils after staining for NF- κ B/p65 (left panel) or c-Fos (right panel). Also shown is the staining of nuclei prepared from neutrophils incubated with vehicle (controls, curves labeled C) and staining with normal rabbit IgG followed by FITC-labeled anti-rabbit IgG antibody (curves labeled IgG). As a negative control, antibodies were incubated for 2 hours with the appropriate blocking peptide (curves labeled BP) before addition to nuclei. (B) Concentration-dependent actions of mCRP. The results are means \pm SEM of 6 experiments with different blood donors. * P <0.05; ** P <0.01 vs. unstimulated. † P <0.05; †† P <0.01.

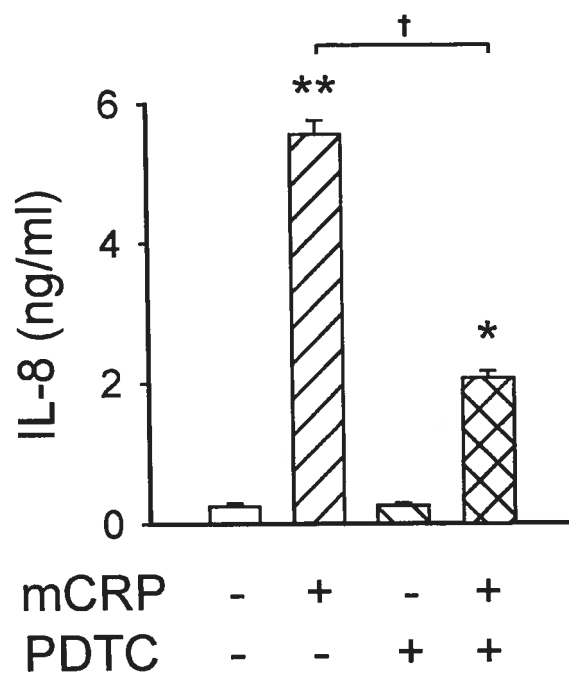
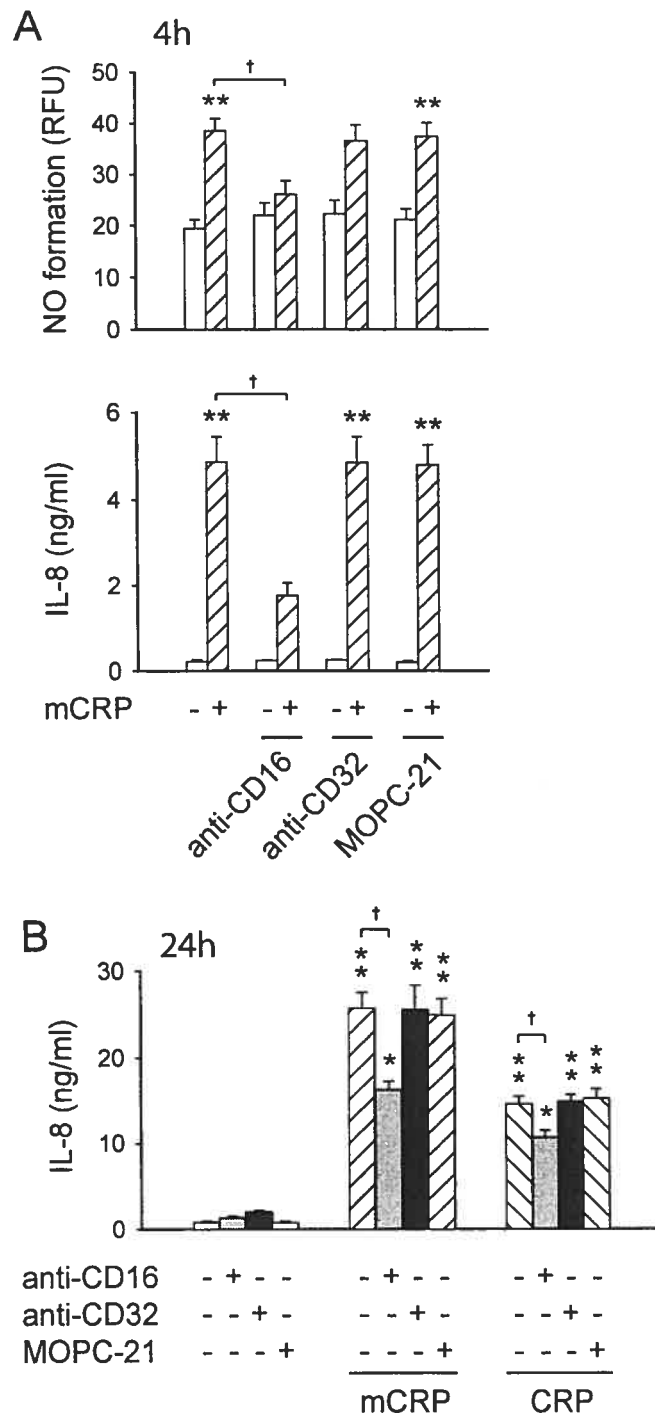


Figure 7. Inhibition of NF- κ B activation suppresses mCRP-induced IL-8 release.

Neutrophils (5×10^6 cells/mL) were pre-incubated with PDTC (100 μ M), and then challenged with mCRP (50 μ g/mL) for 4 hours at 37°C. Values are means \pm SEM (n=4).

*P < 0.05; **P < 0.01 vs. untreated; † P < 0.05.

Figure 8. Involvement of CD16 in mCRP signaling. Neutrophils (5×10^6 cells/mL) were incubated for 10 minutes with function-blocking anti-CD16 antibody, anti-CD32 antibody or irrelevant MOPC-21 antibody (all at $2.5 \mu\text{g/mL}$) and then with mCRP or native CRP ($50 \mu\text{g/mL}$) for 4 hours (A) or 24 hours (B) at 37°C as indicated. Intracellular NO formation was assessed with diaminofluorescein, and is expressed as RFU. Culture medium was assayed for IL-8. Results are means \pm SEM (n=6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. untreated (control). † $P < 0.05$.



CHAPITRE III (Article 3)

Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. (2004) Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood. *Circulation* 110:2713-2720.

(Reproduced with the kind permission of *Circulation*, Journal of THE AMERICAN HEART ASSOCIATION)

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

Tarek Khreiss et Levente Jozsef

Dans ce projet, j'ai travaillé en étroite collaboration avec Levente Jozsef. Ensemble, nous avons mis au point et effectué toutes les expériences décrites dans l'article. De plus, j'ai analysé tous les résultats découlant de cet article et j'ai contribué à la rédaction de l'article.

Dr. Lawrence A. Potempa

Dr. Lawrence A. Potempa nous a gracieusement fourni les différentes formes de la protéine C-réactive et a participé à la caractérisation de la forme modifiée de la protéine C-réactive. De plus, il a participé dans la revue critique du manuscrit.

Dr. Janos G. Filep

Étant mon directeur de recherche, Dr. Janos G. Filep, m'a guidé et m'a supervisé durant toutes les étapes du projet.

INTRODUCTION GÉNÉRALE DU CHAPITRE III

Dans ce présent chapitre, nous avons examiné les effets de la forme pentamérique et de la forme modifiée de la protéine C-réactive sur la cinétique de l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles et de l'aggrégation homotypique des neutrophiles dans le sang total soumis à un stress dû au cisaillement.

Nous avons observé que le cisaillement du sang total induit une augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion P-sélectine sur les plaquettes, à la capture des neutrophiles par les plaquettes et subséquemment à l'aggrégation homotypique des neutrophiles. Les interactions intercellulaires homo-et hétérotypiques dépendaient des molécules d'adhésions P-sélectines, L-sélectine et CD18. La forme native de la protéine C-réactive a significativement atténué la formation de conjugats cellulaires. Par contre, la forme modifiée de la protéine C-réactive a augmenté de façon concentration dépendante l'expression de la P-sélectine induite par le cisaillement et a accru la formation des agrégats plaquettes-neutrophiles et neutrophiles-neutrophiles. Un anticorps anti-P-sélectine avec un anticorps anti-CD18 ont presque totalement inhibé l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles et l'aggrégation des neutrophiles. Les effets de CRP ont été partiellement renversés par l'anticorps anti-CD32 alors que ceux de mCRP ont été partiellement inhibés par l'anticorps anti-CD16. Ces résultats suggèrent que la CRP inhibe l'activation des plaquettes et prévient l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles et l'aggrégation des neutrophiles alors que mCRP possède une activité pro-thrombotique. Ainsi, la forme modifiée plutôt que la forme native de CRP semble contribuer au développement des syndromes coronaires aigus.

Opposing Effects of C-Reactive Protein Isoforms on Shear-induced Neutrophil-Platelet Adhesion and Neutrophil Aggregation in Whole Blood

Tarek Khreiss,* MSc; Levente József,* MSc; Lawrence A. Potempa, PhD; János G. Filep, MD

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital and Department of Medicine,
University of Montreal, Montreal, QC, Canada (T.K., L.J., J.G.F.); Immtech
International, Inc. (L.A.P.), Vernon Hills, IL

First author surname: Khreiss

Short title: CRP Regulation of Neutrophil-Platelet Adhesion

Corresponding author: János G. Filep, MD

Research Center, Maisonneuve-Rosemont Hospital
5415 boulevard de l'Assomption, Montreal, Quebec
Canada H1T 2M4

Phone: (514) 252-3400 ext.4662; Fax: (514) 252-3430

E-mail: [REDACTED]

*T.K. and L.J. contributed equally to this work.

Total word count: 5,696

Subject Codes: [3], [172], [92], [134], [178], [137]

ABSTRACT

Background – Plasma C-reactive protein (CRP) level is a powerful predictor of cardiovascular events. However, it is not known whether CRP could affect neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation, key events in acute coronary syndromes. Emerging in vitro evidence suggests that some bioactivities of CRP are expressed upon loss of the pentameric symmetry, resulting in formation of modified or monomeric CRP (mCRP).

Methods and Results – We studied the impact of human native CRP and bioengineered mCRP that cannot rearrange into the pentameric structure on the kinetics of neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood subjected to shear ($\sim 100 \text{ s}^{-1}$) using real-time flow cytometry. Shear resulted in upregulation of platelet P-selectin expression, leading to platelet capture of neutrophils and subsequent neutrophil aggregation, which was dependent on P-selectin, L-selectin and CD18. Native CRP at clinically relevant concentrations markedly attenuated these changes. The residual amount of neutrophil adhesion was blocked with anti-CD18 or anti-CD11b antibody. By contrast, mCRP concentration-dependently enhanced shear-induced platelet P-selectin expression, increased the rate and extent of formation of both neutrophil-platelet and neutrophil-neutrophil aggregates. Complete abrogation of platelet-neutrophil adhesion and neutrophil aggregation required both anti-P-selectin and anti-CD18 antibodies, but not anti-L-selectin antibody. The CRP action was markedly inhibited by an anti-CD32 antibody, whereas the mCRP effects were significantly attenuated by an anti-CD16 antibody.

Conclusions – These results indicate that native CRP inhibits platelet activation and prevents platelet capture of neutrophils, whereas mCRP displays potent prothrombotic

activities under low levels of shear. Thus, mCRP rather than native CRP may precipitate acute coronary syndromes.

Key words: neutrophils; platelets; cell adhesion molecules; inflammation; heart disease

Condensed Abstract: We investigated the impact of native C-reactive protein (CRP) and structurally modified/monomeric CRP (mCRP) on platelet activation, platelet capture of neutrophils and neutrophil aggregation in human whole blood subjected to shear. Native CRP attenuated shear-induced upregulation of platelet P-selectin expression, leading to inhibition of platelet-neutrophil adhesion and neutrophil aggregation. By contrast, mCRP enhanced platelet P-selectin expression, increased the rate and extent of P-selectin and β_2 -integrin-dependent neutrophil-platelet and neutrophil-neutrophil adhesion. These results indicate that the prothrombotic and proinflammatory actions of mCRP rather than the anti-platelet/antithrombotic actions of native CRP may contribute to acute coronary syndromes.

INTRODUCTION

In recent years, C-reactive protein (CRP), long associated with inflammation, has emerged as a clinical marker for future acute coronary syndromes (ACS) among apparently healthy subjects and patients with stable or unstable angina.¹⁻³ In addition to platelets,⁴ neutrophil granulocytes may also play a role in myocardial injury.^{5,6} In patients with ACS, elevated plasma levels of myeloperoxidase, presumably released from neutrophils, predict an increased risk for subsequent cardiac events independently of plasma CRP levels.⁷ Enhanced neutrophil-platelet adhesion has been detected in patients with unstable angina,⁸⁻¹⁰ and after coronary angioplasty.¹¹ Occurrence of neutrophil-platelet aggregates in the peripheral blood correlates with disease activity.⁹ Neutrophil-platelet interaction links inflammation and thrombosis, and may exacerbate vascular occlusion and ischemia.^{8,12} However, it is still unknown whether CRP could directly affect the formation of neutrophil-platelet aggregates, although this information would be critical to determine whether CRP is solely a risk marker for or is also an actual mediator of ACS.

The role of CRP as a modulator of inflammation and thrombosis remains elusive, as it possesses both pro- and anti-inflammatory actions.^{5,13-18} For instance, CRP inhibits neutrophil activation and adhesion,^{16,19} blocks platelet aggregation in vitro,²⁰⁻²² whereas arterial injury in CRP-transgenic mice is associated with increased thrombosis.²³ To explain these apparently contradictory actions, it has been proposed that distinct isoforms of CRP are formed during inflammation. CRP could dissociate into individual subunits that undergo conformational changes. The resulting CRP isoforms, referred to as modified or monomeric CRP (mCRP), express several neoepitopes and display properties

distinct from those of native CRP.²⁴⁻²⁶ mCRP antigens were detected in inflamed tissues and in the wall of human normal blood vessels.²⁷

In the present study, we investigated the impact of native CRP and mCRP on the dynamics and molecular constituents that support neutrophil-platelet and neutrophil-neutrophil aggregates in human whole blood using real-time flow cytometry. Our results indicate that native CRP inhibits, whereas mCRP accelerates hydrodynamic shear-induced platelet-neutrophil adhesion, and subsequently neutrophil aggregation.

METHODS

CRP Isoforms

High purity (>99%) human native CRP (Calbiochem) was stored in a NaN₃-free 20 mmol/L TRIS, 150 mmol/L NaCl buffer (pH 7.5) containing 2 mmol/L CaCl₂ to prevent spontaneous formation of mCRP from the native pentamer. A recombinant form of mCRP (rm-CRP, purity: >97%) that cannot rearrange into a pentameric structure was engineered and characterized as described.²⁵ Native CRP was distinguished from mCRP by binding and antigenicity differences²⁴ and by their secondary structure.²⁵ The endotoxin level of all peptide solutions was below the detection limit (0.125 EU/ml corresponding to ~0.01 ng/mL LPS) of the *Limulus* assay (Sigma).

Detection of Neutrophil-Platelet Conjugates by Flow Cytometry

Venous blood (10 mL, anticoagulated with sodium heparin, 50 units/mL) was obtained from healthy non-smoking volunteers (male and female, 23 to 55 years; leukocyte count, 3,800 to 8,800/ μ L; platelet count, 169,000 to 355,000/ μ L), who had denied taking any medication for at least two weeks. The Clinical Research Committee approved the

experimental protocols. Blood was kept at 20°C and used within 2 hours of collection. Two hour storage of blood resulted in $17\pm 6\%$ increases in neutrophil CD11b/CD18 expression without increasing platelet P-selectin expression (7.9 ± 1.0 vs 8.4 ± 0.7 relative fluorescence units (RFU) detected immediately after blood collection, $n=4$). To circumvent the possible confounding effects of this slight neutrophil activation, the order of measurements within each experiment was randomized. Blood obtained from the same persons (at different times) was used to study both CRP and mCRP.

Formation of neutrophil aggregates and neutrophil-platelet conjugates was monitored real-time in accordance with the technique of Konstantopoulos et al.²⁸ with modifications. In brief, blood (100 μ L) was diluted 1:6 with HEPES buffer (in mmol/L: NaCl, 110; KCl, 10; MgCl₂, 1; glucose, 10; HEPES, 30; pH 7.4) in polypropylene cytometry tubes (Becton Dickinson). This dilution was chosen to enable flow cytometric measurements of neutrophil adhesive events, eliminating the coincident detection arising from the >1000-fold excess of erythrocytes and platelets. Platelets were labeled with an anti-CD61-FITC monoclonal antibody (mAb) (1 μ g/mL, PharMingen) for 10 min at 20°C, followed by staining of leukocytes with LDS-751 (10 μ g/mL, Molecular Probes) for 5 min at 37°C. LDS-751 is a vital nucleic acid that stains leukocytes, but not platelets or erythrocytes. In some experiments, blood samples were preincubated for 10 min with function-blocking anti-L-selectin mAb Dreg-56 (20 μ g/mL, PharMingen), anti-CD18 mAb L-130 (15 μ g/mL, BD Biosciences), anti-CD11b mAb ICRF44 (20 μ g/mL, PharMingen), anti-P-selectin mAb P8G6 (30 μ g/mL, Chemicon) or irrelevant antibody MOPC-21 (30 μ g/mL, BD PharMingen) in the absence or presence of native CRP or mCRP (both at 25 μ g/mL). In additional experiments, the responses to CRP and mCRP

were studied in the presence of function-blocking anti-CD16 mAb 3G8 or anti-CD32 mAb FLI-8.26 (both at $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$, PharMingen). Shear was then initiated with a teflon-coated magnetic bar ($2 \times 7 \text{ mm}$, rotating at 700 rpm) in a Payton aggregometer at 37°C . The average shear rate, which is proportional to the rotation rate of the bar, was estimated at $\sim 100 \text{ s}^{-1}$. However, much higher shear rates (up to 3000 s^{-1}) are present at the surface of the rotating bar.²⁹

Samples were injected directly into a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson) before initiating shear (time 0) and at the indicated times during shear. The instrument was calibrated with CaliBRITE beads and the FACSCComp software (Becton Dickinson). Dual-color fluorescence was analyzed with the CellQuestPro software. A fluorescence threshold was set to detect cells that stained positive with LDS-751, thus excluding erythrocytes and unbound single platelets from the display. 2000 events were acquired at each time point. Neutrophils were gated by their characteristic forward and side-scatter profiles. Neutrophil-platelet conjugates were defined as particles that expressed CD61-FITC fluorescence above the background level (Figure 1A). Neutrophil-platelet adhesion was quantitated as the percentage of neutrophils that were bound to platelets. The mean FL1 fluorescence intensity of single neutrophils with adherent platelets (Figure 1A) was quantitated by gating this population on the basis of LDS-751 fluorescence. Neutrophil conjugates defined as particles that expressed LDS-751 fluorescence levels greater than those of single neutrophils with or without bound platelets (Figure 1A) were quantitated based on the LDS-751 staining, where mean fluorescence intensity was an integral multiple of the singlet neutrophil fluorescence value (Figure 1B). The ratio of neutrophils in aggregates to the total number of neutrophils was calculated using the formula: % Aggregation =

$(2D+3T+4Q^+) \div (S+2D+3T+4Q^+)$, where S represents singlet neutrophils, and the neutrophil aggregate sizes are given as D (doublets), T (triplets), and Q^+ (quartets and larger unresolved neutrophil aggregates).³⁰

Platelet P-selectin Expression

For detection of P-selectin expression, shear was initiated in diluted blood samples in which leukocytes were not stained. At the indicated times, 5 μ L aliquots were removed and incubated with R-phycoerythrin-conjugated anti-P-selectin mAb CRC81 (Caltag Laboratories) for 3 min at 37°C. Samples were then diluted 1:1000 with HEPES buffer and analyzed by flow cytometry. 10,000 events were acquired per sample.

Statistical Analysis

Results are presented as mean \pm SEM. Statistical comparisons were made by analysis of variance using ranks (Kruskal-Wallis test) followed by Dunn's multiple contrast hypothesis test to identify differences between various treatments or by the Mann-Whitney U test for unpaired observations. Values of $P < 0.05$ were considered significant for all tests.

RESULTS

Native CRP Attenuates, whereas mCRP Accelerates Hydrodynamic Shear-induced Formation of Neutrophil-Platelet Aggregates

Consistent with previous reports,²⁸⁻³¹ 29±3% of neutrophils were adhered to platelets in diluted whole blood before applying shear, whereas neutrophil homotypic adherence was <2% (Figure 2). Platelet adhesion to neutrophils and neutrophil aggregation increased rapidly on applying shear, reaching a plateau at ~10 minutes (Figure 2). At 14 minutes, 82±4% of neutrophils had platelets adherent to their surface, and 54±3% of neutrophils were in aggregates of ≥2 cells (Figure 2B, C). No changes were detected in the absence of shear (Figure 2B, C).

Preincubation of blood samples for 5 minutes with native CRP produced decreases in neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation at all time points under shear without affecting the kinetics of adherence (Figure 2A, B, C). The CRP inhibition was concentration-dependent; statistically significant inhibition was detected even with 1 to 5 µg/mL, which peaked at 25 µg/mL (Figure 2D, E). CRP effectively inhibited the adhesive events even when it was added on initiation of shear, although the degree of inhibition was somewhat lower than that detected following preincubation with CRP (data not shown). Heat inactivation of CRP (30 minutes at 100°C) resulted in a complete loss of its activity (data not shown). Since preincubation of unsheared blood with mCRP for 10 minutes already produced detectable increases in cell adherence; mCRP was added to blood on applying shear. mCRP (25 µg/mL) enhanced the rate and extent of formation of neutrophil-platelet and neutrophil-neutrophil conjugates (Figure 2B, C). Platelet adhesion to neutrophils reached a plateau at ~5 min (Figure 2B). At 14

minutes shear mixing, the number of neutrophils that had platelets adherent to their surface ($95\pm 1\%$) or that were in aggregates of ≥ 2 cells ($78\pm 2\%$) were significantly ($P < 0.01$) higher than those subjected to shear only. The mCRP actions were concentration-dependent; statistically significant potentiation was detected with $1 \mu\text{g/mL}$, which peaked at $25 \mu\text{g/mL}$ (Figure 2D, E). Addition of LPS (*E. coli* serotype O111:B4, 0.02 ng/mL ; a concentration ~ 2 -fold higher than the maximum level of LPS detected in our peptide solutions) did not affect shear-induced platelet- neutrophil or neutrophil- neutrophil adherence. For instance, at 14 minutes of shear, $89\pm 2\%$ and $90\pm 3\%$ of neutrophils were adhered to platelets, and $48\pm 3\%$ and $49\pm 5\%$ of neutrophils were in aggregates in the absence and presence of LPS, respectively, $n=5$, $P > 0.1$.

Opposing Effects of Native CRP and mCRP on Hemodynamic Shear-induced Expression of Platelet P-selectin

Both platelet P-selectin expression and the number of platelet bound to neutrophils increased with time of shear, as evidenced by the 1.7-fold increase in P-selectin fluorescence and the 4-fold increase in platelet CD61-FITC fluorescence of single neutrophils that were bound to platelets, respectively, after 14 minutes shear (Figure 3).

Preincubation of blood samples with native CRP concentration-dependently attenuated these events, indicating inhibition of platelet activation and adherence (Figure 3).

Statistically significant inhibition was detected with $5 \mu\text{g/mL}$ CRP. In presence of $25 \mu\text{g/mL}$ CRP, P-selectin expression after 14 minutes of shear did not differ from that of unsheared (time 0) platelets (Figure 3B). By contrast, mCRP concentration-dependently increased the rate and extent of CD62P expression, and augmented CD61-FITC fluorescence intensity associated with neutrophil-bound platelets (Figure 3B, D).

Statistically significant increase was detected with 5 $\mu\text{g/mL}$ mCRP; which peaked at 25 $\mu\text{g/mL}$.

Dependence of Homotypic and Heterotypic Neutrophil Adhesion on Selectins and $\beta 2$ -Integrins

To assess the contribution of multiple adhesion molecules to neutrophil-platelet and neutrophil-neutrophil adhesion in sheared suspensions,²⁸⁻³⁰ we used function-blocking mAbs. Anti-P-selectin mAb decreased the rate of adhesive interactions, resulting in $\sim 30\%$ inhibition of neutrophil-platelet adhesion and $\sim 55\%$ inhibition of neutrophil-neutrophil conjugates after 14 minutes of shear (Figure 4). Blocking either CD18 or L-selectin alone did not significantly decrease either neutrophil-platelet or neutrophil-neutrophil adhesion (Figure 4). However, a combination of anti-P-selectin and anti-L-selectin mAbs resulted in 64% inhibition of neutrophil-platelet adhesion after 14 minutes shear (Figure 4). Simultaneous blockade of P-selectin and CD18 almost completely inhibited neutrophil-platelet adhesion and reduced neutrophil aggregation by $\sim 73\%$ (Figure 4).

In CRP-treated blood samples, P-selectin blockade produced only slight decreases, whereas simultaneous P-selectin and CD-18 blockade resulted in significant decreases in cell-cell interactions as compared with those of native CRP alone (Figure 4). L-selectin blockade was without effect. A combination of native CRP with anti-P-selectin and anti-CD18 mAbs yielded almost complete blockade of neutrophil-platelet adhesion and inhibited neutrophil homotypic adhesion by $\sim 75\%$ after 14 minutes of shear (Figure 4).

The mCRP-accelerated neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation were significantly reduced at all time points under shear in the presence of anti-P-selectin

mAb, whereas neither anti-L-selectin nor anti-CD18 mAb alone produced significant inhibition (Figure 4). A combination of anti-P-selectin mAb and anti-L-selectin mAb did not result in significantly greater inhibition than that observed with anti-P-selectin mAb alone (Figure 4). A combination of anti-P-selectin and anti-CD18 mAbs inhibited neutrophil-platelet adhesion by ~94% and neutrophil aggregation by ~81% after 14 min shear (Figure 4).

Blocking Mac-1 with anti-CD11b mAb alone did not yield significant inhibition (Figure 5). However, a combination of anti-P-selectin and anti-Mac-1 mAbs was as effective as anti-P-selectin plus anti-CD18 mAbs in blocking platelet-neutrophil and neutrophil-neutrophil adhesion (Figure 5).

Involvement of CD16 and CD32 in Native CRP and mCRP Signaling

We used function-blocking mAbs to CD16 (FcγRIII) and CD32 (FcγRIIa) as competitors to determine the IgG receptor subtype mediating the actions of mCRP and CRP, respectively.^{25,32,33} None of these antibodies by themselves affected significantly the parameters studied (Figure 6). The anti-CD32 mAb effectively, though never completely, prevented the inhibitory action of CRP on shear-induced neutrophil-platelet adhesion, neutrophil aggregation, CD61-FITC fluorescence of single neutrophils and platelet P-selectin expression, whereas the anti-CD16 mAb was without detectable effects (Figure 6). Conversely, the anti-CD16 mAb, but not the anti-CD32 mAb, significantly, though never completely, attenuated the effects of mCRP (Figure 6). The irrelevant antibody MOPC-21 had no detectable effects on the responses to either CRP or mCRP (data not shown).

DISCUSSION

Numerous epidemiological studies have shown that plasma CRP level is a powerful predictor of future cardiovascular diseases.¹⁻³ However, the pathophysiological importance of CRP is far from being fully understood. The present study provides evidence for a dual role of CRP isoforms in the regulation of shear-induced platelet adherence to neutrophils and neutrophil aggregation, critical events underlying ACS. We report that native CRP suppresses, whereas mCRP significantly enhances the dynamics and extent of these adhesive interactions.

We used a flow cytometry assay to monitor real-time transition of platelets from the 'resting' to activated state, and to study the dynamics of platelet adhesion to neutrophils and formation of neutrophil aggregates,^{28,30} as may occur in the circulating blood of patients with ACS. Apparently more neutrophils are adhered to platelets in diluted heparinized blood (as reported by previous²⁸⁻³¹ and the present studies) than in blood collected into EDTA and formaldehyde.³⁴ These discordant results might be attributed to differences in blood collection and handling, rather than to a significant platelet activation, for we detected low levels of platelet P-selectin expression in unsheared samples. Shear mixing of diluted blood samples evokes negligible platelet aggregation,²⁸ thereby eliminating the possibility of passive neutrophil entrapment in platelet aggregates. Low level of hydrodynamic shear induces platelet activation, as evidenced by enhanced P-selectin expression. Likely mechanisms for platelet activation may involve hemolysis and release of ADP;^{28,35} contact with foreign surfaces and altered O₂ levels may function as additional signals. Activated platelets then bind to neutrophils, and this heterotypic cell interaction is a prerequisite for neutrophil aggregation.²⁸ Our results show that native CRP concentration-dependently attenuated upregulation of P-

selectin, and consequently platelet adhesion to neutrophils and neutrophil aggregation. The inhibition was detectable at CRP levels of 1 to 5 $\mu\text{g/mL}$ that are useful for predicting cardiovascular risk.^{2,3} Native CRP failed to affect the percentage of neutrophils that were bound to platelets, although it reduced neutrophil-associated platelet CD61-FITC fluorescence, indicating decreases in the number of platelets attached to single neutrophils. Flow cytometry did not allow determination of the number of platelet bound per neutrophil, and assessment whether platelets might have attached to neutrophils as single cells or small aggregates. Electron microscopy studies showed that most of the neutrophils were adherent to at least 2 platelets and that platelets either formed bridges between neutrophils or attached to a periphery away from the neutrophil-neutrophil contact region.²⁸ These observations support the notion that critical numbers of bound platelets (>2) may be required to induce neutrophil activation.²⁸ The CRP inhibition of P-selectin expression is consistent with its inhibitory action on platelet reactivity in response to various agonists, including ADP.²⁰⁻²² These findings raise the possibility that increased thrombus formation after arterial injury in human CRP-transgenic mice²³ or left ventricular thrombus formation in patients with myocardial infarction³⁶ could be attributed to distinct isoforms of CRP, perhaps directly derived from CRP, rather than to native CRP itself.

Native, pentameric CRP dissociates into free subunits after binding to plasma membranes,³⁷ or in a denaturing or oxidative environment,²⁴ yielding mCRP. This is accompanied by a loss of predominantly β -sheet secondary structure with an increase in α -helix,²⁵ and expression of neoepitopes and distinct biological activities.²⁴⁻²⁷ Our study revealed that mCRP, unlike native CRP, induced P-selectin expression and enhanced the dynamics and extent of neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation during

shear. Oxidized or heat-aggregated (i.e. structurally modified) CRP have previously been reported to induce human platelet activation and aggregation in platelet-rich plasma *in vitro*.^{22,38} Of note, endotoxin levels in our CRP preparations were lower than the median plasma endotoxin value in a random population of men and women.³⁹ However, neither LPS (at a concentration 2-fold higher than that might be present in our protein preparations) nor heat inactivated CRP evoked detectable effects, indicating that CRP or mCRP signalling was responsible for the observed effects.

Platelet-neutrophil adhesion is modelled as a multiple step process.^{29,40} Platelet P-selectin binding to PSGL-1 on neutrophils mediates initial tethering followed by their firm adhesion dependent on CD11b/CD18 (Mac-1) binding to GPIIb/IIIa⁴¹ and/or junctional adhesion molecule-3.⁴² In agreement with previous reports,^{28,40} we also found that P-selectin is crucial for platelet capture of neutrophil, and only combined P-selectin and CD18 or Mac-1 blockade resulted in almost complete abrogation of neutrophil-platelet adhesion under shear. L-selectin is also involved in this interaction, because a combination of anti-L-selectin and anti-P-selectin mAbs was more effective at blocking platelet adhesion than anti-P-selectin antibody alone. In presence of native CRP, anti-P-selectin mAb did not produce a significant additive inhibition, indicating that prevention of P-selectin expression or interference with P-selectin binding by native CRP was critical for inhibition of subsequent cell-cell adhesion. In presence of mCRP, antibody blocking also revealed the involvement of P-selectin and Mac-1 in adhesive interactions. Anti-L-selectin mAb produced little or no further inhibition of native CRP or mCRP responses, consistent with CRP and mCRP-induced L-selectin shedding from neutrophils.^{16,26} Unlike native CRP, mCRP can directly upregulate neutrophil CD11b/CD18 expression.²⁶ This action might have contributed to the enhanced formation of neutrophil aggregates,

because CD18 blockade resulted in significantly higher decreases in the number of neutrophil aggregates in blood subjected to shear in the presence than absence of mCRP. It should be noted that adhesion molecules that mediate neutrophil adhesion to immobilized platelets under higher shear levels may differ from those observed in the present study.

Our results point toward the involvement of different Fc γ receptors in native CRP and mCRP signaling. Thus, the actions of native CRP appears to be predominantly mediated through the low affinity IgG Fc γ RIIa (CD32), whereas the actions of mCRP are predominantly mediated via the low affinity immune complex binding IgG receptor Fc γ RIIIb (CD16). These observations are consistent with previous studies identifying CD32 as the primary binding site for native CRP on leukocytes,^{32,33} and with functional studies on mCRP suppression of neutrophil apoptosis.²⁵ However, the anti-CD16 mAb did not produce complete reversal of the mCRP actions, raising the possibility that mCRP might activate other yet unidentified cell surface receptor(s), as suggested by studies on the mCRP activation of endothelial cells.⁴³ Clearly, additional studies on isolated cells are needed to identify the additional binding site(s).

Limitations of this study are that the mechanisms regulating mCRP formation from native CRP in vivo and the relevance of a soluble form of mCRP compared to the low-solubility, tissue-associated form²⁷ are still unknown. It is unknown whether CRP produced locally in the vessel wall⁴⁴ could be responsible for mCRP that is naturally expressed in the intima.²⁷ An endothelial injury may result in exposure of mCRP to blood components, leading to platelet activation and platelet-neutrophil interactions as described here and elsewhere.^{25,26} Alternatively, inflammation may lead to de novo formation of mCRP from native CRP within the blood stream, thereby linking thrombosis and

inflammation, two of the key events in ACS and recurrent disease after coronary angioplasty.^{9,11} Such actions of mCRP could be aggravated when normal endothelial homeostatic mechanisms, such as nitric oxide and prostacyclin, are compromised. A limitation of flow cytometry analysis is that the neutrophil gate is set using unshed blood and cannot be readjusted during the kinetic measurements. Some monocytes might have been 'trapped' in this gate as shear may also promote formation of neutrophil-monocyte conjugates (with or without platelets),³⁴ and might have been mistakenly counted as 'neutrophils'. However, considering the ratio of monocytes and neutrophils in normal blood, it is unlikely that this might have had a significant influence on the results.

In summary, our data indicates that while native CRP at clinically relevant concentrations inhibits platelet activation and prevents platelet capture of neutrophils; conformationally altered forms of CRP such as mCRP display potent prothrombotic and proinflammatory activities under low level of shear. Thus, native CRP and mCRP play an opposite role in the regulation of platelet activation and subsequent neutrophil-platelet and neutrophil-neutrophil adhesion, which occur in thrombotic and inflammatory disorders.

Acknowledgments

This work was supported by grants (MOP-64283) from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Heart and Stroke Foundation of Quebec (to J.G.F.). T.K. and L.J. are recipients of Doctoral Research Awards from the CIHR.

REFERENCES

1. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina. *N Engl J Med.* 1994;331:417-424.
2. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, et al. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 1997;336:973-976.
3. Ridker PM, Buring JE, Shih J, et al. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation.* 1998;98:731-733.
4. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105:1135-1143.
5. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340:448-454.
6. Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, et al. Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med.* 2002;347:5-12.
7. Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation.* 2003;108:1440-1445.
8. Entman ML, Ballantyne CM. Association of neutrophil with platelet aggregates in unstable angina: should we alter therapy? *Circulation.* 1996;94:1206-1208
9. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, et al. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation.* 1996;94:1239-1246.

10. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, et al. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*. 1997;95:2387-2394.
11. Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, et al. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:345-353.
12. Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation*. 2001;103:1718-1720.
13. Mortensen RF. C-reactive protein, inflammation, and innate immunity. *Immunol Res*. 2001;20:163-176.
14. Griselli M, Herbert J, Hutchinson WL., et al. C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med*. 1999;190:1733-1739.
15. Gershov D, Kim SJ, Brot N, et al. C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from the assembly of the terminal complement components, and sustains an anti-inflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2000;192:1353-1364.
16. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, et al. Prevention of in vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest*. 1997;100:522-529.
17. Xia D, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein (CRP) are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:2575-2580.
18. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ETH. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2001;103:2531-2534.

19. Heuertz RM, Webster RO. Role of C-reactive protein in acute lung injury. *Mol Med Today* 1997;3:539-545.
20. Fiedel BA, Gewurz H. Effects of C-reactive protein on platelet function. II. Inhibition by CRP of platelet reactivities stimulated by poly-L-lysine, ADP, epinephrine, and collagen. *J Immunol.* 1976;117:1073-1078.
21. Vigo C. Effect of C-reactive protein on platelet-activating factor-induced platelet aggregation and membrane stabilization. *J Biol Chem.* 1985;260:3418-3422.
22. Miyazawa K, Kiyono S, Inoue K. Modulation of stimulus-dependent human platelet activation by C-reactive protein modified with active oxygen species. *J Immunol.* 1988;141:570-574.
23. Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminatham RS, et al. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation.* 2003;108:512-515.
24. Potempa LA, Siegel NJ, Fiedel BA, et al. Expression, detection and assay of neoantigen (neo-CRP) associated with a free C-reactive protein subunit. *Mol Immunol.* 1987;24:531-541.
25. Khreiss T, József L, Hossain S, et al. Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *J Biol Chem.* 2002;277:40775-40781.
26. Zouki C, Haas B, Chan JSD, et al. Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with promotion of neutrophil-endothelial cell adhesion. *J Immunol.* 2001;167:5355-5361.

27. Diehl EE, Haines GK, Radosevich JA, et al. Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue. *Am J Med Sci.* 2000;319:77-83.
28. Konstantopoulos K, Neelamegham S, Burns AR, et al. Venous level of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and β_2 -integrin. *Circulation* 1998;98:873-882.
29. Taylor AD, Neelamegham S, Hellums JD, et al. Molecular dynamics of the transition from L-selectin to β_2 -integrin-dependent neutrophil adhesion under defined hydrodynamic shear. *Biophys J.* 1996;71:3488-3500.
30. Simon SI, Burns AR, Taylor AD, et al. L-selectin (CD62L) cross-linking signals neutrophil adhesive functions via Mac-1 (CD11b/CD18) β_2 -integrin. *J Immunol.* 1995;155:1502-1514.
31. Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, et al. Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood* 1991;78:1730-1737.
32. Bharadvaj D, Stein MP, Volzer M, et al. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fc γ receptor type II. *J Exp Med.* 1999;190:585-590.
33. Stein MP, Edberg JC, Kimberly RP, et al. C-reactive protein binding to Fc γ RIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific. *J Clin Invest.* 2001;105:369-376.
34. Hagberg IA, Lyberg T. Evaluation of circulating platelet-leukocyte conjugates: a sensitive flow cytometric assay well suited for clinical studies. *Platelets.* 2000;11:151-160.
35. Alkhamis TM, Beissinger RL, Chediak JR. Artificial surface effect on red blood cells and platelets in laminar shear flow. *Blood.* 1990;75:1568-1575.

36. Anzai T, Yoshikawa T, Kaneko H, et al. Association between serum C-reactive protein elevation and left ventricular thrombus formation after first anterior myocardial infarction. *Chest*. 2004;125:384-389.
37. Wang HW, Sui SF. Dissociation and subunit rearrangement of membrane-bound human C-reactive protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288:75-79.
38. Fiedel BA. Platelet agonist synergism by the acute-phase reactant C-reactive protein. *Blood*. 1985;65:264-269.
39. Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, et al. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34:1975-1981.
40. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, et al. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood*. 1996;88:146-157.
41. Simon DI, Chen Z, Xu H, et al. Platelet glycoprotein Iba is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med*. 2000;192:193-204.
42. Santoso S, Sachs UJH, Kroll H, et al. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med*. 2002;196:679-691.
43. Khreiss T, József I, Potempa LA, et al. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation*. 2004;109:2016-2022.

44. Calabró P, Willerson JT, Yeh ETH. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*. 2003;108:1930-1932.

FIGURES-LEGENDS

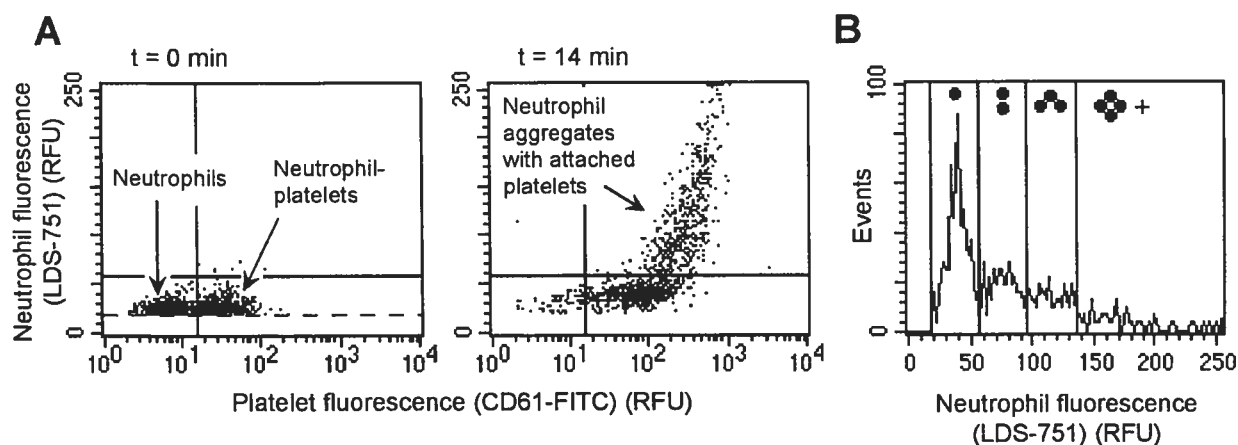


Figure 1. Real-time flow cytometry analysis of neutrophil-platelet and neutrophil-neutrophil aggregates. Whole blood was diluted 1:6 with HEPES buffer. Platelets were labeled with an anti-CD61-FITC mAb followed by staining leukocytes with LDS-751. (A) Control (unsheared) blood sample at 0 minute showing single neutrophils with and without platelets. An LDS-751 fluorescence threshold (dashed line) was set to exclude unbound erythrocytes and single platelets from the display. The sample was then subjected to hydrodynamic shear ($\sim 100 \text{ s}^{-1}$) at 37°C for 14 minutes. The vertical line (FITC-fluorescence threshold) separates single neutrophils (left) from neutrophils bound to platelet(s) (right). The horizontal line separates single neutrophils from neutrophil aggregates. (B) Representative histogram of neutrophil aggregation after 14 minutes of shear. LDS-751 mean fluorescence values for neutrophil doublets (D), triplets (T) and quartets and larger aggregates (Q^+) are integral multiples of the singlet (S) value. RFU, relative fluorescence units.

Figure 2. Kinetics of neutrophil-platelet and neutrophil aggregate formation and its modulation by CRP isoforms. Platelets were labeled with CD61-FITC, followed by staining leukocytes with LDS-751.

Diluted blood samples were

subjected to hydrodynamic shear ($\sim 100 \text{ s}^{-1}$). At the

indicated time points, samples

were injected directly into a

FACScan flow cytometer. (A)

Representative scatter plots of real-time detection of

neutrophil-platelet adhesion

kinetics in the absence or presence of native CRP or mCRP ($25 \mu\text{g/mL}$). Time course of

neutrophil-platelet adhesion (B) and neutrophil aggregates (C) in the presence of CRP or

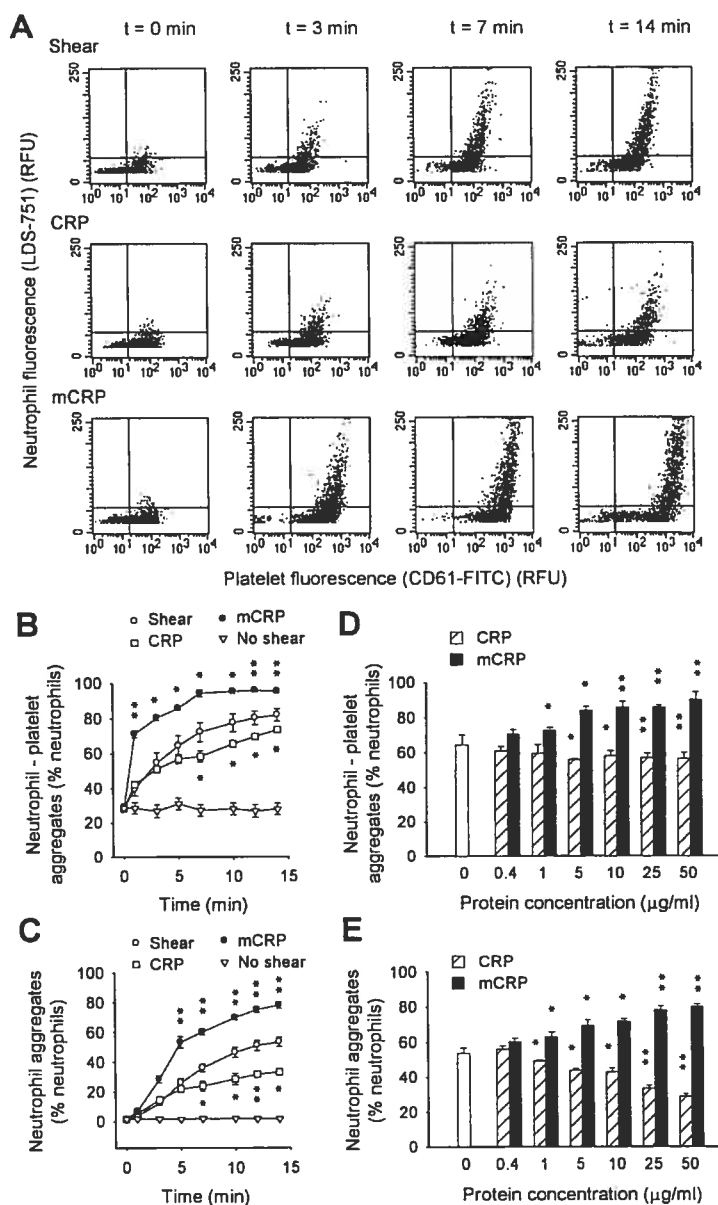
mCRP ($25 \mu\text{g/mL}$). Concentration-dependent actions of CRP and mCRP on neutrophil-

platelet (D) and neutrophil aggregates (E) as assessed after 5 minutes of shear (when the

mCRP effect reached plateau) and 14 minutes of shear, respectively. Values are the

mean \pm SEM for 4 to 8 experiments using blood from different donors. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

vs. shear alone.



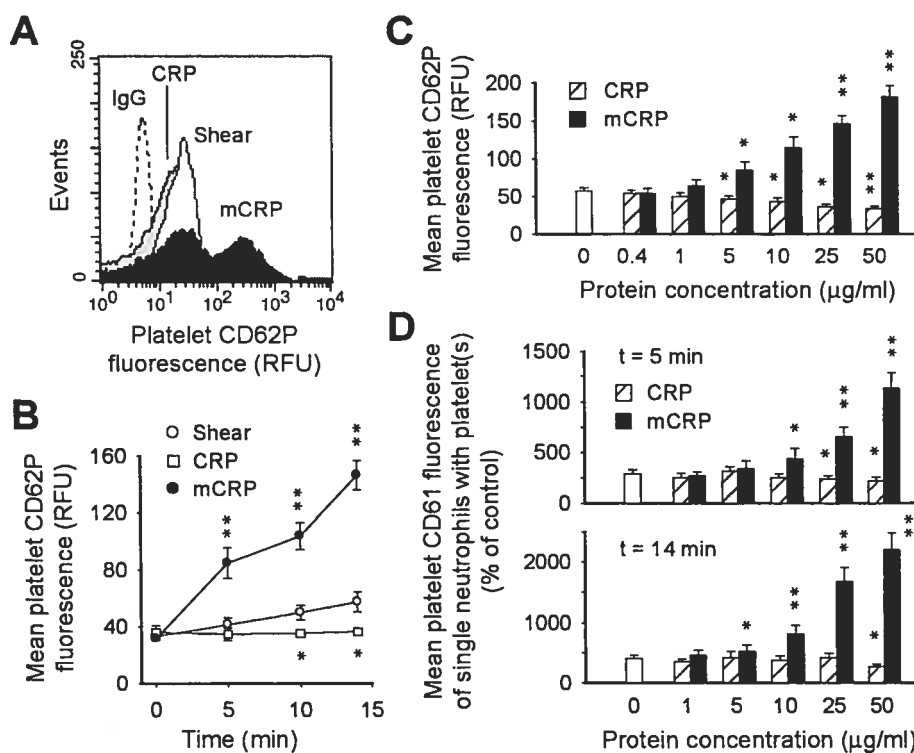


Figure 3. Effects of CRP isoforms on kinetics of platelet P-selectin (CD62P) expression and association of platelets with singlet neutrophils. (A) Representative histograms. Diluted blood was subjected to shear ($\sim 100 \text{ s}^{-1}$) for 14 minutes without or with CRP or mCRP (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). IgG represents staining with irrelevant antibody. (B) Time course of P-selectin expression in the absence or presence of native CRP or mCRP (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$). T=0 represents unsheared platelets. (C) Concentration-dependent effects of CRP and mCRP assessed after 14 minutes shear. (D) Mean platelet CD61-FITC fluorescence intensity of single neutrophils with attached platelets after 5 or 14 minutes of shear in the absence and presence of native CRP or mCRP. Results are expressed as percentage of CD61 fluorescence associated with unsheared neutrophils (42 ± 3 relative fluorescent units, $n=8$). Values are the mean \pm SEM for 4 to 5 independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs. shear alone.

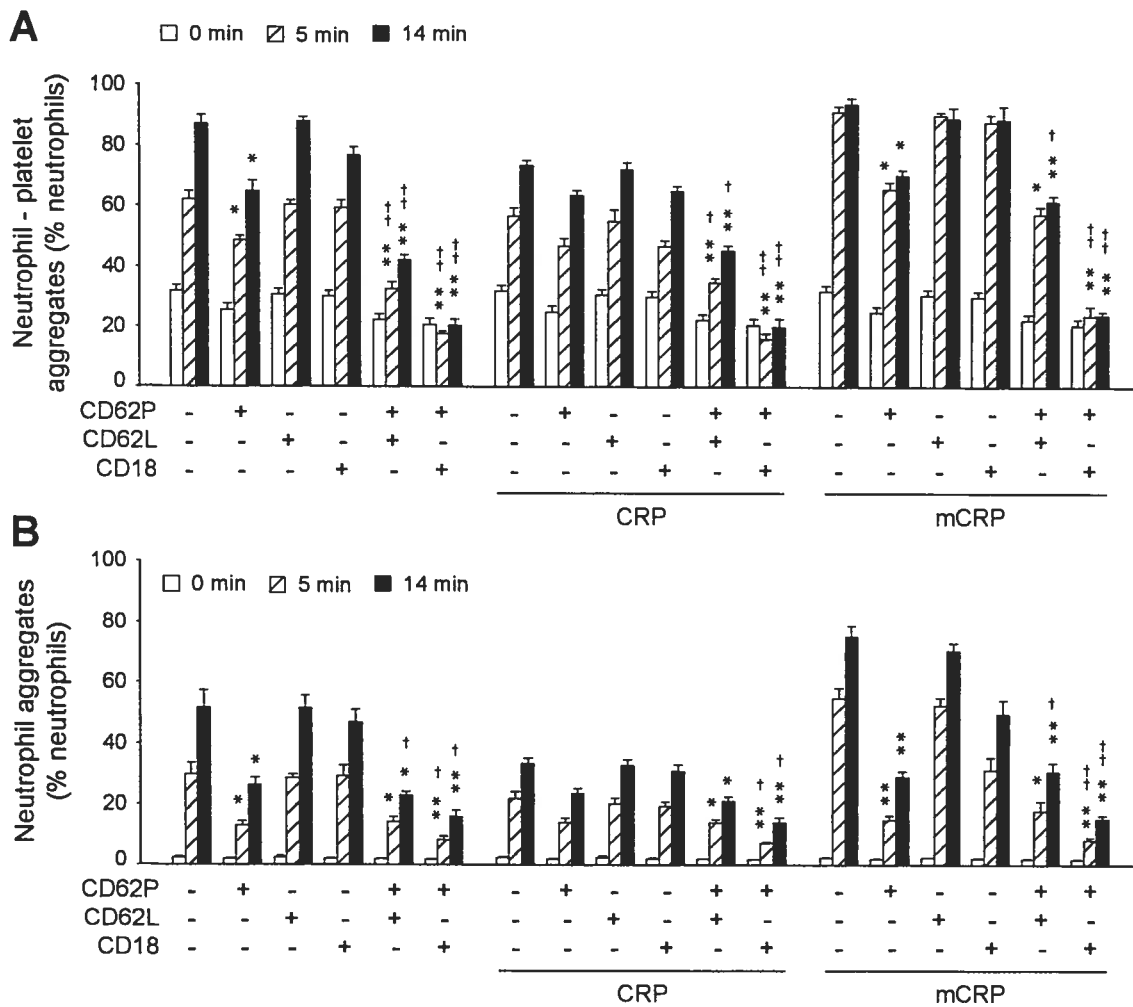


Figure 4. Contribution of P-selectin (CD62P), L-selectin (CD62L) and β_2 -integrin (CD18) to platelet-neutrophil and neutrophil-neutrophil adhesion. Diluted blood was incubated for 10 minutes with function blocking mAbs, as indicated. Samples were preincubated with native CRP (25 μ g/mL) for 5 minutes. mCRP (25 μ g/mL) was added on initiation of shear. Adhesion kinetics was monitored for neutrophil-platelet conjugates (A) and neutrophil aggregation (B). Values are the mean \pm SEM for 4 to 5 experiments using blood from different donors. *P<0.05; **P<0.01 vs. shear (no antibodies); †P<0.05; ††P<0.01 vs. P-selectin mAb. Comparisons were made separately for each group (i.e. shear, CRP-treated or mCRP-treated samples).

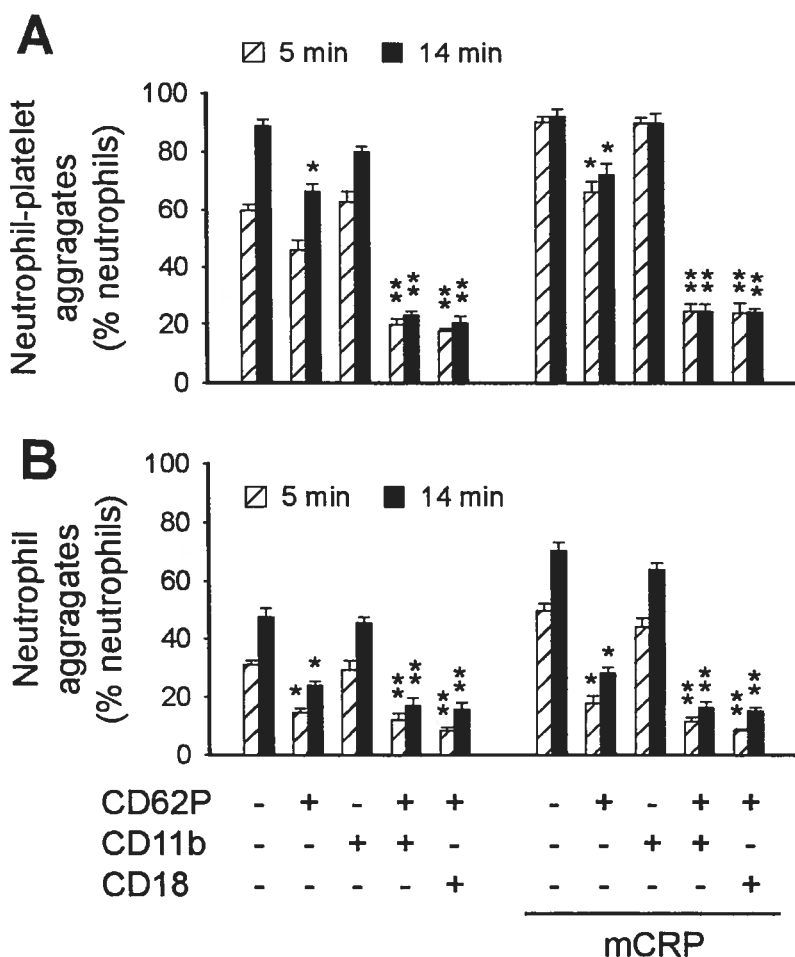


Figure 5. Dependence of platelet-neutrophil and neutrophil-neutrophil adhesion on Mac-1 (CD11b). Diluted blood was incubated for 10 minutes with a panel of blocking mAbs, as indicated. Samples were preincubated with native CRP (25 μ g/mL) for 5 minutes. mCRP (25 μ g/mL) was added on initiation of shear. Adhesion kinetics was monitored for neutrophil-platelet conjugates (A) and neutrophil aggregation (B). Values are the mean \pm SEM for 5 experiments using blood from different donors. * P <0.05; ** P <0.01 vs. shear (no antibodies). Comparisons were made separately for each group (i.e. shear only or mCRP-treated samples).

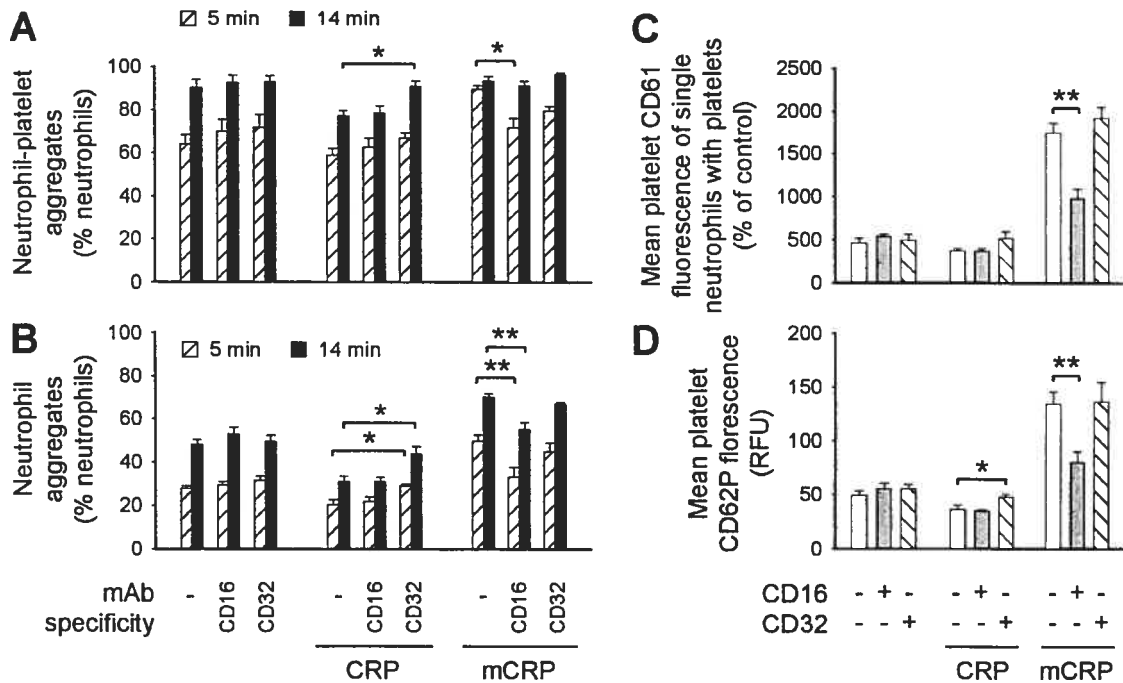


Figure 6. Involvement of CD32 in CRP signaling, and CD16 in mCRP signaling. Diluted blood was incubated for 10 min with function-blocking anti-CD16 or anti-CD32 mAb, as indicated. Samples were preincubated with native CRP (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 5 minutes. mCRP (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added on initiation of shear. Adhesion kinetics was monitored for neutrophil-platelet conjugates (A), neutrophil aggregation (B), mean platelet CD61-FITC fluorescence intensity of single neutrophils with attached platelets (C) and platelet P-selectin (CD62P) expression after 14 min of shear (D). Values are the mean \pm SEM for 4 to 5 experiments using blood from different donors. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

IV. DISCUSSION GÉNÉRALE

Ces études fournissent des évidences qu'un réarrangement conformationnel de la CRP en une forme monomérique/modifiée de CRP (mCRP) est un pré-requis afin d'exercer une activité pro-inflammatoire. Contrairement à la forme native de la CRP, seulement mCRP active les cellules endothéliales coronaires artérielles humaines (HCAEC), promouvoit les interactions cellulaires entre les plaquettes et les neutrophiles et active les neutrophiles humains en induisant la relâche de l'IL-8 via la signalisation du peroxy-nitrite. Tous ces événements sont impliqués dans le développement des maladies coronaires aiguës.

La formation de mCRP implique la dissociation de la structure pentamérique de CRP. Ce réarrangement structurel est médié par une perte de la structure secondaire prédominante de feuillet- β chez la CRP en un gain d'une structure secondaire prédominante en hélice- α chez mCRP (Khreiss et al, 2002). Cette restructuration protéique expose alors des nouveaux domaines normalement masqués dans la forme native, en particulier les résidus 198-206 qui forment le néo-épitope exprimé sur mCRP (Ying et al, 1989). Afin d'éliminer toutes possibilités d'agents contaminants dans notre solution de CRP et mCRP, nous avons procédé à certains contrôles qu'on jugeait important : (1) Avant chaque expérience, les protéines CRP et mCRP étaient dialysées contre une solution saline physiologique afin d'enlever l'azide de sodium, un agent préservatif, de la solution; (2) nous avons testé la concentration de lipopolysaccharide dans nos solutions protéiques, et celles-ci étaient inférieures aux valeurs médianes de la concentration plasmatique d'endotoxine au sein d'une population aléatoire d'hommes et de femmes (Wiedermann et al, 1999); (3) une forme inactivée par la chaleur (100 °C

pendant 30 minutes) de CRP n'avait pas d'effet en ce qui concerne l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles. (4) Les actions de CRP et de mCRP pouvaient être bloquées par des anticorps spécifiques contre des récepteurs CD16 et CD32 respectivement. D'autres part, les anticorps contre le CD16 et le CD32 ne bloquaient jamais les actions de la protéine CRP et de mCRP respectivement. Alors, tous ces contrôles suggèrent que les effets biologiques observés pour CRP et mCRP sont réellement dus à ces protéines. Cette forme monomérique/modifiée de CRP exprime aussi des activités biologiques distinctes (Potempa et al, 1987, Zouki et al, 2001, Khreiss et al, 2002). Par exemple, la forme native inhibe alors que la forme modifiée promouvoit l'adhésion des neutrophiles aux HCAEC activées par le LPS (Zouki et al, 1997, Zouki et al, 2001). D'autres études démontrent qu'une forme agrégée (i.e. structurellement modifiée) de CRP promouvoit l'engouffrement des LDLs par les macrophages (Zwaka et al, 2001, Fu et al, 2002).

Dans un premier temps, nos études démontrent que mCRP induit la relâche de cytokines et l'expression de molécules d'adhésions sur les HCAECs après 4 heures d'incubation. La voie de signalisation de la p38MAPK était le mécanisme intracellulaire prédominant impliqué dans la signalisation de mCRP chez les HCAECs. La figure 9 résume les résultats obtenus.

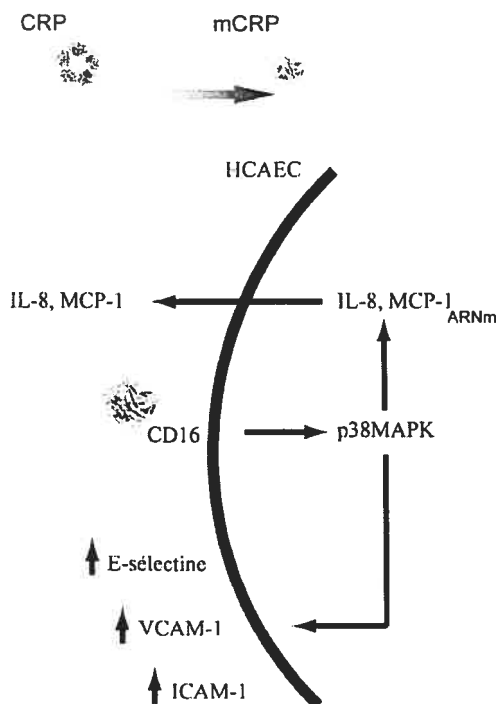


Figure 9: Schéma proposé de l'activation des HCAECs par la forme modifiée de la protéine C-réactive.

La forme monomérique/modifiée induisait la transcription des gènes de l'IL-8, de la protéine chimotactique des monocytes-1 (MCP-1), de la E-sélectine, de l'ICAM-1 et de VCAM-1. On pouvait observer des changements phénotypiques cellulaires significatifs à des concentrations faibles (1-5 $\mu\text{g/mL}$) de mCRP, ce qui est pertinent dans la prédiction des maladies cardiovasculaires selon le American Heart Association (AHA). En effet, selon l'AHA le risque de développer des maladies cardiovasculaires est classifié en trois niveaux, c'est-à-dire, basse (<1 $\mu\text{g/mL}$), moyen (1-3 $\mu\text{g/mL}$) et élevé (3-10 $\mu\text{g/mL}$). De façon concordante avec la littérature, la forme pentamérique n'activait pas les cellules endothéliales après 4 heures d'incubation (Pasceri et al, 2000, Pasceri et al, 2001, Verma

et al, 2002). D'après ces trois études, la CRP induisait l'activation des cellules endothéliales seulement après 6-12 heures d'incubation et atteignait une activation maximale seulement après 24 heures d'incubation. Ces études cinétiques concordent avec les observations de la dissociation du pentamère en sous-unités dans le temps, lorsque CRP se lie à des membranes contenant des résidus phosphocholines (Wang et al, 2001). Ces observations suggèrent évidemment qu'un réarrangement structurel de la protéine C-réactive est pré-requis pour que mCRP puisse activer les HCAECs.

La MCP-1 et IL-8 jouent un rôle important dans le recrutement des monocytes à travers la barrière endothéliale (Boring et al, 1998, Gerszten et al, 1999) et IL-8 est un régulateur important pour le trafic et l'activation des neutrophiles (Luster et al, 1998). Ainsi, en induisant la relâche de ces cytokines par les HCAECs, mCRP pourrait contribuer à la progression de l'athérogénèse (Boring et al, 1998) et l'activation généralisée des neutrophiles chez les patients ayant une angine de poitrine instable (Buffon et al, 2002). Selon nos résultats, nous avons observé que les neutrophiles adhéraient davantage aux HCAECs traitées au mCRP comparativement aux cellules non traitées, ce qui confirme la signification biologique de l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésions sur les HCAECs. En effet, nos résultats démontrent que l'expression de l'E-sélectine et l'ICAM-1 contribue à l'attachement des neutrophiles aux cellules endothéliales. L'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales implique des interactions multiples et complexes des molécules d'adhésions (Butcher et al, 1991). Selon nos résultats, les anticorps anti-CD18, anti-E-sélectine et anti-L-sélectine inhibaient de 57%, 34% et 14% l'attachement des neutrophiles respectivement, alors que les trois anticorps combinés inhibaient 90% l'adhésion des neutrophiles.

L'activation des HCAECs par le mCRP implique l'activation de la voie de signalisation de la p38 MAPK. On observait une phosphorylation rapide de la p38 MAPK et l'inhibiteur spécifique de cette kinase, le SB203580, inhibait partiellement sa phosphorylation suite à l'activation des HCAECs traitées avec le mCRP. Ces résultats sont concordants avec ceux observés chez les cellules endothéliales activées par la thrombine sécrétant les chemokines et induisant l'expression de l'ICAM-1 (Marin et al, 2001, Rahman et al, 2001), ce qui suggère l'implication d'autres mécanismes intracellulaires. Contrairement aux neutrophiles (Khreiss et al, 2002, Zouki et al, 2001), mCRP n'active pas les voies de la MAPK ERK1/2 et de la PI3-kinase chez les HCAECs.

D'après nos résultats antérieurs, un anticorps contre le récepteur des complexes immuns de basse affinité, aussi connu sous le nom de FcγRIIIb, renversait l'effet de mCRP sur l'apoptose chez les neutrophiles (voir figure 10 pour plus de détails).

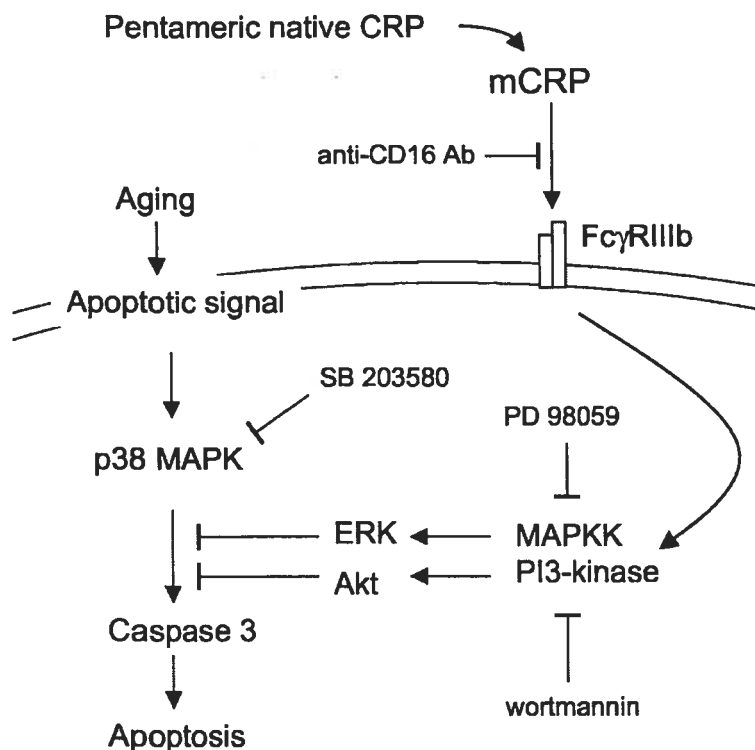


Figure 10: Action de mCRP sur le retardement de l'apoptose chez les neutrophiles humains. Modifiée de Khreiss et al. *J Biol Chem* (2002) 277 :40775-40781

Chez les HCAECs, l'anticorps anti-Fc γ RIIIb a légèrement inhibé l'expression des molécules d'adhésions et la sécrétion des chemokines MCP-1 et IL-8. Bien que ces résultats suggèrent un rôle pour le récepteur Fc γ RIIIb, d'autres études seront requises afin de confirmer la présence de ce récepteur sur les HCAECs et de trouver le site de liaison majeur de mCRP sur les HCAECs.

mCRP facilite directement l'expression des molécules d'adhésions sur les HCAECs, la production de MCP-1 et d'IL-8 et de l'adhésion des neutrophiles sur les cellules endothéliales. Tout comme chez les cellules endothéliales, la production d'IL-8 provenant des neutrophiles joue aussi un rôle primordial dans l'activation et l'adhésion de ces derniers sur l'endothélium permettant ainsi l'amplification des interactions entre ces deux types cellulaires. En effet, nos résultats démontrent un nouveau mécanisme par lequel mCRP peut affecter le processus inflammatoire en stimulant la sécrétion de l'IL-8 via la signalisation du ONOO⁻ chez les neutrophiles humains (voir figure 11 pour plus de détails).

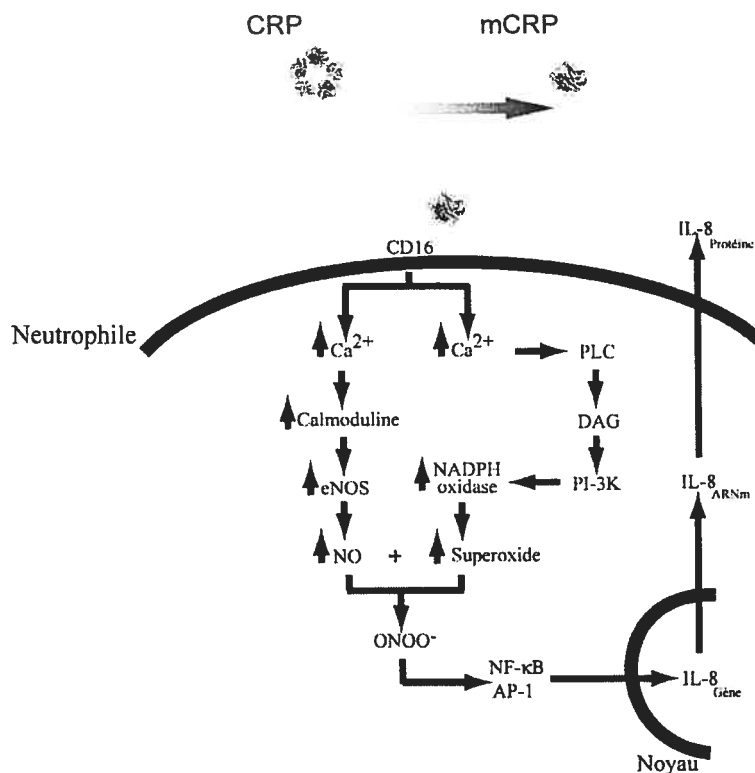


Figure 11: Modèle proposé pour l'activation des neutrophiles humains par la forme modifiée de la protéine C-réactive.

Notre étude démontre que mCRP stimule rapidement (≤ 4 heures) la synthèse d'IL-8 chez les neutrophiles humains. De façon concordante avec nos observations, l'effet de la forme pentamérique de CRP sur la sécrétion de l'IL-8 n'était détectable qu'après une incubation prolongée (≥ 8 heures), ce qui coïncide encore une fois avec la cinétique de dissociation en sous-unités de CRP (Wang et al, 2001). Cette cinétique d'activation des neutrophiles par la forme native de CRP semble être similaire à celle des HCAECs. Ces résultats suggèrent qu'un réarrangement conformationnel de CRP est un pré-requis pour induire la production d'IL-8 chez les neutrophiles.

Le blocage de la synthèse du NO par le L-NAME inhibe la sécrétion de l'IL-8 stimulée par mCRP ainsi que l'accumulation nucléaire des facteurs de transcriptions NF-

κ B et AP-1 coïncidant avec la suppression de l'expression de l'ARNm de l'IL-8. Ces inhibitions suggèrent une implication du NO dans la signalisation de la sécrétion de l'IL-8. Des études antérieures ont démontré que le ONOO⁻ plutôt que le NO médie la sécrétion de l'IL-8 chez les neutrophiles humains en réponse au LPS ou aux cytokines (Filep et al, 1998, Cuthbertson et al, 1998, Iho et al, 2003). Convenablement, nous avons trouvé que mCRP stimulait simultanément la formation de superoxyde et de NO, coïncidant avec l'augmentation de l'oxydation du DHR 123 dépendante du NO et de la nitration des résidus tyrosines sur les protéines. Puisque le NO ne peut oxyder directement le DHR 123, une portion significative de la fluorescence de la rhodamine chez les neutrophiles stimulés avec le mCRP peut être attribuée au ONOO⁻ (Kooy et al, 1994). De plus, le donneur de NO, le NONOate, rétablit l'oxydation du DHR 123 chez les neutrophiles préalablement traités au L-NAME indiquant que le L-NAME n'inhibe pas l'activation de la NADPH oxydase. Bien que les nitrotyrosines sont considérées comme une "empreinte moléculaire" de la formation du ONOO⁻ (Beckman et al, 1996), la nitration des tyrosines dépendante de la peroxydase ne peut être écartée (Eiserich et al, 1998, Brennan et al, 2002). Cependant, chez les neutrophiles humains, le ONOO⁻ semble être le mécanisme prédominant pour la nitration des tyrosines (Galinares et al, 2002).

D'après nos résultats, la source du NO proviendrait de oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). L'expression de cette enzyme était constitutive autant chez les neutrophiles non traitées que chez les neutrophiles traitées avec le mCRP suggérant ainsi qu'une augmentation de l'activité de eNOS serait à l'origine de la source de la production NO en réponse au mCRP.

La mobilisation du Ca^{2+} et l'activation de la calmoduline et de la PI-3K semblent être requises pour la formation du ONOO^- induit par mCRP. Le Ca^{2+} contrôle l'activation de eNOS médiée par la calmoduline et l'activité de la PLC γ 1 et PLC γ 2, qui via la formation du diacylglycérol et l'activation de la PI-3K mènent à l'activation de la NADPH oxydase (Sanchez-Mejorada et al, 1998). Les actions inhibitoires du W7 (inhibiteur de la calmoduline), de la wortmannin (inhibiteur de la PI-3K) et du DPI (inhibiteur de la NADPH oxydase) sur oxydation du DHR 123 n'étaient pas additives à celle du L-NAME suggérant que tous ces composés inhibaient la même réaction, c'est-à-dire, l'oxydation dépendante du ONOO^- . La protéine kinase C (PKC) semble jouer un rôle mineur dans la signalisation du mCRP puisque son inhibiteur, le GF109203X, a inhibé une petite portion de l'oxydation du DHR 123 par mCRP. Cependant, il serait important de cibler le ou les isoformes de PKC impliqués dans la signalisation chez les neutrophiles puisque le GF109203X inhibe de façon non spécifique les différents isoformes de PKC.

Le gène de l'IL-8 contient des éléments de réponses pour les facteurs de transcriptions NF- κ B, de AP-1 et de NF-IL-6 (Mukaida et al, 1994). De ces facteurs de transcriptions, le NF- κ B joue un rôle important dans l'induction de l'expression de l'IL-8. Par conséquent, nous avons trouvé que mCRP stimule l'accumulation nucléaire de NF- κ B et de AP-1 alors que l'inhibition de l'activation de NF- κ B avec le PDTC a diminué la production d'IL-8 de 66%.

Nos résultats indiquent que l'expression génique et la sécrétion de l'IL-8 induites par mCRP sont prédominamment médiées par le récepteur du complexe immunitaire de basse affinité, le Fc γ RIIb (CD16), puisque l'inhibition de la fonctionnalité de ce récepteur par

un anticorps anti-CD16 diminue de façon significative la formation de NO et la production d'IL-8 chez les neutrophiles traités avec mCRP. L'anticorps contre le récepteur Fc γ de basse affinité, l'anti-CD32, n'avait aucun effet. De plus, seulement l'anticorps anti-CD16 a atténué l'effet de la forme native de CRP sur la sécrétion de l'IL-8 après 24 heures d'incubation. Ces observations supposent que durant les 24 heures d'incubation, il y a eu un réarrangement conformationnel de CRP en mCRP puisque la CRP ne lie pas le récepteur CD16 (Bharadwaj et al, 1999, Stein et al, 2001, Heuertz et al, 2005). Cependant, d'autres récepteurs ou surfaces cellulaires peuvent être impliqués dans la signalisation de mCRP puisque le blocage du récepteur CD16 n'inhibait pas complètement la signalisation de mCRP. En effet, mCRP pourrait interagir avec des molécules de surfaces cellulaires puisque mCRP peut lier directement des membranes lipidiques (Potempa, observations non publiées).

Ces observations suggèrent que la perte structurelle de CRP en mCRP résulte en une activation des neutrophiles en induisant la production de l'IL-8 via l'activation du NF- κ B et AP-1 médiée par le ONOO \cdot . Les neutrophiles sont ainsi une source importante de stress nitrosatif et d'IL-8 et peuvent fournir un lien potentiel entre la CRP, l'activation des neutrophiles et les niveaux de nitrotyrosines/IL-8 plasmatiques, tous étant impliqués dans l'avènement futur des maladies cardiovasculaires.

D'après les études antérieures et nos présents résultats, il est bien clair que l'activation et l'interaction des neutrophiles et des cellules endothéliales vasculaires sont des événements clés dans la progression des maladies coronaires aiguës. Cependant, ces interactions cellulaires ne sont pas les seuls médiateurs à jouer un rôle crucial lors des pathologies coronaires. En effet, une augmentation des adhésions entre les neutrophiles et

les plaquettes ont été détecté chez les patients ayant une angine instable (Entman et al, 1996, Ott et al, 1996, Neumann et al, 1997), et suite à une angioplastie coronaire (Mickelson et al, 1996). De plus, la présence des agrégats neutrophiles-plaquettes dans la circulation sanguine corrèle aussi avec l'activité de la pathologie (Ott et al, 1996).

Selon les résultats obtenus dans nos études, les deux formes de CRP (native et modifiée) jouent des rôles opposés lors de l'interaction des plaquettes aux neutrophiles induits par un stress dû au cisaillement "shear stress". Nous avons trouvé que la forme native supprime alors que la forme modifiée augmente significativement la dynamique et l'ampleur des interactions entre les plaquettes et les neutrophiles. La figure 12 résume les résultats obtenus.

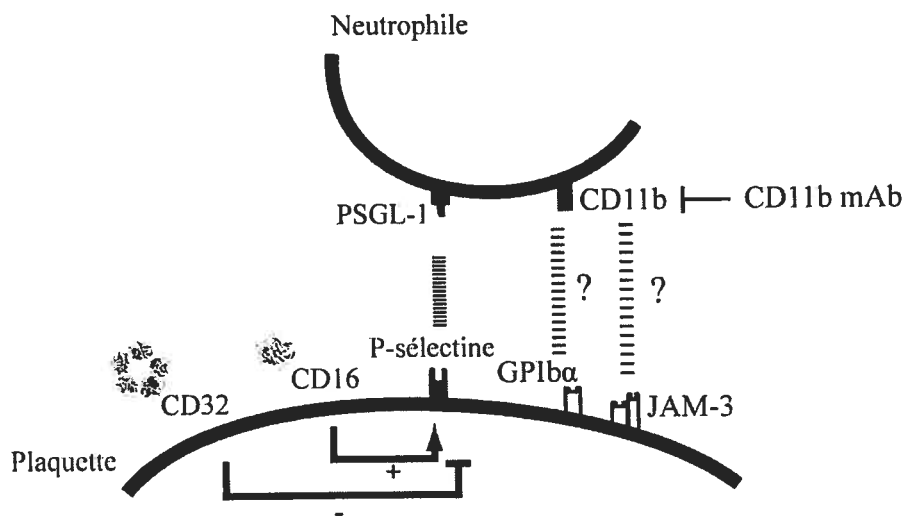


Figure 12: Modèle proposé dans la régulation de l'adhésion plaquette-neutrophile par les différentes formes de la protéine C-réactive.

Nous avons utilisé la cytométrie en flux en temps réel afin de suivre la progression de la transition des plaquettes de leur état non-activées à leur état activées et d'étudier la dynamique de l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles et de la formation des agrégats homotypiques des neutrophiles dans le sang total (Konstantopoulos et al, 1998, Simon et al, 1995). Selon nos résultats, un niveau faible de cisaillement induit l'activation des

plaquettes dues à l'augmentation de l'expression de la molécule d'adhésion P-sélectine. D'autres mécanismes qui peuvent être aussi impliqués dans l'activation des plaquettes dans notre système comprend l'hémolyse et la relâche de l'ADP des plaquettes (Konstantopoulos et al, 1998, Alkhamis et al, 1990), le contact des plaquettes avec des surfaces étrangères et un niveau altéré d'oxygène dans le sang. Ces expériences ont démontré que la forme native de CRP atténuait de façon concentration dépendante l'induction de l'expression de la P-sélectine et conséquemment l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles et de l'agrégation homotypiques des neutrophiles. Cette inhibition par CRP était détectable à des concentrations aussi basse que 1 à 5 $\mu\text{g/mL}$, ce qui est pertinent dans la prédiction des maladies cardiovasculaires (Ridker et al, 1997, Ridker et al, 1998). D'après la méthode de cytométrie en flux utilisée lors de cette étude, il nous était impossible de déterminer le nombre de plaquettes liées par neutrophile et d'évaluer si les plaquettes adhéraient aux neutrophiles individuellement ou en agrégats. D'après des études faites par microscopie électronique, la majorité des neutrophiles étaient attachés à au moins deux plaquettes et les plaquettes formaient soit un pont entre les neutrophiles ou étaient liées à la périphérie de la région de contact entre les neutrophiles (Konstantopoulos et al, 1998). Ces observations supportent la notion qu'un nombre critique de plaquettes est nécessaire (≥ 2 par neutrophile) afin d'induire l'activation des neutrophiles (Konstantopoulos et al, 1998). Il a été démontré que la CRP inhibait la réactivité des plaquettes en réponse à plusieurs agonistes incluant l'ADP et le PAF (Fiedel et al, 1976, Vigo et al, 1985, Miyazawa et al, 1988). Ainsi, ces études sont consistantes avec nos observations sur l'action inhibitrice de CRP sur les plaquettes.

D'autres part, contrairement à la forme native de CRP, nos résultats démontrent que la forme modifiée de CRP induit l'expression de la P-sélectine et augmente la dynamique et l'ampleur de l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles et de agrégation homotypique des neutrophiles suite à un stress dû au cisaillement dans le sang total.

L'adhésion des plaquettes aux neutrophiles est modélisée comme un processus qui requiert plusieurs étapes (Taylor et al, 1996, Diacovo et al, 1996). La liaison de la P-sélectine sur les plaquettes à son contre-récepteur PSGL-1 exprimé sur les neutrophiles médie l'attachement lâche de ces cellules. Ces interactions sont par la suite suivies par leur liaison ferme dépendante de la β_2 -intégrine CD11b/CD18 sur les neutrophiles au GPIIb α (Simon et al, 2000) ou à la molécule d'adhésion de jonction-3 (JAM-3) sur les plaquettes (Santoso et al, 2002). De façon consistante avec d'autres observations (Konstantopoulos et al, 1998, Diacovo et al, 1996), nous avons aussi trouvé que la P-sélectine était cruciale pour la capture des neutrophiles par les plaquettes. En combinant les anticorps anti-P-sélectine et anti-CD18 ou anti-CD11b nous avons presque entièrement bloqué l'adhésion des plaquettes aux neutrophiles. La molécule d'adhésion L-sélectine semble aussi jouer un rôle. Cependant, d'autres expériences seraient nécessaires afin de clarifier le rôle exact de la L-sélectine dans les interactions neutrophiles-neutrophiles et neutrophiles-plaquettes. En présence de mCRP, les molécules d'adhésions P-sélectine et CD11b/CD18 étaient aussi impliquées dans les interactions cellulaires puisque les anticorps respectifs contre ces molécules d'adhésions diminuaient significativement le nombre agrégats cellulaires.

Nos résultats suggèrent l'implication de différents récepteurs Fc γ dans la signalisation de CRP et mCRP lors des interactions cellulaires entre les plaquettes et les

neutrophiles. Ainsi, les actions de la forme native de CRP semble passer via le récepteur Fc γ de basse affinité (CD32) alors que les actions de mCRP sont médiées prédominamment via le récepteur du complexe immunitaire de basse affinité (CD16). Cependant, les anticorps anti-CD32 et anti-CD16 n'ont pas produit des inhibitions complètes suggérant dans ce cas-ci aussi, l'implication d'autres récepteurs cellulaires. Évidemment, des études additionnelles sur des cellules isolées sont nécessaires afin d'identifier d'autres récepteurs potentiels sur les plaquettes et/ou neutrophiles.

Nous avons observé que la forme native de CRP inhibe l'activation des plaquettes et prévient la capture des neutrophiles par les plaquettes. Suite à un réarrangement de CRP en mCRP, cette dernière active les plaquettes et subséquemment les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles. Contrairement à CRP, mCRP semble alors posséder des activités pro-inflammatoires et pro-thrombotiques lorsque les cellules sont soumises à un stress dû au cisaillement.

Les mécanismes qui induisent un réarrangement conformationnel de la forme native de CRP *in vivo* en mCRP demeurent encore inconnus. Tel que discuté dans la section de l'introduction, la forme native ou pentamérique de CRP se dissocie en sous-unités lorsqu'elle se lie à des membranes plasmiques (Wang et al, 2001) ou lorsqu'elle est présente dans un environnement dénaturant ou oxydatif (Potempa et al, 1987). De plus, une récente étude a démontré que les macrophages expriment directement la forme monomérique/modifiée de CRP plutôt que la forme native/pentamérique (Ciubotaru et al, 2005). Le pourcentage de la forme native de CRP qui se dissocie en forme monomérique/modifiée après une période de 24 heures d'incubation reste à être déterminé. Contrairement à CRP, mCRP semble être prédominamment liée aux membranes

plasmiques (i.e. ne circulant pas librement dans le plasma) (Diehl et al, 2000, Rees et al, 1988). Cette caractéristique de mCRP rend cette dernière difficile à détecter dans le sérum. Puisque l'anticorps commercial contre CRP (clone 8) reconnaît principalement mCRP (Schwedler et al, 2003), les détections immunologiques tissulaires "immunostaining" attribuées à CRP dans certaines études antérieures seraient probablement dues à mCRP. Les cellules endothéliales, les neutrophiles et/ou les plaquettes peuvent entrer en contact avec mCRP, exprimé dans l'intima du vaisseau sanguin (Diehl et al, 2000), suite à une dénudation de l'endothélium aggravant ainsi la réponse inflammatoire et la déstabilisation de la plaque athéromatose. D'autre part, une autre limitation de nos études que l'on ne peut pas exclure est la contribution d'autres types cellulaires dans l'augmentation de nitrotyrosines et d'IL-8. En effet, les leucocytes mononucléaires et les cellules endothéliales (notre étude) sécrètent aussi l'IL-8 en réponse au CRP ou au mCRP.

Donc, d'un point de vue global, nos résultats peuvent avoir une pertinence en ce qui concerne les actions inhibitrices de la forme native de CRP. Cette dernière aurait la fonction de garder les cellules dans un état quiescent en inhibant l'activation des plaquettes et des neutrophiles et subséquemment les interactions plaquettes-neutrophiles. De plus, CRP ne semble pas activer les cellules endothéliales coronaires artérielles humaines et donc jouerait un rôle protecteur en gardant ces cellules dans un état latent. Ainsi, CRP posséderait une fonction générale anti-inflammatoire et subséquemment une activité anti-thrombotique. D'autre part, suite à une lésion athérosclérotique dans les vaisseaux coronaires et l'exposition de la matrice subendothéliale à la circulation sanguine, la présence de mCRP dans la section de l'intima (Diehl et al, 2000) activerait les différentes cellules inflammatoires (HCAECs, neutrophiles, plaquettes). La présence

d'une forme structurellement modifiée de CRP dans la circulation sanguine pourrait avoir aussi lieu suite à un stress oxydatif ou thermique. En fait, la forme oxidée de CRP augmente l'agrégation des plaquettes humaines (Miyazawa et al, 1988). Ainsi, mCRP pourrait contribuer à l'inflammation vasculaire, suite à une activation des HCAECs, et à l'activation des neutrophiles et des plaquettes. Une fois activées, ces cellules interagissent ensemble et contribuent à l'amplification de la réponse inflammatoire et athérotrombotique. Basé sur l'ensemble des résultats, nous proposons les mécanismes suivants illustrés par les deux figures ci-dessous. Dans la figure 13, la protéine C-réactive garde l'endothélium, les neutrophiles et les plaquettes dans un état quiescent, c'est-à-dire, avec des propriétés anti-adhésives. Lors d'un réarrangement structurel de CRP en une forme modifiée, cette dernière active alors les cellules endothéliales, les neutrophiles et les plaquettes leur permettant ainsi d'adhérer à la surface de l'endothélium endommagé. La dénudation de l'endothélium et l'exposition de la forme monomérique/modifiée présente dans l'intima à la circulation sanguine serait un autre mécanisme responsable de la présence de mCRP. Les interactions inter-cellulaire mènent alors à l'occlusion thrombotique du vaisseau sanguin et ultimement aux syndromes coronaires aigus.

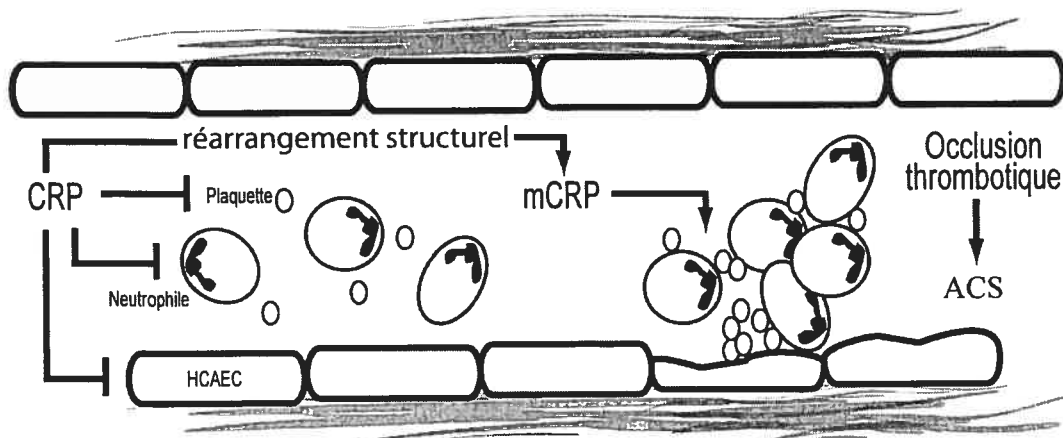


Figure 13: Mécanisme récapitulatif proposé de l'action de CRP et de mCRP sur l'activation des interactions cellulaires lors des maladies coronaires aiguës (ACS).

Ainsi, dans la figure 14, une dissociation de la forme pentamérique protéine C-réactive en une forme monomérique/modifiée serait requise pour exercer son activité pro-athérosclérotique. Dans ce modèle tiré du laboratoire du Dr. Verma, la perte de structure de la protéine C-réactive affecte la fonction de celle-ci. En effet, lors du réarrangement structurel, seulement la forme monomérique/modifiée de CRP contribue à (1) l'activation des neutrophiles et à leurs adhésions sur les cellules endothéliales, (2) à l'activation des cellules endothéliales en augmentant leurs propriétés pro-adhésives et la production de cytokines pro-inflammatoires et (3) à la progression de la lésion athéro-thrombotique.

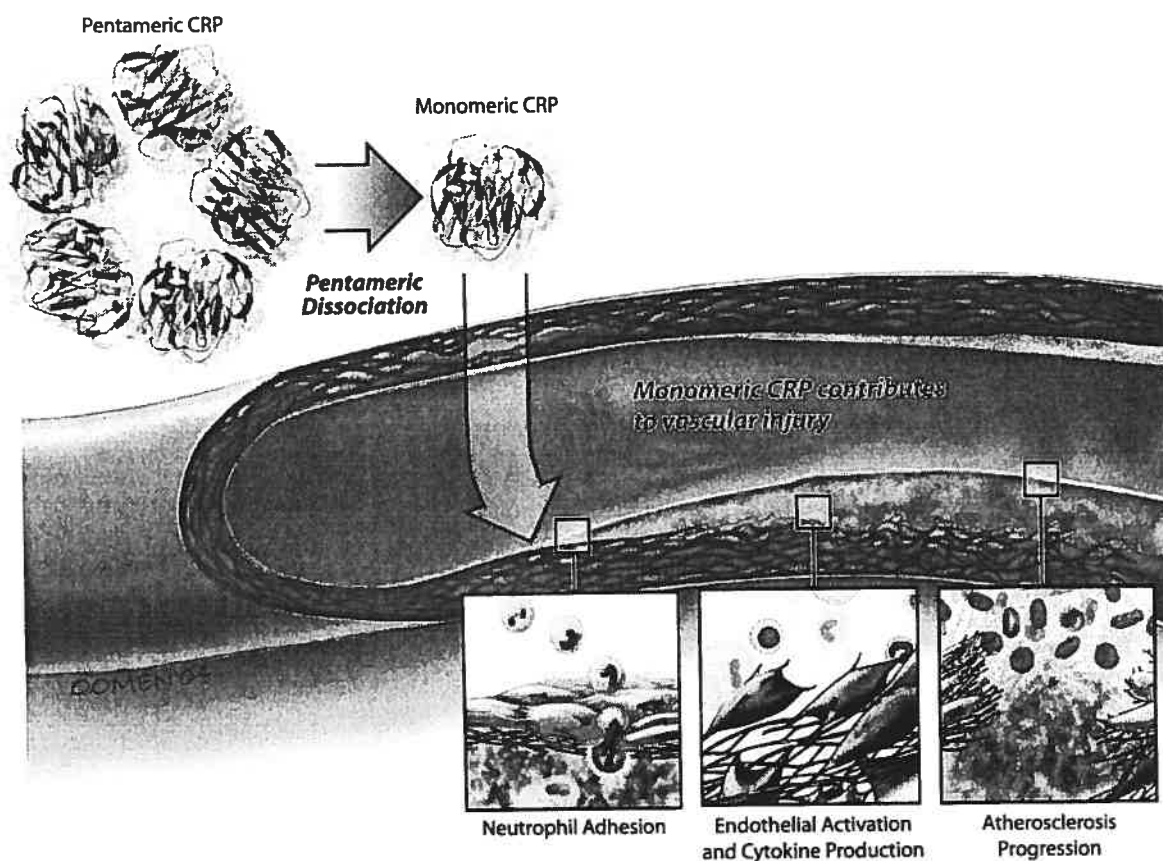


Figure 14: Mécanisme récapitulatif proposé de l'action de CRP et de mCRP dans l'implication du développement des pathologies athérothrombotiques. Tiré de Verma et al, (2004) *Circulation* 109:1914-1917.

Donc, comprendre les mécanismes intracellulaires d'activations/inhibitions par les différentes formes de la protéine C-réactive sur les cellules endothéliales, neutrophiles et plaquettes et comprendre les changements structurels de cette protéine de phase aiguë s'avère être une avenue importante afin d'essayer de cibler et de contrôler le développement des maladies coronaires aiguës.

V. CONCLUSIONS

Ces études dévoilent qu'un réarrangement structurel de la CRP en une forme modifiée ou mCRP est un pré-requis pour son activité pro-inflammatoire. En effet, mCRP facilite l'expression d'un phénotype pro-inflammatoire sur les HCAECs et l'adhésion des neutrophiles. De plus, mCRP induit une activation directe des neutrophiles en stimulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et en facilitant l'adhésion des plaquettes activées aux neutrophiles, tous ces événements étant impliqués dans la progression des maladies coronaires aiguës.

1. Nos résultats indiquent qu'une modification de la protéine C-réactive en mCRP induit l'expression des molécules d'adhésions telles que ICAM-1, E-sélectine et VCAM-1 sur les cellules endothéliales coronaires artérielles humaines, et induit la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires MCP-1 et IL-8 via la signalisation de la p38MAPK. Par la suite, cette activation des HCAECs par la forme modifiée de CRP facilite l'adhésion des neutrophiles humains aux cellules endothéliales.
2. Nous avons trouvé que mCRP induisait l'activation des neutrophiles via la signalisation du peroxy-nitrite. mCRP stimulait la production du superoxyde et de l'oxyde nitrique chez les neutrophiles humains pour former le peroxy-nitrite et conséquemment l'activation des facteurs de transcriptions NF- κ B et AP-1. Cette activation des facteurs de transcriptions, en particulier le NF- κ B, par mCRP était responsable en partie de l'induction du gène de l'IL-8 chez les neutrophiles humains.

3. Nous avons observé que contrairement à CRP, mCRP induisait l'activation des plaquettes et subséquemment la capture des neutrophiles par les plaquettes. Suite à un stress dû au cisaillement, mCRP induisait l'expression de la molécule d'adhésion P-sélectine sur les plaquettes dans le sang total menant aux interactions des plaquettes avec les neutrophiles et à l'agrégation homotypique des neutrophiles. Ces interactions étaient dépendantes des molécules d'adhésions tels que la P-sélectine, le CD11b/CD18 et la L-sélectine. À l'opposé, la forme native de CRP jouait un rôle contraire à mCRP, ie, elle inhibait l'expression de la P-sélectine sur les plaquettes et diminuait les interactions entre les plaquettes et les neutrophiles et l'agrégation homotypique des neutrophiles.

4. Les activités anti-inflammatoires de CRP sur les plaquettes et sur les neutrophiles concernant les interactions cellulaires et la production d'IL-8 par les neutrophiles étaient principalement médiées par le récepteur Fc γ de basse affinité (CD32). D'autres part, les activités pro-inflammatoires et pro-thrombotiques de mCRP sur les HCAECs, les plaquettes et les neutrophiles étaient principalement médiées par le récepteur du complexe immunitaire Fc γ de basse affinité (CD16).

Alors, nos résultats indiquent que dans tous les points mentionnés ci-haut, un réarrangement structurel de la CRP est essentiel pour exercer son activité pro-inflammatoire et pro-thrombotique. La forme native de CRP semble, exercer dans certains cas une activité opposée à mCRP, ie, inhibe les interactions entre les plaquettes et

les neutrophiles. Tous ces évènements contribuent à l'initiation et à l'amplification de la réponse inflammatoire des cellules mentionnées ci-haut lors des maladies coronaires artérielles aiguës menant éventuellement à l'occlusion thrombotique.

VI. DIRECTIONS FUTURES

Ces études démontrent qu'un réarrangement structural de la CRP est essentiel afin d'exercer ses activités pro-inflammatoires et pro-thrombotiques. Bien que ces observations avancent la compréhension du mécanisme des interactions des cellules inflammatoires dans le développement des maladies coronaires aiguës, plusieurs étapes du mécanisme inflammatoire restent à élucider.

Premièrement, il serait intéressant de comprendre comment la p38MAPK est directement lié au changement phénotypique à la surface cellulaire des HCAECs. Quel(s) est/sont le/les effecteur(s) sur lequel/lesquels la p38MAPK, suite à son activation, peut moduler et ainsi induire les changements phénotypiques observés à la surface cellulaire. Il serait aussi intéressant d'investiguer les autres mécanismes intracellulaires pouvant être impliqués dans les changements phénotypiques.

Deuxièmement, on pourrait essayer d'élucider le/les site(s) de liaison(s) de mCRP sur les cellules endothéliales coronaires artérielles aiguës. Bien que le récepteur FcγRIIIb semble être impliqué, l'absence d'inhibition complète avec un anticorps anti-FcγRIIIb, suggère la présence d'autres récepteurs ou protéines membranaires sur les HCAECs.

Troisièmement, il serait logique de regarder la formation des interactions des plaquettes aux monocytes suite à une stimulation avec les deux formes distinctes de la CRP puisque la présence des agrégats plaquettes-monocytes sont aussi des composantes majeures dans le développement et l'amplification des maladies coronaires aiguës.

Ultimement, comment la CRP se transforme en une forme modifiée est la question clé à l'origine de tous nos travaux. Or, l'élaboration de techniques et/ou de procédés expérimentaux afin d'essayer d'élucider les mécanismes contrôlant cette conversion

protéique s'avère être une avenue cruciale afin de mieux comprendre l'activation des cellules inflammatoires lors du développement de l'athérogénèse.

Ultimement, il serait bien de vérifier *in vivo*, en utilisant des modèles animales, si les deux formes de la protéine C-réactive possèdent des effets biologiques similaires à ceux observés dans nos travaux *in vitro*.

VII. LISTE DES PUBLICATIONS

1. Jozsef L, **Khreiss T**, Fournier A, Chan JS, Filep JG. Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in endothelin-1-induced homotypic adhesion of human neutrophil granulocytes. *Br J Pharmacol*. 2002; **135**:1167-1174
2. **Khreiss T**, Jozsef L, Hossain S, Chan JS, Potempa LA, Filep JG. Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *J Biol Chem*. 2002; **277**:40775-40781
3. **Khreiss T**, Jozsef L, Chan JSD, Filep JG. Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. *Cell Signal*. 2004 **16**:801-810.
4. **Khreiss T**, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation* 2004 **109**:2016-2022.
5. Jozsef L, **Khreiss T***, Filep JG. CpG motifs in bacterial DNA delay apoptosis of neutrophil granulocytes. *FASEB J*. 2004 **18**:1776-8. * Co-first author
6. **Khreiss T**, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood. *Circulation* 2004 **110**:2713-20.
7. Filep JG, **Khreiss T**, Jozsef L. Lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in neutrophil adhesion and signal transduction. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2005 **73**:257-262
8. **Khreiss T**, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *Circ Res* 2005 **97**:690-697
9. Jozsef L, **Khreiss T***, El Kebir D and Filep JG. Activation of toll-like receptor-9 induces IL-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *J Immunol*. 2006 In press * Co-first author
10. El Kebir D, Jozsef L, **Khreiss T** and Filep JG. Inhibition of K⁺ efflux prevents mitochondrial dysfunction and suppresses constitutive apoptosis in human neutrophils independent of ERK, Akt and p38 MAPK. (In revision).

VIII. BIBLIOGRAPHIE

- Abu-Soud HM, Hazen SL (2000) Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem.* 275:37524-37532
- Aihara M, Tsuchimoto D, Takizawa H, Azuma A, Wakebe H, Ohmoto Y, Imagawa K, Kikuchi M, Mukaida N, Matsushima K (1997) Mechanisms involved in *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun.* 65:3218-3224
- Akgul C, Moulding DA, Edwards SW (2001) Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett.* 487:318-322
- Alcorn MJ, Booth JL, Coggeshall KM, Metcalf JP (2001) Adenovirus type 7 induces interleukin-8 production via activation of extracellular regulated kinase 1/2. *J Virol.* 75:6450-6459
- Alexander JS, Elrod JW (2002) Extracellular matrix, junctional integrity and matrix metalloproteinase interactions in endothelial permeability regulation. *J Anat.* 200:561-574
- Alkhamis TM, Beissinger RL, Chediak JR (1990) Artificial surface effect on red blood cells and platelets in laminar shear flow. *Blood* 75:1568-1575
- Anderson DC, Schmalstieg FC, Arnaout MA, Koll S, Tosi MF, Dana N, Buffone GJ, Hughes BJ, Brinkley BR, Dickey WD, Abramson JS, Springer T, Boxer LA, Hollers JM, Wayne and Smith C (1984) Abnormalities of polymorphonuclear leukocyte function associated with heritable deficiency of high molecular weight surface glycoproteins (GP-138): Common relationship to diminished cell adherence. *J Clin Invest* 74:536-551

- Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD (2002) CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med.* 8:247-52
- Andrews RK, Gardiner EE, Shen Y, Whisstock JC, Berndt MC (2003) Glycoprotein Ib-IX-V. *Int J Biochem Cell Biol.* 35:1170-1174
- Aukrust P, Berge RK, Ueland T, Aaser E, Damas JK, Wikeby L, Brunsvig A, Muller F, Forfang K, Froland SS, Gullestad L (2001) Interaction between chemokines and oxidative stress: possible pathogenic role in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 37:485-491
- Ashkenazi A, Dixit VM. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308.
- Badolato R, Wang JM, Murphy WJ, Lloyd AR, Michiel DF, Bausserman LL, Kelvin DJ, Oppenheim JJ (1994) Serum amyloid A is a chemoattractant: induction of migration, adhesion, and tissue infiltration of monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med.* 180:203-209
- Bagge U, Amundson B, Lauritzen C (1980) White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta Physiol Scand* 108:159-163
- Baggiolini M, Dewald B, Moser B (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* 15:675-705
- Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Munzel T, Simoons ML, Hamm CW; CAPTURE Investigators. (2003) Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 108:1440-1445
- Ballou SP, Lozanski G (1992) Induction of inflammatory cytokine release from cultured human monocytes by C-reactive protein. *Cytokine* 4:361-368

- Bapat S, Verkleij A, Post JA (2001) Peroxynitrite activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) via a MEK-independent pathway: a role for protein kinase C. *FEBS Lett.* 499:21-26
- Bazzoni G, Martinez Estrada O, Dejana E (1999) Molecular structure and functional role of vascular tight junctions. *Trends Cardiovasc Med.* 9:147-152
- Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364:584
- Behrendt D, Ganz P (2002) Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 90:40L-48L
- Berton G (1999a) Tyrosine kinases in neutrophils. *Curr Opin Hematol* 6:51-58
- Berton G (1999b) Degranulation, 3rd Ed. In: Gallin JI and Snyderman R editors. *Inflammation: Basic principles and clinical correlates.* Lippincott Williams and Wilkins 703
- Bharadwaj D, Mold C, Markham E, Du Clos TW (2001) Serum amyloid P component binds to Fc gamma receptors and opsonizes particles for phagocytosis. *J Immunol* 166:6735-6741
- Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW (1999) The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is fgamma receptor II. *J Exp Med* 190:585-590
- Bhatt DL, Topol EJ (2003) Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2:15-28.
- Boekholdt SM, Peters RJ, Hack CE, Day NE, Luben R, Bingham SA, Wareham NJ, Reitsma PH, Khaw KT (2004) IL-8 plasma concentrations and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1503-1508

- Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA (1998) A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 101:353-363
- Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A (2003) Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:168-75
- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998) Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394:894-897
- Brennan ML, Wu W, Fu X, Shen Z, Song W, Frost H, Vadseth C, Narine L, Lenkiewicz E, Borchers MT, Lusis AJ, Lee JJ, Lee NA, Abu-Soud HM, Ischiropoulos H, Hazen SL (2002) A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *J Biol Chem.* 277:17415-17427
- Brown SB, Savill J. (1999) Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes. *J. Immunol.* 162: 480-485.
- Buffon A, Biasucci LM, Liuzzo G, D'Onofrio G, Crea F, Maseri A (2002) Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med* 347:5-12
- Burns AR, Bowden RA, Abe Y, Walker DC, Simon SI, Entman ML and Smith CW (1999) P-selectin mediates neutrophils adhesion to endothelial cell borders. *J Leukoc Biol* 65:299-306
- Burns AR, Simon SI, Kukielka GL, Rowen JL, Lu H, Mendoza LH, Brown ES, Entman ML, Smith CW (1996) Chemotactic factors stimulate CD18-dependent canine neutrophil adherence and motility on lung fibroblasts. *J Immunol.* 156:3389-3401

- Butcher EC (1991) Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67:1033-1036
- Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87:840-844
- Calabro P, Chang DW, Willerson JT, Yeh ET (2005) Release of C-reactive protein in response to inflammatory cytokines by human adipocytes: linking obesity to vascular inflammation. *J Am Coll Cardiol.* 46:1112-1113
- Calabro P, Willerson JT, Yeh ET (2003) Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 108:1930-1932
- Carveth HJ, Bohnsack JF, McIntyre TM, Baggiolini M, Prescott SM, Zimmerman GA (1989) Neutrophil activating factor (NAF) induces polymorphonuclear leukocyte adherence to endothelial cells and to subendothelial matrix proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 162:387-393
- Chi L, Li Y, Stehno-Bittel L, Gao J, Morrison DC, Stechschulte DJ, Dileepan KN (2001) Interleukin-6 production by endothelial cells via stimulation of protease-activated receptors is amplified by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res.* 21:231-240
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91:3527-61
- Ciubotaru I, Potempa LA, Wander RC (2005) Production of modified C-reactive protein in U937-derived macrophages. *Exp Biol Med* 230:762-770

- Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80:2012-2020
- Cox G, Crossley J, Xing Z (1995) Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute and pulmonary inflammation in vivo. *Am J Resp Cell Mol Biol* 12:232-237
- Cuthbertson BH, Galley HF, Webster NR (1998) The effects of nitric oxide and peroxynitrite on interleukin-8 and elastase from lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Anesth Analg.* 86:427-431
- Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminathan RV, Peng L, Chen Z, Seifert P, Fay WP, Simon DI, Edelman ER (2003) Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation* 108:512-515
- Danesh MB, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GDO, Pepys MB, Gudnason V, (2004) C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350:1387-1397
- Daniel NN, Korsmeyer SJ. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205-219.
- Davis B, Zou MH (2005) CD40 ligand-dependent tyrosine nitration of prostacyclin synthase in vivo. *Circulation* 112:2184-2192
- Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N (1999) Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 143:205-211
- Dejana E (1996) Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest.* 98:1949-1953

- Dejana E, Corada M, Lampugnani MG (1995) Endothelial cell-to-cell junctions. *FASEB J.* 9:910-918
- Depre C, Havaux X, Renkin J, Vanoverschelde JL, Wijns W (1999) Expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary atherosclerotic plaque. *Cardiovasc Res.* 41:465-472
- Detmers PA, Lo SK, Olsen-Egbert E, Walz A, Baggiolini M, Cohn ZA (1990) Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J Exp Med.* 171:1155-1162
- Devaraj S, Kumaresan PR, Jialal I (2004) Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 36:405-410
- Dewas C, Fay M, Gougerot-Pocidallo MA, El-Benna J (2000) The mitogen-activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced p47phox phosphorylation in human neutrophils. *J Immunol.* 165:5238-5244
- Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA (1996) Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood* 88:146-157
- Diehl EE, Haines GK 3rd, Radosevich JA, Potempa LA (2000) Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue. *Am J Med Sci.* 319:79-83
- Dinerman JL, Mehta JL, Saldeen TG, Emerson S, Wallin R, Davda R, Davidson A. (1990) Increased neutrophil elastase release in unstable angina pectoris and acute myocardial infarction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 15:1559-1563

- Dorsam RT, Kunapuli SP (2004) Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *J. Clin. Invest.* 113: 341–345
- Duclos TW (2000) Function of C-reactive protein. *Ann Med* 32:274-278
- Dransfield I, Stocks SC, Haslett C. (1995) Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* 85: 3264-3273.
- Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, van der Vliet A (1998) Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 391:393-397
- Elsbach P, Weiss J (1998) Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defence. *Curr Opin Immunol.* 10:45-49
- Entman ML, Ballantyne CM (1996) Association of neutrophils with platelet aggregates in unstable angina. Should we alter therapy? *Circulation* 94:1206-1208
- Esaki T, Hayashi T, Muto E, Kano H, Kumar TN, Asai Y, Sumi D, Iguchi A (2000) Expression of inducible nitric oxide synthase and Fas/Fas ligand correlates with the incidence of apoptotic cell death in atheromatous plaques of human coronary arteries. *Nitric Oxide* 4:561-571
- Esmon CT (2000) The endothelial cell protein C receptor. *Thromb Haemost.* 83:639-43
- Fauve RM, (1980) Inflammation and natural immunity. In: Fougreau M and Dausset J editors. Progress in immunology IV. *Academic Press, London* 737
- Fecho K, Cohen PL. (1998) Fas ligand (gld)- and Fas (lpr)-deficient mice do not show alterations in the extravasation or apoptosis of inflammatory neutrophils. *J Leukoc Biol.* 64: 373-383

- Fiedel BA, Gewurz H (1976) Effects of C-reactive protein on platelet function. II. Inhibition by CRP of platelet reactivities stimulated by poly-L-lysine, ADP, epinephrine, and collagen. *J Immunol.* 117:1073-1078
- Filep J, Foldes-Filep E (1989) Effects of C-reactive protein on human neutrophil granulocytes challenged with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and platelet-activating factor. *Life Sci* 44:517-524
- Foresti R, Sarathchandra P, Clark JE, Green CJ, Motterlini R (1999) Peroxynitrite induces haem oxygenase-1 in vascular endothelial cells: a link to apoptosis. *Biochem J.* 339:729-736
- Freedman JE, Ting B, Hankin B, Loscalzo J, Keaney JF Jr, Vita JA (1998) Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* 98:1481-1486
- Fu T, Borensztajn J (2002) Macrophage uptake of low-density lipoprotein bound to aggregated C-reactive protein: possible mechanism of foam-cell formation in atherosclerotic lesions. *Biochem J.* 366:195-201
- Gabay C, Kushner I (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340:448-454
- Galinanes M, Matata BM (2002) Protein nitration is predominantly mediated by a peroxynitrite-dependent pathway in cultured human leucocytes. *Biochem J.* 367:467-473
- Galis ZS, Khatri JJ (2002) Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly. *Circ Res.* 90:251-262

- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 94:2493-2503
- Garlichs CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, Karl M, Goppelt-Struebe M, Schmieder R, Daniel WG (2001) Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation.* 104:2395-400
- Gawaz M (2004) Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 61:498-511
- Gershov D, Kim S, Brot N, Elkon KB (2000) C-reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med* 192:1353-1364
- Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A (1999) MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398:718-723
- Gewurz H, Zhang XH, Lint TF (1995) Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol* 7:54-64
- Gilula NB, Reeves OR, Steinbach A. (1972) Metabolic coupling, ionic coupling, and cell contacts. *Nature* 235: 262-265
- Go YM, Patel RP, Maland MC, Park H, Beckman JS, Darley-Usmar VM, Jo H (1999) Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of c-Jun NH₂-terminal kinase. *Am J Physiol.* 277:H1647-H1653

- Gould JM, Weiser JN (2001) Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract. *Infect Immun.* 69:1747-54
- Gow AJ, Duran D, Malcolm S, Ischiropoulos H (1996) Effects of peroxynitrite-induced protein modifications on tyrosine phosphorylation and degradation. *FEBS Lett.* 385:63-66
- Greenstein S, Barnard J, Zhou K, Fong M, Hendey B. (2000) Fas activation reduces neutrophil adhesion to endothelial cells. *J Leukoc Biol.* 68:715-722
- Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S (1994) Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest.* 94:2407-2413
- Haverkate F, Thompson SG, Pyke SD, Gallimore JR, Pepys MB (1997) Production of C-reactive protein and risk of coronary events in stable and unstable angina. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *Lancet* 349:462-466
- Hazen SL, Zhang R, Shen Z, Wu W, Podrez EA, MacPherson JC, Schmitt D, Mitra SN, Mukhopadhyay C, Chen Y, Cohen PA, Hoff HF, Abu-Soud HM (1999) Formation of nitric oxide-derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes: pathways for monocyte-mediated protein nitration and lipid peroxidation In vivo. *Circ Res.* 85:950-958
- Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391:591-594

- Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schror K, Weber AA (2001) Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 12:74-82
- Heuertz RM, Piquette CA, Webster RO (1993) Rabbits with elevated serum C-reactive protein exhibit diminished neutrophil infiltration and vascular permeability in C5a-induced alveolitis. *Am J Pathol* 142:319-328
- Heuertz RM, Schneider GP, Potempa LA, Webster RO (2005) Native and modified C-reactive protein bind different receptors on human neutrophils. *Int J Biochem Cell Biol.* 37:320-335
- Hirschfield GM, Gallimore JR, Kahan MC, Hutchinson WL, Sabin CA, Benson GM, Dhillon AP, Tennent GA, Pepys MB (2005) Transgenic human C-reactive protein is not proatherogenic in apolipoprotein E-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8309-8314
- Holmes WE, Lee J, Kuang WJ, Rice GC, Wood WI (1991) Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science* 253:1278-1280
- Hooper DC, Bagasra O, Marini JC, Zborek A, Ohnishi ST, Kean R, Champion JM, Sarker AB, Bobroski L, Farber JL, Akaike T, Maeda H, Koprowski H (1997) Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:2528-2533
- Huber AR, Kunkel SL, Todd RF 3rd, Weiss SJ (1991) Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 254:99-102
- Huie RE, Padmaja S (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun.* 18:195-199

- Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J (2002) Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circ Res.* 90:21-28
- Iho S, Tanaka Y, Takauji R, Kobayashi C, Muramatsu I, Iwasaki H, Nakamura K, Sasaki Y, Nakao K, Takahashi T (2003) Nicotine induces human neutrophils to produce IL-8 through the generation of peroxynitrite and subsequent activation of NF-kappaB. *J Leukoc Biol.* 74:942-951
- Ischiropoulos H (1998) Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys.* 356:1-11
- Jabs WJ, Logering BA, Gerke P, Kreft B, Wolber EM, Klinger MH, Fricke L, Steinhoff J (2003) The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. *Eur J Immunol.* 33:152-161
- Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA (2000) Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB. *Free Radic Biol Med.* 28:1317-1327
- Jones SA, Wolf M, Qin S, Mackay CR, Baggiolini M (1996) Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:6682-6686
- Jozsef L, Khreiss T, Filep JG (2003) Nitrosative/peroxidative stress as an intracellular signaling mechanism: A role for peroxynitrite. *Recent Res Devel Biochem.* 4:97-111.
- Jozsef L, Khreiss T, El-Kebir D, Filep JG (2006) Bacterial DNA induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils. *J Immunol.* (In press).

- Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Lango DL, Jameson JL (2005) Harrison's principles of internal medicine 16th ed. The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Kato H (2002) Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:539-548
- Kato K, Matsubara T, Iida K, Suzuki O, Sato Y (1999) Elevated levels of pro-inflammatory cytokines in coronary artery thrombi. *Int J Cardiol.* 70:267-273
- Kew RR, Hyers TM, Webster RO (1990) Human C-reactive protein inhibits neutrophil chemotaxis in vitro: possible implications for the adult respiratory distress syndrome. *J Lab Clin Med.* 115:339-345
- Khreiss T, Jozsef L, Hossain S, Chan JS, Potempa LA, Filep JG (2002) Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *J Biol Chem.* 277:40775-40781
- Kilpatrick JM, Volanakis JE (1985) Opsonic properties of C-reactive protein. Stimulation by phorbol myristate acetate enables human neutrophils to phagocytize C-reactive protein-coated cells. *J Immunol.* 134:3364-3370
- Kinlay S, Libby P, Ganz P (2001) Endothelial function and coronary artery disease. *Curr Opin Lipidol.* 12:383-389
- Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, Koppenol WH (1997) Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser flash photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis. *Chem Res Toxicol.* 10:1285-1292
- Klebanoff SJ (1992) Oxygen metabolites from phagocytes. In: Gallin JI, Goldstein IM and Snyderman R editors. Inflammation: basic principles and clinical correlates. *Raven Press, New-York* 541

- Klein JB, Rane MJ, Scherzer JA, Coxon PY, Kettritz R, Mathiesen JM, Buridi A, McLeish KR (2000) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J Immunol.* 164:4286-4291
- Klotz LO, Schroeder P, Sies H (2002) Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radic Biol Med.* 33:737-743
- Knall C, Young S, Nick JA, Buhl AM, Worthen GS, Johnson GL (1996) Interleukin-8 regulation of the Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase pathway in human neutrophils. *J Biol Chem.* 271:2832-2838
- Koj A (1996) Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines. *Biochim Biophys Acta.* 1317:84-94
- Kong SK, Yim MB, Stadtman ER, Chock PB (1996) Peroxynitrite disables the tyrosine phosphorylation regulatory mechanism: Lymphocyte-specific tyrosine kinase fails to phosphorylate nitrated cdc2(6-20)NH₂ peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3377-3382
- Konstantopoulos K, Neelamegham S, Burns AR, Hentzen E, Kansas GS, Snapp KR, Berg EL, Hellums JD, Smith CW, McIntire LV, Simon SI (1998) Venous levels of shear support neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in blood via P-selectin and beta2-integrin. *Circulation* 98:873-882
- Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radic Biol Med.* 16:149-156
- Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kothe K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. (1997) Caspase-3-generated

- fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278: 294-298
- Kroll MH, Hellums JD, McIntire LV, Schafer AI, Moake JL (1996) Platelets and shear stress. *Blood* 88:1525-1541
- Krump E, Sanghera JS, Pelech SL, Furuya W and Grinstein S (1997) Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils *J Biol Chem* 272:937-944
- Kumar NM, Gilula NB. (1996) The gap junction communication channel. *Cell* 84:381-388
- Kunz M, Hartmann A, Flory E, Toksoy A, Koczan D, Thiesen HJ, Mukaida N, Neumann M, Rapp UR, Brocker EB, Gillitzer R (1999) Anoxia-induced up-regulation of interleukin-8 in human malignant melanoma. A potential mechanism for high tumor aggressiveness. *Am J Pathol.* 155:753-763
- Lee A, Whyte MK, Haslett C (1993) Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 54:283-288
- Lee C, Miura K, Liu X, Zweier JL (2000) Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem.* 275:38965-38972
- Leervers SJ, Marshall CJ (1992) Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. *EMBO J.* 11:569-574
- Lehrer RI, Ganz T (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol.* 11:23-27

- Li SH, Szmitko PE, Weisel RD, Wang CH, Fedak PW, Li RK, Mickle DA, Verma S (2004) C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells. *Circulation* 109:833-836
- Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105:1135-1143
- Libby P, Simon DI (2001) Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation* 103:1718-1720
- Libersan D, Merhi Y (2003) Platelet P-selectin expression: requirement for protein kinase C, but not protein tyrosine kinase or phosphoinositide 3-kinase. *Thromb Haemost.* 89:1016-1023
- Liles WC, Klebanoff SJ (1995) Regulation of apoptosis in neutrophils-Fas track to death? *J Immunol.* 155:3289-3291
- Lin CS, Xia D, Yun JS, Wagner T, Magnuson T, Mold C, Samols D (1995) Expression of rabbit C-reactive protein in transgenic mice. *Immunol Cell Biol.* 73:521-531
- Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, Grillo RL, Rebuffi AG, Pepys MB, Maseri A (1994) The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. *N Engl J Med.* 331:417-424
- Lo SK, Janakidevi K, Lai L, Malik AB (1993) Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am J Physiol.* 264:L406-412
- Loscalzo J (2001) Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 88:756-762
- Luster AD (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 338:436-445

- Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Graber P, Alouani S, Esposito B, Humbert Y, Chvatchko Y, Tedgui A (2001) Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ Res.* 89:E41-E45
- Marin V, Farnarier C, Gres S, Kaplanski S, Su MS, Dinarello CA, Kaplanski G (2001) The p38 mitogen-activated protein kinase pathway plays a critical role in thrombin-induced endothelial chemokine production and leukocyte recruitment. *Blood* 98:667-673
- Matsushima K, Morishita K, Yoshimura T, Lavu S, Kobayashi Y, Lew W, Appella E, Kung HF, Leonard EJ, Oppenheim JJ (1988) Molecular cloning of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF) and the induction of MDNCF mRNA by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 167:1883-1893
- Mazzucato M, Spessotto P, Masotti A, De Appollonia L, Cozzi MR, Yoshioka A, Perris R, Colombatti A, De Marco L (1998) Identification of domains responsible for von Willebrand factor type VI collagen interaction mediating platelet adhesion under high flow. *J Biol Chem.* 274:3033-3041
- McCarty M (1982) Historical perspective on C-reactive protein. *Ann N Y Acad Sci.* 389:1-10
- Michiels C (2003) Endothelial cell functions *J Cell Physiol.* 196: 430-443
- Mickelson JK, Lakkis NM, Villarreal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW (1996) Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol.* 28:345-353

- Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A (1997) Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91:385-395
- Miyazawa K, Kiyono S, Inoue K (1988) Modulation of stimulus-dependent human platelet activation by C-reactive protein modified with active oxygen species. *J Immunol.* 141:570-574
- Mold C, Gewurz H (1981) Inhibitory effect of C-reactive protein on alternative C pathway activation by liposomes and *Streptococcus pneumoniae*. *J Immunol.* 127:2089-2092
- Moncada S (1999) Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. *J R Soc Med.* 92:164-169
- Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G (2000) Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev.* 80:1669-1699
- Moreau M, Brocheriou I, Petit L, Ninio E, Chapman MJ, Rouis M (1999) Interleukin-8 mediates downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in cholesterol-loaded human macrophages: relevance to stability of atherosclerotic plaque. *Circulation* 99:420-426
- Morrow DA, Ridker PM (2000) C-reactive protein, inflammation, and coronary risk. *Med Clin North Am.* 84:149-161
- Mortensen RF, Zhong W (2000) Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. *J Leukoc Biol.* 67:495-500
- Mukaida N (2000) Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation. *Int J Hematol.* 72:391-398

- Mukaida N (2003) Pathophysiological roles of interleukin-8/CXCL8 in pulmonary diseases. *Am J Physiol.* 284:L566-L577
- Mukaida N, Harada A, Yasumoto K, Matsushima K (1992) Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). *Microbiol Immunol.* 36:773-789
- Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K (1994) Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 56:554-558
- Mul FP, Zuurbier AE, Janssen H, Calafat J, van Wetering S, Hiemstra PS, Roos D, Hordijk PL (2000) Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. *J Leukoc Biol.* 68:529-537
- Muller T, Haussmann HJ, Schepers G (1997) Evidence for peroxynitrite as an oxidative stress-inducing compound of aqueous cigarette smoke fractions. *Carcinogenesis.* 18:295-301
- Murdoch C (2000) CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev.* 177:175-184
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA (2000) International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.* 52:145-176
- Murphy PM, Tiffany HL (1991) Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. *Science* 253:1280-1283
- Murray CJ, Lopez AD (1997) Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 349:1436-1442

- Nakanishi-Matsui M, Zheng YW, Sulciner DJ, Weiss EJ, Ludeman MJ, Coughlin SR (2000) PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* 404:609-613
- Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR (2003) Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 107:1123-1128
- Nerurkar SS, McDevitt PJ, Scott GF, Johanson KO, Willette RN, Yue TL (2005) Lipopolysaccharide (LPS) contamination plays the real role in C-reactive protein-induced IL-6 secretion from human endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:e136
- Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schomig A (1997) Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 95:2387-2394
- Neumann FJ, Ott I, Marx N, Luther T, Kenngott S, Gawaz M, Kotzsch M, Schomig A (1997) Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:3399-3405
- Nick JA, Avdi NJ, Toung NK, Knall C, Gerewins P, Johnson GL, Worthen GS (1997) Common and distinct intracellular signaling pathways in human neutrophils utilized by platelet activated factor and FMLP. *J Clin Invest.* 99:975-986
- Nielsen VG, Crow JP, Zhou F, Parks DA (2004) Peroxynitrite inactivates tissue plasminogen activator. *Anesth Analg.* 98:1312-1317
- Nieuwenhuis HK, Akkerman JW, Houdijk WP, Sixma JJ (1985) Human blood platelets showing no response to collagen fail to express surface glycoprotein Ia. *Nature* 318:470-472

- Nieuwenhuis HK, Sakariassen KS, Houdijk WP, Nievelstein PF, Sixma JJ (1986) Deficiency of platelet membrane glycoprotein Ia associated with a decreased platelet adhesion to subendothelium: a defect in platelet spreading. *Blood* 68:692-695
- Nurden AT, Nurden P (2003) Advantages of fast-acting ADP receptor blockade in ischemic heart disease *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23 :158–159
- Oh-Hashi K, Maruyama W, Isobe K (2001) Peroxynitrite induces GADD34, 45, and 153 VIA p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med.* 30:213-221
- Oh-hashish K, Maruyama W, Yi H, Takahashi T, Naoi M, Isobe K (1999) Mitogen-activated protein kinase pathway mediates peroxynitrite-induced apoptosis in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 263:504-509
- Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol.* 9:617-648
- Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A (1996) Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 94:1239-1246
- Ottonello L, Frumento G, Arduino N, Bertolotto M, Dapino P, Mancini M, Dallegri F (2002) Differential regulation of spontaneous and immune complex-induced neutrophil apoptosis by proinflammatory cytokines. Role of oxidants, Bax and caspase-3. *J Leukoc Biol.* 72:125-132

- Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET, Chen JS (2001) Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 103:2531-2534
- Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET (2000) Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* 102:2165-2168
- Paul A, Ko KW, Li L, Yechoor V, McCrory MA, Szalai AJ, Chan L (2004) C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109:647-655
- Pepys MB (1981) C-reactive protein fifty years on. *Lancet* 1:653-657
- Pepys MB, Baltz ML (1983) Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.* 34:141-212
- Pepys MB, Hawkins PN, Kahan MC, Tennent GA, Gallimore JR, Graham D, Sabin CA, Zychlinsky A, de Diego J (2005) Proinflammatory effects of bacterial recombinant human C-reactive protein are caused by contamination with bacterial products, not by C-reactive protein itself. *Circ Res.* 97:e97-e103
- Peveri P, Walz A, Dewald B, Baggiolini M (1988) A novel neutrophil-activating factor produced by human mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 167:1547-1559
- Pillinger MH, Feoktistov AS, Capodici C, Solitar B, Levy J, Oei TT, Philips MR (1996) Mitogen-activated protein kinase in neutrophils and enucleate neutrophil cytoplasts: evidence for regulation of cell-cell adhesion. *J Biol Chem.* 271:12049-56
- Podrez EA, Schmitt D, Hoff HF, Hazen SL (1999) Myeloperoxidase-generated reactive nitrogen species convert LDL into an atherogenic form in vitro. *J Clin Invest.* 103:1547-1560

- Potempa LA, Siegel JN, Fiedel BA, Potempa RT, Gewurz H (1987) Expression, detection and assay of a neoantigen (Neo-CRP) associated with a free, human C-reactive protein subunit. *Mol Immunol.* 24:531-541
- Premack BA, Schall TJ (1996) Chemokine receptors: Gateways to inflammation and infection. *Nat Med.* 2:1174-1178
- Ptasznik A, Prossnitz ER, Yoshikawa D, Smreka A, Traynor-Kaplan AE, Bokosh GM (1996) A tyrosine kinase signaling pathway accounts for the majority of phosphatidylinositol 3:4,5-triphosphate formation in chemoattractant-stimulated human neutrophils. *J Biol Chem.* 271:25204-25207
- Quinn MJ, Plow EF, Topol EJ (2002) Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: recognition of a two-edged sword? *Circulation* 106:379-385
- Rahman A, Anwar KN, Uddin S, Xu N, Ye RD, Plataniias LC, Malik AB (2001) Protein kinase C-delta regulates thrombin-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol.* 21:5554-5565
- Rees RF, Gewurz H, Siegel JN, Coon J, Potempa LA (1988) Expression of a C-reactive protein neoantigen (neo-CRP) in inflamed rabbit liver and muscle. *Clin Immunol Immunopathol.* 48:95-107
- Reifenberg K, Lehr HA, Baskal D, Wiese E, Schaefer SC, Black S, Samols D, Torzewski M, Lackner KJ, Husmann M, Blettner M, Bhakdi S (2005) Role of C-reactive protein in atherogenesis: can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1641-1646

- Renshaw SA, Timmons SJ, Eaton V, Usher LR, Akil M, Bingle CD, Whyte MK. (2000) Inflammatory neutrophils retain susceptibility to apoptosis mediated via the Fas death receptor. *J Leukoc Biol.* 67: 662-668
- Revel J-P, Karnovsky M. (1967) Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol.* 33: C7-C12
- Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH (1998) Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 98:731-733
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH (1997) Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med.* 336:973-979
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N (2000) C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 342:836-843
- Rieu P, Amaout MA (1996) The structural basis and regulation of β_2 -integrin interactions. In: Ward P, Fanton JC and Lenfant C editors. Lung biology and health and disease 89:1-42
- Robbins DJ, Cheng M, Zhen E, Vanderbilt CA, Feig LA, Cobb MH (1992) Evidence for a Ras-dependent extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6924-6928
- Rollins BJ (1997) Chemokines. *Blood* 90:909-928

- Romo GM, Dong JF, Schade AJ, Gardiner EE, Kansas GS, Li CQ, McIntire LV, Berndt MC, Lopez JA (1999) The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin. *J Exp Med.* 190:803-14
- Romuk E, Skrzep-Poloczek B, Wojciechowska C, Tomasik A, Birkner E, Wodniecki J, Gabrylewicz B, Ochala A, Tendera M (2002) Selectin-P and interleukin-8 plasma levels in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest.* 32:657-661
- Rowe SJ, Allen L, Ridger VC, Hellewell PG, Whyte MK (2002) Caspase-1-deficient mice have delayed neutrophil apoptosis and a prolonged inflammatory response to lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Immunol.* 169:6401-6407
- Ruggeri ZM (2002) Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 8:1227-1234
- Saelman EU, Nieuwenhuis HK, Hese KM, de Groot PG, Heijnen HF, Sage EH, Williams S, McKeown L, Gralnick HR, Sixma JJ (1994) Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin). *Blood* 83:1244-1250
- Sako D, Chang XJ, Barone KM, Vachino G, White HM, Shaw G, Veldman GM, Bean KM, Ahern TJ, Furie B, et al. (1993) Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* 75:1179-1186
- Samanta AK, Oppenheim JJ, Matsushima K (1990) Interleukin 8 (monocyte-derived neutrophil chemotactic factor) dynamically regulates its own receptor expression on human neutrophils. *J Biol Chem.* 265:183-189
- Sanchez-Mejorada G, Rosales C (1998) Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol.* 63:521-533

- Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T (2002) The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1. *J Exp Med.* 196:679-691
- Savill J (1997) Apoptosis in resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* 61:375-380
- Scheel-Toellner D, Wang KQ, Webb PR, Wong SH, Craddock R, Assi LK, Salmon M, Lord JM. (2004) Early events in spontaneous neutrophil apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 32: 461-464
- Schieke SM, Briviba K, Klotz LO, Sies H (1999) Activation pattern of mitogen-activated protein kinases elicited by peroxynitrite: attenuation by selenite supplementation. *FEBS Lett.* 448:301-303
- Schonbeck U, Libby P (2001) CD40 signaling and plaque instability. *Circ Res.* 89:1092-1103
- Schnittler HJ (1998) Structural and functional aspects of intercellular junctions in vascular endothelium. *Basic Res Cardiol.* 93:30-9
- Schroder JM, Christophers E (1989) Secretion of novel and homologous neutrophil-activating peptides by LPS-stimulated human endothelial cells. *J Immunol.* 142:244-251
- Schwedler SB, Amann K, Wernicke K, Krebs A, Nauck M, Wanner C, Potempa LA, Galle J (2005) Native C-reactive protein increases whereas modified C-reactive protein reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation* 112:1016-1023
- Sealand E, van Royen A, Hendriksen K, Vilé-Weekhout H, Rijkers GT, Sanders LAM, van de Winkel JGJ (2001) Human C-reactive protein does not bind to FC γ RIIa on phagocytic cells. *J Clin Invest.* 107: 641-642

- Servant G, Weiner OD, Herzmark P, Balla T, Sedat JW, Bourne HR (2000) Polarization of chemoattractant receptor signaling during neutrophil chemotaxis. *Science* 287:1037-1040
- Shephard EG, Anderson R, Rosen O, Myer MS, Fridkin M, Strachan AF, De Beer FC (1990) Peptides generated from C-reactive protein by a neutrophil membrane protease. Amino acid sequence and effects of peptides on neutrophil oxidative metabolism and chemotaxis. *J Immunol.* 145:1469-1476
- Shin WS, Szuba A, Rockson SG (2002) The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis* 160:91-102
- Siegel J, Rent R, Gewurz H (1974) Interactions of C-reactive protein with the complement system. I. Protamine-induced consumption of complement in acute phase sera. *J Exp Med.* 140:631-647
- Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, Lopez JA (2000) Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 192:193-204
- Singh U, Devaraj S, Jialal I (2005) C-reactive protein decreases tissue plasminogen activator activity in human aortic endothelial cells: evidence that C-reactive protein is a procoagulant. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:2216-2221
- Sligh JE Jr, Ballantyne CN, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL (1993) Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:8529-8533
- Smith CW, Marlin SD, Rothlein R, Toman C, Anderson DC (1989) Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in

facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro.

J Clin Invest. 83:2008-2017

Spitznagel JK (1990) Antibiotic proteins of human neutrophils. *J Clin Invest.* 86:1381-1386

Steeber DA, Venturi GM, Tedder TF (2005) A new twist to the leukocyte adhesion cascade: intimate cooperation is key. *Trends Immunol.* 26:9-12

Steel DM, Whitehead AS (1994) The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today.* 15:81-88

Stein MP, Edberg JC, Kimberly RP, Mangan EK, Bharadwaj D, Mold C, Du Clos TW (2000b) C-reactive protein binding to FcγRIIa on human monocytes and neutrophils is allele-specific. *J Clin Invest.* 105:369-376

Stein MP, Mold C, Du Clos TW (2000a) C-reactive protein binding to murine leukocytes requires Fc gamma receptors. *J Immunol.* 164:1514-1520

Stern DM, Esposito C, Gerlach H, Gerlach M, Ryan J, Handley D, Nawroth P (1991) Endothelium and regulation of coagulation. *Diabetes Care.* 14:160-166

Stewart M, Hogg N (1996) Regulation of leukocyte integrin function: affinity vs. avidity. *J Cell Biochem.* 61:554-561

Strieter RM, Kunkel SL, Showell HJ, Remick DG, Phan SH, Ward PA, Marks RM (1989) Endothelial cell gene expression of a neutrophil chemotactic factor by TNF-α, LPS, and IL-1 β. *Science* 243:1467-1469

Suzuki M, Inauen W, Kvietys PR, Grisham MB, Meininger C, Schelling ME, Granger HJ, Granger DN (1998) Superoxide mediates reperfusion-induced leukocyte-endothelial cell interactions. *Am J Physiol.* 257:H1740-1745

- Szabo C (1996) The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock* 6:79-88
- Szalai AJ, Nataf S, Hu XZ, Barnum SR (2002) Experimental allergic encephalomyelitis is inhibited in transgenic mice expressing human C-reactive protein. *J Immunol.* 168:5792-5797
- Takahashi T, Hato F, Yamane T, Fukumasu H, Suzuki K, Ogita S, Nishizawa Y, Kitagawa S (2001) Activation of human neutrophil by cytokine-activated endothelial cells. *Circ Res.* 88:422-429
- Talley JD (2001) Clinical trials of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *J Interv Cardiol.* 14:129-42
- Taylor KE, Giddings JC, van den Berg CW (2005) C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1225-1230
- Taylor AD, Neelamegham S, Hellums JD, Smith CW, Simon SI (1996) Molecular dynamics of the transition from L-selectin- to beta 2-integrin-dependent neutrophil adhesion under defined hydrodynamic shear. *Biophys J.* 71:3488-3500
- Topham MK, Carveth HJ, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA (1998) Human endothelial cells regulate polymorphonuclear leukocyte degranulation. *FASEB J.* 12:733-746
- Trion A, de Maat MP, Jukema JW, van der Laarse A, Maas MC, Offerman EH, Havekes LM, Szalai AJ, Princen HM, Emeis JJ (2005) No effect of C-reactive protein on early atherosclerosis development in apolipoprotein E*3-leiden/human C-reactive protein transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25:1635-1640

- Ueda S, Ikeda U, Yamamoto K, Takahashi M, Nishinaga M, Nago N, Shimada K (1996) C-reactive protein as a predictor of cardiac rupture after acute myocardial infarction. *Am Heart J.* 131:857-60
- van den Berg CW, Taylor KE, Lang D (2004) C-reactive protein-induced in vitro vasorelaxation is an artefact caused by the presence of sodium azide in commercial preparations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:e168-e171
- Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P, Jialal I (2002) Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation* 106:1439-1441
- Verma S, Anderson TJ (2002) Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 105:546-549
- Verma S, Li SH, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PW, Li RK, Dhillon B, Mickle DA (2002) Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 105:1890-1896
- Verma S, Szmitko PE, Yeh ETH, (2004) C-reactive protein: structure affects function. *Circulation* 109:1914-1917
- Verma S, Wang CH, Li SH, Dumont AS, Fedak PW, Badiwala MV, Dhillon B, Weisel RD, Li RK, Mickle DA, Stewart DJ (2002) A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. *Circulation* 106:913-929
- Vestweber D (2000) Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol.* 190:281-291
- Vigo C (1985) Effect of C-reactive protein on platelet-activating factor-induced platelet aggregation and membrane stabilization. *J Biol Chem.* 260:3418-3422

- Villunger A, O'Reilly LA, Holler N, Adams J, Strasser A. (2000) Fas ligand, Bcl-2, granulocyte colony-stimulating factor, and p38 mitogen-activated protein kinase: Regulators of distinct cell death and survival pathways in granulocytes. *J Exp Med.* 192: 647-658
- Vivekananthan DP, Patel VB, Moliterno DJ (2002) Glycoprotein IIb/IIIa antagonism and fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *J Interv Cardiol.* 15:131-139
- Waehre T, Damas JK, Gullestad L, Holm AM, Pedersen TR, Arnesen KE, Torsvik H, Froland SS, Semb AG, Aukrust P (2003) Hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors down-regulate chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 41:1460-1467
- Wagner DD (1993) The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemost.* 70:105-110
- Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ (1982) Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 95:355-360
- Wagner DD, Saffaripour S, Bonfanti R, Sadler JE, Cramer EM, Chapman B, Mayadas TN (1991) Induction of specific storage organelles by von Willebrand factor propeptide. *Cell* 64:403-413
- Wang HW, Sui SF (2001) Dissociation and subunit rearrangement of membrane-bound human C-reactive proteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 288: 75-79
- Wang JM, Sica A, Peri G, Walter S, Padura IM, Libby P, Ceska M, Lindley I, Colotta F, Mantovani A (1991) Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin-8 by cytokine-activated human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 11:1166-1174

- Ward PA (1999) The acute inflammatory response and its regulation. *Arch Surg.* 134:666-669
- Watson C, Whittaker S, Smith N, Vora AJ, Dumonde DC, Brown KA (1996) IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes. *Clin Exp Immunol.* 105:112-119
- Watson RW, O'Neill A, Brannigen AE, Coffi R, Marshall JC, Brady HR, Fitzpatrick JN (1999) Regulation of Fas antibody induced neutrophil apoptosis is both caspase and mitochondrial dependent. *FEBS Lett.* 453:67-71
- Watson RW, Rotstein OD, Nathens AB, Parodo J, Marshall JC (1997) Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. *J Immunol.* 158:945-953
- Watson S, Berlanga O, Best D, Frampton J (2000) Update on collagen receptor interactions in platelets: is the two-state model still valid? *Platelets* 11:252-258
- Weibel E, Palade G (1964) New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J Cell Biol.* 23:101-112
- Weiss HJ, Baumgartner HR, Tschopp TB, Turitto VT, Cohen D (1978) Correction by factor VII1 of the impaired platelet adhesion to subendothelium in von Willebrand's disease. *Blood* 51:267-279
- Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 320:365-366
- Welch H, Maridonneau-Parini (1997) Lyn and Fgr are activated in distinct membranes fractions of human granulocytic cells. *Oncogene* 15:2021-2029
- Werr J, Xie X, Hedqvist P, Ruoslahti E, Lindbom L (1998) beta1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue In vivo. *J Exp Med.* 187:2091-2096

- Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C. (1993) Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol.* 150: 5124-5134.
- Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J (1999) Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study. *J Am Coll Cardiol.* 34:1975-1981
- Willecke K, Eiberger J, Degen J, Eckhardt D, Romualdi A, Gueldenagel M, Deutsch U, Soehl G. (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem.* 383: 725-737
- Woodside DG, Liu S, Ginsberg MH (2001) Integrin activation. *Thromb Haemost.* 86:316-23
- Worthen GS, Avdi N, Buhl AN, Suzuki N, Johnson GL (1994) FMLP activates Rac and Raf in human neutrophils: Potential role in activation of MAP kinase. *J Clin Invest.* 94:815-823
- Xia D, Samols D (1997) Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:2575-2580
- Xiong JP, Stehle T, Goodman SL, Arnaout MA (2003) New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* 102:1155-1159
- Xu L, Xie K, Mukaida N, Matsushima K, Fidler IJ (1999) Hypoxia-induced elevation in interleukin-8 expression by human ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 59:5822-5829
- Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL (2000) Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 887:80-99

- Ying SC, Gewurz H, Kinoshita CM, Potempa LA, Siegel JN (1989) Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies. *J Immunol.* 143:221-228
- Yoshimura T, Matsushima K, Tanaka S, Robinson EA, Appella E, Oppenheim JJ, Leonard EJ (1987) Purification of a human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor that has peptide sequence similarity to other host defense cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84:9233-9237
- Yue TL, Wang X, Sung CP, Olson B, McKenna PJ, Gu JL, Feuerstein GZ (1994) Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 75:1-7
- Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL (2001) Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA.* 286:2136-2142
- Zouki C, Baron C, Fournier A, Filep JG (1999) Endothelin-1 enhances neutrophil adhesion to human coronary artery endothelial cells: role of ET_A receptors and platelet-activating factor. *Br J Pharmacol.* 127:969-979
- Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG (1997) Prevention of In vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest.* 100:522-529
- Zouki C, Zhang SL, Chan JSD, Filep JG (2001) Peroxynitrite induces integrin-dependent adhesion of human neutrophils to endothelial cells via activation of the Raf-1/MEK/Erk pathway. *FASEB J.* 15:25-27

Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J (2001) C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* 103:1194-1197

