

Université de Montréal

**L'angiopoietine-like 2 : Un facteur circulant pro-  
oxydant et pro-inflammatoire qui contribue au  
développement de l'athérosclérose**

par

Nada Farhat

Département de Pharmacologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Doctorat  
en Pharmacologie

Avril 2013

© Nada Farhat, 2013

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :  
Angiopoietine-like 2 : Un facteur circulant pro-oxydant et pro-inflammatoire qui  
contribue au développement de l'athérosclérose

Présentée par :  
Nada Farhat

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Chantal Lambert, président-rapporteur  
Dr Eric Thorin, directeur de recherche  
Dr Jean-Philippe Gratton, membre du jury  
Dr Darren Richard, examinateur externe  
Dr Régean Couture, représentant du doyen de la FES

## Résumé

L'athérosclérose est une maladie vasculaire inflammatoire chronique qui se développe progressivement au cours de la vie. Les mécanismes impliqués sont complexes et la recherche de nouveaux candidats impliqués dans l'athérogénèse est toujours d'actualité. L'Angiopoietine-like 2 (Angptl2) est une protéine relativement peu connue, aux propriétés pro-angiogéniques et pro-inflammatoires, qui appartient par homologie à la grande famille des angiopoietines, mais dont le récepteur n'est pas encore clairement identifié. Les situations pathologiques dans lesquelles l'Angptl2 jouerait un rôle crucial sont diverses, mais sa contribution moléculaire dans le développement de l'athérosclérose est inconnue. Par differential display, nous avons initialement identifié l'Angptl2 comme étant surexprimée dans des cellules endothéliales sénescents, isolées et cultivées à partir d'artères mammaires internes de patients athérosclérotiques ayant subi un pontage coronarien. Cette découverte a été la base de mon projet, et mes objectifs ont été 1) de déterminer l'implication de l'Angptl2 vasculaire en présence de facteurs de risques tels que le tabagisme et la dyslipidémie, 2) de produire et de purifier une protéine recombinante fonctionnelle de l'Angptl2 afin d'identifier *in vitro* de nouvelles propriétés cellulaires de l'Angptl2 et 3) d'étudier *in vivo* le potentiel pro-athérogénique de l'Angptl2 recombinante dans un modèle murin de dyslipidémie sévère.

Nous avons montré que l'Angptl2 est sécrétée préférentiellement dans des conditions pro-oxydantes et pro-inflammatoires, avec une augmentation de son expression endothéliale de l'ordre de 6 fois chez des patients coronariens fumeurs atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique. Suite à ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que l'Angptl2, en plus de ses fonctions pro-inflammatoires connues, possède des propriétés pro-oxydantes. Nous avons démontré que l'Angptl2 recombinante stimule en effet la production de radicaux libres dans des HUVEC en culture, *via* l'inhibition partielle de la voie cytoprotectrice antioxydante Nrf2/HO-1 et potentiellement *via* l'activation de kinase intracellulaire de type p38.

A l'aide de souris dyslipidémiques LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB-100<sup>+/+</sup>, nous avons démontré que le niveau d'Angptl2 plasmatique, vasculaire et dans les plaques

athéromateuses, augmente parallèlement avec le développement de l'athérosclérose. De plus, une stimulation avec l'Angptl2 recombinante engendre chez ces souris une réponse inflammatoire évaluée par l'expression endothéliale de cytokines et de molécules d'adhésion et par l'infiltration de leucocytes sur l'endothélium vasculaire. Finalement, l'administration intraveineuse de la protéine recombinante d'Angptl2 pendant quatre semaines à des souris LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB-100<sup>+/+</sup> augmente de 10 fois l'expansion de la plaque athérosclérotique et double leur taux de cholestérol circulant. Nous avons aussi montré que chez des patients athérosclérotiques, l'Angptl2 plasmatique est 6 fois plus élevée que chez des sujets sains du même âge.

Nos études semblent donc définir l'Angptl2 comme un facteur contribuant directement au développement de l'athérosclérose en favorisant la sénescence, l'inflammation et l'oxydation des cellules endothéliales. Ces propriétés pourraient globalement définir l'Angptl2, non seulement comme un nouveau biomarqueur circulant de l'athérosclérose, mais également comme l'un de ses promoteurs.

**Mots-clés :** Angiopoietine-like 2 (Angptl2), athérosclérose, inflammation, oxydation, vieillissement, molécules d'adhésion, construction de l'Angptl2-GST, purification protéique, système de défense intracellulaire (Nrf2, HO-1), signalisation intracellulaire des kinases (MAPK).

## Abstract

Atherosclerosis is a chronic vascular inflammatory disease that develops gradually during life. While the control mechanisms of this disease are complex and variable, research continues to identify new protein candidates involved in atherogenesis. Angiopoietin-like2 (Angptl2) is a relatively unknown protein, recently shown to display angiogenic and pro-inflammatory properties. Based upon structural homology, Angptl2 is a member of the angiopoietin family; however, the Angptl2 receptor has not yet been clearly identified. The reported pathological situations in which Angptl2 may play a crucial role are multiple, but its molecular contribution in the development of atherosclerosis remains unknown. By differential display, we initially identified Angptl2 as being overexpressed in senescent endothelial cells, isolated and cultivated from internal mammary arteries of atherosclerotic patients undergoing coronary bypass. This observation was at the basis of my project. My specific objectives were 1) to determine the abundance of vascular Angptl2 in the presence of risk factors such as smoking and dyslipidemia, 2) to produce and purify a functional recombinant human Angptl2 protein in order to examine its effects on cellular function *in vitro*, and 3) to study the pro-atherogenic potential of Angptl2 *in vivo* using a mouse model of severe dyslipidemia.

We showed that Angptl2 is preferentially secreted under pro-oxidant and pro-inflammatory conditions, with a 6-fold increase in endothelial Angptl2 expression in smoker coronary patients with chronic obstructive pulmonary disease. Based on these results, we hypothesized that, in addition to its known pro-inflammatory functions, Angptl2 has pro-oxidant properties. Accordingly, we demonstrated that recombinant Angptl2 stimulates the production of free radicals by HUVEC, an action exerted, at least in part, by the inhibition of the cytoprotective antioxidant pathway, Nrf2/HO-1, and potentially *via* the activation of the intracellular p38 MAPK pathway.

In dyslipidemic LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB-100<sup>+/+</sup> mice, we showed that the levels of endogenous Angptl2 in plasma, vascular tissue and atherosclerotic lesions increase in

parallel with the development of atherosclerosis. In addition, stimulation with recombinant Angptl2 induces an inflammatory response, as assessed by the expression of cytokines and adhesion molecules and by infiltration of leukocytes into the vascular endothelium. Furthermore, intravenous infusion of purified recombinant Angptl2 for four weeks promoted a 10-fold increase in the formation of atherosclerotic plaques in LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB-100<sup>+/+</sup> mice and doubled their circulating cholesterol levels. Finally, we also demonstrated that plasma Angptl2 is 6-fold higher in atherosclerotic patients than in age-matched healthy subjects.

These studies therefore strongly suggest that Angptl2 could directly contribute to the development of atherosclerosis by promoting senescence, inflammation and oxidation in endothelial cells. Such properties indicate that Angptl2 may be both a new biomarker of atherosclerosis, as well as one of its contributors.

**Keywords :** Angiopoietin-like 2 (Angptl2), atherosclerosis, inflammation, oxidation, aging, adhesion molecules, construction of Angptl2-GST, protein purification, intracellular anti-oxidant defence, Nrf2, HO-1, intracellular signalling pathways of MAPK.

## Table des matières

<b>Résumé.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>v</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>vii</b>
<b>Liste des Tableaux .....</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>xii</b>
<b>Abréviations .....</b>	<b>xv</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>26</b>
<b>1.1 L'endothélium vasculaire: fonction et dysfonction.....</b>	<b>26</b>
1.1.1. Un endothélium vasculaire fonctionnel .....	27
1.1.2. Un endothélium vasculaire dysfonctionnel mène à l'athérosclérose .....	30
<b>1.2. La pathologie de l'athérosclérose .....</b>	<b>31</b>
1.2.1. Différentes théories de l'athérogenèse.....	31
1.2.2. Les facteurs hémodynamiques et la dysfonction endothéliale.....	32
1.2.3. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à l'athérosclérose .....	34
1.2.4. Quelle est l'évolution de la plaque athérosclérotique? .....	40
1.2.5. L'angiogenèse physiologique, pathologique et son rôle dans le développement de la plaque .....	52
1.2.6. Les facteurs de risque cardiovasculaires.....	59
1.2.7. Les biomarqueurs potentiels de l'athérosclérose .....	62
<b>1.3. La super famille des angiotensines-like .....</b>	<b>67</b>
1.3.1. Identification et caractérisation structurale des Angptls .....	67
1.3.2. Fonctions exercées par les Angptls .....	72
1.3.3. L'impact des fonctions métaboliques des Angptls sur les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires .....	80

<b>1.4. L'angiopéptine-like 2 (Angptl2).....</b>	<b>86</b>
1.4.1. Structure primaire et profil d'expression de l'Angptl2.....	87
1.4.2. Que connaît-on des récepteurs potentiels de l'Angptl2 ? .....	89
1.4.3. Les différentes fonctions identifiées de l'Angptl2.....	90
<b>2.1. Étude 1 : L'expression d'Angptl2 est-elle associée à la sénescence des           cellules endothéliales ?.....</b>	<b>107</b>
2.1.1. Mise en contexte .....	107
2.1.2. Les objectifs spécifiques .....	108
<b>2.2. Étude 2 : L'Angptl2 joue-t-elle un rôle dans la sénescence prématurée           induite par le stress dans les CE isolées de tissus des patients fumeurs ?           .....</b>	<b>108</b>
2.2.1. Mise en contexte .....	108
2.2.2. Hypothèse .....	108
2.2.3. Les objectifs spécifiques .....	108
<b>2.3. Étude 3 : Préparation et purification de l'Angptl2 recombinante .....</b>	<b>109</b>
2.3.1. Mise en contexte .....	109
2.3.2. Les objectifs spécifiques .....	109
<b>2.4. Étude 4 : Propriétés pro-oxydantes de l'Angptl2.....</b>	<b>109</b>
2.4.1. Mise en contexte .....	109
2.4.2. Hypothèse .....	110
2.4.3. Les objectifs spécifiques .....	110
<b>2.5. Étude 5 : Rôle spécifique de l'Angptl2 dans l'athérosclérose .....</b>	<b>110</b>
2.5.1. Mise en contexte .....	110
2.5.2. Hypothèse .....	110
2.6.1. Les objectifs spécifiques .....	111
<b>3. Résultats.....</b>	<b>112</b>
<b>3.1. Étude 1. (Résultats non publiés) : L'expression d'Angptl2 est associée à la           sénescence des cellules endothéliales .....</b>	<b>113</b>
3.1.1. Introduction.....	114
3.1.2. Matériel et méthodes.....	117
3.1.3. Résultats .....	137



3.1.4. Discussion .....	142
<b>3.2. Étude 2 : Premier Article .....</b>	<b>144</b>
3.2.1. Apport original et contribution des coauteurs.....	145
3.2.2. Manuscrit .....	147
<b>3.3. Étude 3 (article méthodologique).....</b>	<b>174</b>
<b>Préparation et purification de l'Angptl2 recombinante (Angptl2-GST) .....</b>	<b>174</b>
3.3.1. Introduction.....	175
3.3.2. Matériel et méthodes.....	175
3.3.3. Résultats.....	191
3.3.4. Discussion .....	196
<b>3.4. Étude 4 (Étude en cours) : L'Angptl2 stimule la production d'espèces réactives oxygénées et inhibe la voie cytoprotectrice contrôlée par Nrf2 dans les cellules endothéliales humaines.....</b>	<b>198</b>
3.4.1. Introduction.....	199
3.4.2. Matériel et méthodes.....	201
3.4.3. Résultats.....	205
3.4.4. Discussion .....	217
<b>3.5. Étude 5 : Deuxième Article .....</b>	<b>220</b>
<b>(Résultats publiés).....</b>	<b>220</b>
3.5.1. Apport original et contribution des coauteurs.....	221
3.5.2. Manuscrit .....	223
<b>4. Discussion .....</b>	<b>279</b>
<b>4.1. L'Angptl2 contribue-t-elle à l'athérosclérose par le biais d'une dérégulation de l'équilibre redox <i>via</i> la voie Nrf2 dans les cellules endothéliales ? .....</b>	<b>280</b>
<b>4.2. L'Angptl2 contribue-t-elle à l'athérosclérose par la modulation des mécanismes moléculaires de Nrf2 impliqués dans la réaction inflammatoire ? .....</b>	<b>281</b>
<b>4.3. La voie Nrf2/HO-1 est-elle contrôlée par les effets néfastes - inflammatoires et oxydants - de l'Angptl2 ? .....</b>	<b>283</b>

4.4. L'Angptl2 contribue-t-elle à l'athérosclérose par le biais de l'angiogenèse? .....	285
4.5. L'Angptl2 pourrait-t-elle être un ligand qui interagisse avec les récepteurs <i>Toll-Like Receptors</i> ?.....	290
4.6. Limites des travaux.....	292
5. Conclusions et perspectives.....	296
6. Références.....	301

## Liste des Tableaux

<b>Tableau I</b> Spécificités structurales et fonctionnelles des molécules d'adhésion impliquées dans le processus d'athérosclérose .....	36
<b>Tableau II</b> Résumé des différentes fonctions identifiées pour les Angptls .....	71
<b>Tableau III</b> Séquence des amorces suggérées par la compagnie <i>Clontech</i> .....	122
<b>Tableau IV</b> Séquence des amorces utilisées en QPCR.....	136
<b>Tableau V</b> Différents gènes identifiés par <i>Differential Display</i> dont l'expression est réprimée par le NAC dans les hIMAEC. ....	140
<b>Tableau VI</b> Séquence des amorces utilisées en QPCR.....	203

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> Schéma représentatif de la cascade d'adhésion des leucocytes sur l'endothélium vasculaire et des différentes molécules d'adhésion impliquées dans la pathogénèse de l'athérosclérose. ....	35
<b>Figure 2</b> Schématisation d'une molécule de LDL. ....	42
<b>Figure 3</b> Schématisation de l'expansion de la plaque athérosclérotique. ....	45
<b>Figure 4</b> Schématisation des différentes étapes possibles dans le mécanisme d'augmentation du volume de la plaque. ....	49
<b>Figure 5</b> Alignement de la séquence primaire en acides aminés de l'Angptl1 (hARP1), l'Angptl2 (hARP2), l'angiopoïétine-1(hAng1) et l'angiopoïétine-2 (hAng2), démontrant l'homologie entre les différentes protéines en gris. Les cystéines conservées sont identifiées par des étoiles. ....	68
<b>Figure 6</b> Les Angptl3, 4 et 6 sont de puissants signaux pour le tissu adipeux et le foie. ....	79
<b>Figure 7</b> Structure secondaire de l'Angptl2 représentant le côté N terminal (N <sub>T</sub> )....	88
<b>Figure 8</b> Schématisation de l'implication de l'Angptl2 dans le diabète relié à l'obésité, selon les données de (Tabata <i>et al.</i> , 2009). ....	101
<b>Figure 9</b> Effet bénéfique du NAC sur la sénescence de cellules endothéliales en culture isolées à partir d'une artère mammaire d'un même patient athérosclérotique. ....	115
<b>Figure 10</b> Représentation schématique des différentes étapes de la technique de <i>Differential Display</i> menant à l'identification de l'Angptl2 dans les CE de patients coronariens. ....	119
<b>Figure 11</b> Les produits obtenus par la réaction de PCR ont été séparés sur gel d'agarose de 1%. ....	126
<b>Figure 12</b> Estimation sur un gel d'agarose (1%) de la concentration d'ADN obtenue suite à l'étape de purification. ....	127
<b>Figure 13</b> Carte de restriction du vecteur pCRII. ....	129
<b>Figure 14</b> Présentation schématique des étapes de clonage et de la transformation bactérienne. ....	130

<b>Figure 15</b> ADN plasmidiques isolés des colonies et digérés avec l'enzyme EcoRI. Les gels représentent les colonies (dix) isolées à partir de la bande d'acrylamide D1 et D2, à titre d'exemple.....	132
<b>Figure 16</b> ADN plasmidiques isolés des colonies et digérés avec les enzymes de restriction spécifiques. ....	134
<b>Figure 17</b> Profil des variations géniques observées par <i>Differential Display</i> dans des hIMAEC sénescents (Contrôle) ou traités avec le NAC et non sénescents (NAC). ....	138
<b>Figure 18</b> L'expression génique de l'Angptl2 dans les hIMAEC est diminuée par un traitement chronique avec le NAC.....	141
<b>Figure 19</b> Cartographie du vecteur SPORT1-hAngptl2 selon la compagnie Openbiosystems. ....	176
<b>Figure 20</b> Représentation schématique de l'étape 1 : Sous clonage du côté 3' du gène d'Angptl2 sans le codon stop dans le vecteur pcDNA3.1 .....	179
<b>Figure 21</b> Représentation schématique de l'étape 2 : Introduction de l'ADNc de la GST à partir du vecteur pGEX-6P2 en phase avec le 3' Angptl2.....	181
<b>Figure 22</b> Représentation schématique de l'étape 3 : Rajout du côté 5' de l'Angptl2. ....	182
<b>Figure 23</b> Schéma représentatif de la rétention d'une protéine recombinante aux billes de glutathion. ....	183
<b>Figure 24</b> Quantification de la concentration d'Angptl2-GST purifiée.....	186
<b>Figure 25</b> Schéma de la microchambre utilisée .....	190
<b>Figure 26</b> Purification de la protéine recombinante Angptl2-GST.....	192
<b>Figure 27</b> L'Angptl2-GST induit la migration des CE .....	194
<b>Figure 28</b> L'Angptl2-GST induit la formation des tubules.....	195
<b>Figure 29</b> L'Angpt2 stimule l'expression génique des molécules inflammatoires. 205	
<b>Figure 30</b> L'Angpt2 stimule l'expression génique des molécules inflammatoires indépendamment du VEGF.....	206
<b>Figure 31</b> L'Angptl2 induit une production de ROS dans les HUVEC vivantes. ....	207
<b>Figure 32</b> Une stimulation prolongée des HUVEC avec l'Angptl2 inhibe l'expression de HO-1 induite par la privation de sérum. ....	208

<b>Figure 33</b> Une stimulation aigüe des HUVEC avec l'Angptl2 stimule la translocation nucléaire de Nrf2 alors qu'une stimulation prolongée l'inhibe.....	210
<b>Figure 34</b> Effet du temps d'exposition des HUVEC à l'Angptl2 sur l'activation de la voie MAP kinase p38.....	212
<b>Figure 35</b> Effet de l'inhibiteur de la voie MAP kinase p38, SB202190, sur l'activation de Hsp27 induite par l'Angptl2.....	213
<b>Figure 36</b> Un traitement avec l'inhibiteur de la voie MAP kinase p38, le SB201290, réduit la production de ROS par l'Angptl2 dans les HUVEC. ....	214
<b>Figure 37</b> Effet de l'inhibition de la voie MAP kinase p38 sur la régulation de Nrf2 par l'Angptl2.....	216

## Abréviations

a.a.	acide aminé
ADMA	diméthylarginine asymétrique ( <i>asymmetric dimethylarginine</i> )
AGF	facteur de croissance relié à l'angiopoiétine ( <i>angiopietin-related growth factor</i> )
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
Angptl2	angiopoiétine-like 2
Angptls	famille des angiopoiétines-like (1 à 8)
AP-1	protéine activatrice-1 ( <i>activator protein-1</i> )
Aph	aminoglycoside phosphotransférase
ApoA-I	apolipoprotéine A-1
ApoB	apolipoprotéine B
ApoE	apolipoprotéine E
ARE	élément riche en adénylate et uridynate ( <i>adenylate uridylate-rich element</i> )
ARP	protéine reliée à l'angiopoiétine ( <i>angiopietin-related protein</i> )
ATF/CREB	facteur de transcription activateur/élément de réponse liant l'AMPc ( <i>activating transcription factor/cAMP response element binding</i> )
ATF2	facteur de transcription activateur ( <i>activating transcription factor 2</i> )
ATGL	adipocyte triglyceride lipase
ATP	adénosine triphosphate
ATX	LDLr <sup>-/-</sup> ; hApoB <sub>100</sub> <sup>+/+</sup> , modèle de souris athérosclérotiques
BSA	albumine de sérum bovin ( <i>bovine serum albumine</i> )
CCL2	chimiokine (motif C-C) ligand-2
CCL5	chimiokine (motif C-C) ligand-5
CCR2	récepteur aux chimiokines C-C de type 2 ( <i>C-C Chemokine receptor type 2</i> )
CD	marqueur de différenciation ( <i>cluster of differentiation</i> )

CE	cellules endothéliales
CML	cellules musculaires lisses
CMV	cytomegalovirus
CRP	protéine réactive C ( <i>C-reactive protein</i> )
CSH	cellules souches hématopoïétiques
C <sub>T</sub>	carboxyterminal ou extrémité C terminale
CX3CL1	chimiokine (motif CX3C) ligand 1 ( <i>chemokine CX3C motif ligand 1</i> )
CXCL 16	chimiokine (motif C-X-C) ligand 16 ( <i>chemokine CXC-motif ligand 16</i> )
CXCL10	chimiokine (motif C-X-C) ligand 10 ( <i>chemokine CXC-motif ligand 10</i> )
dATP	déoxyadénosine 5-triphosphate
DMEM	milieu Eagle modifié de Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
dNTP	déoxyribonucléotide triphosphate
DTT	dithiothreitol
E-sélectine	sélectine endothéliale
EDHF	facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ( <i>endothelium-derived hyperpolarising factor</i> )
EGF	facteur de croissance de l'épiderme ( <i>epidermal growth factor</i> )
eNOS	NO synthase endothéliale
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase1/2</i>
ESL-1	ligand-1 de la E-sélectine ( <i>E-selectin ligand-1</i> )
ET-1	endothéline-1
FACS	cytométrie de flux
FBS	sérum fœtal bovin ( <i>fetal bovine serum</i> )
FFA	acides gras libres
FGF	facteur de croissance des fibroblastes ( <i>fibroblast growth factor</i> )
FPLC	chromatographie liquide rapide des protéines ( <i>fast Protein Liquid Chromatography</i> )
Ftl-1	récepteur au VEGF



G418	généticine
G6P	glucose-6-phosphate
Gal	galactose
GlyCAM-1	molécule-1 d'adhérence cellulaire dépendante de la glycosylation ( <i>glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1</i> )
GST	glutathione S-transférase ( <i>glutathione S-transferase</i> )
hAng1/2	angiopoiétine-1 et angiopoiétine-2 (forme humaine)
hARP1/2	protéine reliée à l'angiopoiétine humaine 1 et 2
HDL	lipoprotéine de haute densité ( <i>high density lipoprotein</i> )
HIF-1	facteur de transcription nucléaire inductible par l'hypoxie ( <i>hypoxia inducible factor-1</i> )
hIMAEC	cellules humaines endothéliales de l'artère mammaire interne
HNE	4-hydroxy-nonenal
HO-1	hème oxygénase-1
hs-CRP	protéine réactive C à haute sensibilité ( <i>high sensitivity C reactive protein</i> )
HUVEC	cellules endothéliales de la veine ombilicale ( <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
I-TAC	<i>IFN-inducible T-cell <math>\alpha</math>-chemoattractant</i>
I- $\kappa$ B	Inhibiteur de NF- $\kappa$ B
ICAM-1	molécule d'adhésion intracellulaire-1 ( <i>intracellular adhesion molecule-1</i> )
IDL	lipoprotéines de densité intermédiaire ( <i>intermediate density lipoproteins</i> )
IFN- $\gamma$	interféron- $\gamma$
IL-1	interleukine-1
IL-1R $\alpha$	antagoniste alpha du récepteur de l'interleukin-1 ( <i>IL-1 receptor antagonist alpha</i> )
IL-6	interleukine-6
IL-8	interleukine-8
IP-10	protéine inductible ( <i>inducible protein-10</i> )

IR	récepteur à l'insuline
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
KO	<i>knock-out</i>
L-sélectine	sélectine leucocytaire
Lac Z	opéron lactose qui code pour l'enzyme $\beta$ -galactosidase
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LC\MS-MS	Chromatographie phase liquide/spectrométrie de masse en tandem ( <i>liquid chromatography/tandem mass spectrometry</i> )
LDL	lipoprotéine de basse densité ( <i>low density lipoprotein</i> )
LFA-1	antigène-1 associé à la fonction leucocytaire ( <i>lymphocyte function-associated antigen-1</i> )
LH	lipase hépatique
LILRB2	récepteur d'homologie à l'immunoglobuline de type B2 ( <i>leukocyte immunoglobulin-like receptor B2</i> )
LOX-1	récepteur de type lectine des LDL oxydés ( <i>lectin-type oxidized LDL receptor-1</i> )
Lp-PLA2	phospholipase A2 associée à une lipoprotéine ( <i>lipoprotein associated phospholipase A2</i> )
LPL	lipoprotéine lipase
LPS	lipopolysaccharide
LXR	récepteur X du foie ou récepteur des oxystérols ( <i>liver X receptor</i> )
LXRE	éléments de réponse au LXR ( <i>LRX response elements</i> )
M-CSF	facteur de stimulation des colonies des macrophages ( <i>macrophage colony stimulating factor</i> )
Mac-1	protéine chimio-attractante monocytaire-1 ( <i>monocyte chemoattractant protein-1</i> )
MadCAM-1	molécule d'adhésion cellulaire d'adressine des muqueuses ( <i>mucosal addressin adhesion molecule-1</i> )
MAPK	protéine kinase activée par le mitogène ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> )

MCP-1	protéine chimiotactique monocytaire-1 ( <i>monocyte chemotactic protein-1</i> )
Mig	monokine induite par l'IFN- $\gamma$ ( <i>Monokine induced by IFN-<math>\gamma</math></i> )
MKP-1	MAPK phosphatase-1
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
MMP	métalloprotéinases matricielles
MPOC	maladie pulmonaire obstructive chronique
NAC	N-acétyl-L-cystéine
NC	contrôle négatif
NF- $\kappa$ B	facteur nucléaire-Kappa B ( <i>nuclear factor Kappa B</i> )
NFATc	facteur nucléaire des cellules T activées ( <i>nuclear factor of activated T-cells</i> )
NO	monoxyde d'azote ( <i>nitric oxide</i> )
Nrf2	facteur relié au facteur nucléaire hématopoïétique (NF-E2) [ <i>nuclear factor erythroid 2 (NF-E2)-related factor 2</i> ]
NT	aminoterminal ou extrémité N terminal
Nup62	nucléopore 62
ONOO	peroxynitrite
ox-LDL	lipoprotéines de basse densité oxydées
P-sélectine	sélectine plaquettaire
PAF-AH	facteur d'activation des plaquettes acétylhydrolase ( <i>platelet-activating factor acetylhydrolase</i> )
PBS	tampon phosphate salin ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	réaction d'amplification en chaîne ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PCR-DD	<i>Polymerase Chain Reaction - Differential Display</i>
PDGF	facteur de croissance plaquettaire ( <i>platelet derived growth factor</i> )
PDL	doublément de la population ( <i>population doubling length</i> )
PECAM-1	molécule d'adhésion plaquette-cellule endothéliale-1
PGI <sub>2</sub>	prostacycline
PI3K	phosphatidyl- inositol-3-kinase

PIRB	récepteur pairé de type immunoglobuline ( <i>paired immunoglobulin-like receptor</i> )
PPAR	récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyosomes ( <i>peroxisome proliferator-activated receptors</i> )
PSGL-1	ligand de la P-sélectine ( <i>P-selectin glycoprotein ligand 1</i> )
QPCR	PCR quantitative en temps réel
RE	réticulum endoplasmique
ROS	espèces réactives oxygénées
RT	réaction de transcription inverse
sE-sélectine	forme soluble de E-sélectine
SEM	erreur standard à la moyenne
sICAM	forme soluble de ICAM
SiRNA	ARN interférent
sL-sélectine	forme soluble de L-sélectine
SNP	polymorphisme d'un seul nucléotide ( <i>single-nucleotide polymorphism</i> )
SOC	<i>Super Optimal Broth C</i>
SOD	superoxyde dismutase
sP-sélectine	forme soluble de P-sélectine
sPECAM	forme soluble de PECAM
SR-A	recépteur "scavenger" de classe-A ( <i>scavenger receptor-A</i> )
St-RE	élément de réponse au stress ( <i>stress response element</i> )
sVCAM	forme soluble de VCAM
TAE	Tris-Acétate-EDTA
TBE	Tris-borate-EDTA
TBSE	tampon salin Tris avec EDTA ( <i>Tris buffer saline EDTA</i> )
TBST	tampon salin Tris avec Tween 20 ( <i>Tris buffer saline Tween 20</i> )
TFPI	inhibiteur du facteur tissulaire ( <i>tissue factor pathway inhibitor</i> )
TG	triglycérides
TGF $\beta$	facteur de croissance transformant $\beta$ ( <i>transforming growth factor <math>\beta</math></i> )
TLR	récepteur <i>Toll-like</i> ( <i>Toll-like receptor</i> )

TNF- $\alpha$	facteur de nécrose tumoral- $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor</i> )
tPA	activateur tissulaire du plasminogène ( <i>tissue plasminogen activator</i> )
TSP1	thrombospondine-1
TXA <sub>2</sub>	thromboxane A <sub>2</sub>
UA	unité arbitraire ( <i>arbitrary units</i> )
UV	ultraviolet
VCAM-1	molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 ( <i>vascular cell adhesion molecule-1</i> )
VE-Cadhérine	cadhérine endothéliale-vasculaire ( <i>vascular endothelial cadherin</i> )
VEGF	facteur de croissance dérivé de l'endothélium vasculaire ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VLA-4	antigène d'activation très tardive-4 ( <i>very late antigen -4</i> )
VLDL	lipoprotéines de très basse densité ( <i>very low-density lipoproteins</i> )
VLDL-TG	VLDL-triglycérides

*À la mémoire de mes parents  
qui ont tout fait pour moi,  
de mon premier souffle de vie  
jusqu'à leur douloureuse disparition,  
Eux qui n'ont pas pu goûter  
aux fruits de leurs efforts,  
Je dédie cette thèse*

*&*

*À mon fils Toufic, mon trésor et mon soleil,  
à qui je dois beaucoup,  
Je dédie cette thèse*

## Remerciements

Au cours de la rédaction de cette thèse, j'ai pensé à de nombreuses occasions et avec impatience, au moment où j'écrirai cette page afin d'adresser mes sincères remerciements à toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation de ce projet et qui ont permis, par leur soutien et leurs conseils, de le mener à bien. C'est un soulagement de terminer ce long parcours et de sentir enfin libre. Mais face à cette liberté, je m'aperçois que l'effort consacré pendant toutes ces années en méritait la fatigue. De plus, la chance que j'ai eu de travailler avec des personnes exceptionnelles, ne peut être passée sous silence.

*Aux membres du Jury, la Dre Chantal Lambert, le Dr Jean-Philippe Gratton et le Dr Richard Darren,*

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de jury qui me font l'honneur d'examiner mon travail. Leur horaire étant très chargé, je leur suis très reconnaissante d'avoir donné de leur précieux temps pour l'évaluation de cette thèse.

*À mon directeur de recherche et mentor, Éric Thorin,*

Par ces quelques lignes, je tiens à exprimer ma profonde gratitude et reconnaissance envers le Dr Éric Thorin, pour son encadrement, ses conseils professionnels, nos discussions multiples et enrichissantes, et surtout sa présence dans ma vie comme ami. Merci Éric d'avoir su percevoir les moments difficiles et merci de m'avoir réconfortée.

Durant toutes ces années où j'ai travaillé avec le Dr Thorin, j'ai découvert une personne incroyable dans tous les sens du mot. Je l'ai souvent répété : "Éric est parfait". Merci Éric de m'avoir accueillie dans ton équipe, de m'avoir accompagnée dans mes premiers pas dans le monde de la recherche et de m'avoir donné tous les moyens possibles pour réaliser mon rêve.

***Au Dr Nathalie Thorin-Trescasses,***

Je suis particulièrement reconnaissant à Nathalie pour ses patientes relectures de ma thèse, sa perspicacité scientifique et son support sans défaillance. C'est plus que de la reconnaissance ou des remerciements dont je suis redevable et que j'exprime ici Nath, pour ton infatigable aide durant la rédaction de cette thèse, ton appui sincère à tous les instants, et tes pertinentes remarques.

Plus qu'une co-superviseuse, j'ai toujours considéré Nath comme une sœur et nos nombreuses discussions ont été indispensables durant mes journées de travail. Tu es restée "zen" quand je ne l'étais pas du tout... Je t'apprécie Nathalie.

***Au Dr Bruce Allen,***

J'aimerais tout spécialement souligner ma reconnaissance infinie à Bruce, non seulement pour m'avoir communiqué son obsession de la biochimie qui a retenu mon attention toutes ces années, mais aussi pour immense générosité, ses judicieux conseils et surtout son humour sans bornes. Merci Bruce pour m'avoir tenu "*les mains et... aussi les pieds*" dans le domaine de la biochimie et merci pour être un ami très appréciable.

***À Maya Mamarbachi,***

Nombreux sont ceux à avoir apporté au fil de ma thèse leur contribution scientifique. Je tiens ainsi à remercier Madame Maya Mamarbachi pour son aide grandement appréciée en biologie moléculaire. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, autant sur le plan humain que scientifique. Merci de m'avoir si souvent soutenue. Tu as été et tu vas toujours être précieuse pour moi.

***À Louis Villeneuve,***

Un grand merci à Louis Villeneuve pour sa joie de vivre, pour son sourire permanent et surtout pour son expertise inestimable en microscopie confocale, tu es un vrai professionnel, indispensable à l'ICM.



*À mes collègues du laboratoire,*

Ce travail a bien sûr été facilité par la bonne ambiance qui règne dans le laboratoire du Dr Éric Thorin. Je tiens à remercier tous mes collègues du laboratoire qui ont participé, indirectement ou directement au bon déroulement de ces travaux de recherche et à leur finalité. Un merci tout particulier à Carol et Cécile pour leur collaboration grandement appréciée qui a permis d'avancer le projet. Finalement mais non les moindres, j'aimerais remercier Albert, Virginie, François, Xiaoyan, pour les nombreuses discussions et échanges d'idées.

Enfin, qu'il me soit permis de dédier cette thèse à mon cher fils Toufic (Toffy) qui m'a beaucoup supporté au fil de ces années. Je la dédie aussi aux membres de ma famille, mes sœurs et mes frères, et à mes amis qui m'ont soutenue dans la réalisation de cette thèse.

# 1. Introduction

Les maladies cardiovasculaires en général et l'athérosclérose en particulier sont la première cause de mortalité dans les pays développés. L'athérosclérose consiste en une obstruction progressive des artères qui est amorcée par une dysfonction endothéliale. Ceci conduit à un dépôt de corps gras et de débris cellulaires dans l'espace sous-endothélial, résultant en un épaissement des parois des vaisseaux sanguins. L'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, l'ischémie sont autant de conséquences irréversibles et souvent mortelles, de la lésion athérosclérotique (Eberhardt *et al.*, 2004). L'angiopoietine-like2 (Angptl2) est une nouvelle protéine, peu connue, qui possède des propriétés pro-inflammatoires et angiogéniques et dont les niveaux circulants augmentent significativement chez les patients coronariens (Tabata *et al.*, 2009).

Cette thèse décrit l'implication de l'Angptl2 dans le développement du processus de l'athérosclérose. L'introduction abordera tout d'abord les principaux thèmes étudiés au cours de mon projet, soit l'endothélium vasculaire, l'athérosclérose et la grande famille des angiopoietines-like, puis elle décrira les objectifs et les hypothèses proposées.

## 1.1 L'endothélium vasculaire: fonction et dysfonction

L'endothélium vasculaire est la monocouche de cellules qui tapisse la lumière de tous les vaisseaux sanguins et lymphatiques. Pendant longtemps, il a été considéré comme une membrane relativement inerte, sans fonction biologique. Ce n'est qu'au cours de l'année 1966 que les travaux de Florey et son équipe ont changé profondément les connaissances sur l'endothélium lorsqu'ils ont affirmé que les cellules endothéliales (CE) sont plus qu'une feuille de cellophane nucléée, mais qu'elles sont plutôt un organe dont la dysfonction pourrait promouvoir des maladies (Florey, 1966). Dans cet excellent article, Florey définit l'endothélium vasculaire comme un système actif caractérisé par la présence de vésicules (notamment des cavéolae et des corps de Palade) et muni d'un

système de transport fonctionnel. L'endothélium est donc passé d'une simple barrière inerte à un organe indépendant, possédant des fonctions physiologiques essentielles et pouvant agir de manière autocrine, paracrine ou endocrine, afin d'interagir avec les tissus avoisinants ou à distance (Vanhoutte, 2009). L'endothélium a la capacité de contrôler le tonus vasculaire (Furchgott *et al.*, 1980), de réguler plusieurs processus physiologiques fondamentaux tels que l'angiogenèse, l'adhésion des cellules circulantes, l'inflammation des parois vasculaires et la prolifération des cellules musculaires (Deanfield *et al.*, 2007). En conditions pathologiques, les CE perdent leur intégrité et deviennent par contre une source de facteurs de risque en produisant des molécules d'adhésion, des cytokines et des facteurs vasoconstricteurs (Vanhoutte, 2010).

Pour comprendre l'implication de l'endothélium dans le développement des maladies cardiovasculaires, il est tout d'abord approprié de bien définir les propriétés d'un endothélium sain et fonctionnel.

### **1.1.1. Un endothélium vasculaire fonctionnel**

Dans leur état physiologique au repos, les CE sont typiquement quiescentes et ne se renouvellent que rarement, de l'ordre de 1 à 2 cellules pour 1000 et par jour, au niveau du système vasculaire chez le rat (Hansson *et al.*, 1983; Schwartz *et al.*, 1977). L'endothélium vasculaire ne se renouvelle donc qu'une fois tous les 2 à 3 ans, ce qui est l'équivalent de la durée de vie de ces petits animaux. Ceci ne signifie pas une absence de fonctions biologiques, bien au contraire, puisque les CE quiescentes sont métaboliquement très actives et sont responsables de contrôler l'activité des parois vasculaires, de réguler le fonctionnement des tissus avoisinants et d'assurer le contact avec les cellules sanguines circulantes (Grover-Paez *et al.*, 2009).

L'endothélium est l'organe responsable du contrôle du tonus vasculaire et de l'équilibre homéostatique. Il exprime à la fois des facteurs vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (*nitric oxide*, NO), la prostacycline (PGI<sub>2</sub>) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (*endothelium-derived hyperpolarising factor*, EDHF) ainsi que des facteurs vasoconstricteurs tels que le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) et l'endothéline-1 (ET-1). C'est la balance de ces médiateurs vasoactifs qui dicte le tonus vasculaire (Vanhoutte,

2000). De plus, les CE ont la responsabilité de réguler le fonctionnement des cellules musculaires lisses (CML) sous-jacentes en sécrétant des facteurs tels que l'ET-1 et le NO qui peuvent influencer leur prolifération, leur demi-vie et leur morphologie (Glukhova *et al.*, 1988; Mosse *et al.*, 1986). Les CE quiescentes expriment également des facteurs anticoagulants qui empêchent les leucocytes d'adhérer, ce qui produit un état de protection anti-thrombotique pour l'organisme. L'endothélium sain assure donc une agrégation des plaquettes et une coagulation du sang adéquates, dans un contexte de réparation tissulaire (Deanfield *et al.*, 2007; Higashi *et al.*, 2009).

#### **1.1.1.1. L'endothélium possède des propriétés anti-thrombotiques et anti-inflammatoires**

L'endothélium est en première ligne pour lutter contre la formation de thromboses et intervient de façon majeure dans la régulation des interactions avec les cellules sanguines (Shimokawa *et al.*, 1989). Par définition, un thrombus est un caillot formé suite à l'accumulation de cellules sanguines et de l'agrégation plaquettaire à la surface vasculaire (Jackson, 2011). C'est une réponse normale à une lésion afin de prévenir l'hémorragie. Bien qu'il s'agisse d'un mécanisme physiologique, dans certains cas et sous l'effet d'une activation non contrôlée, le caillot peut se détacher de sa source et migrer avec le flux sanguin menant à l'embolie, c'est-à-dire à l'obstruction de la circulation sanguine. Un tel phénomène mène très souvent à des manifestations cliniques très sévères, dont les accidents vasculaires cérébraux et l'infarctus du myocarde (pour revue, (Jackson, 2011)).

Afin de maintenir son intégrité et de se protéger contre le phénomène d'agrégation cellulaire, l'endothélium vasculaire sain exprime à sa surface des facteurs anti-agrégants et anti-adhérents qui s'opposent à l'activation, l'adhésion et l'agrégation des cellules sanguines. La moindre activation des cellules sanguines déclenche la libération par les CE de substances telles que l'inhibiteur du facteur tissulaire (*tissue factor pathway inhibitor*, TFPI) (Lindahl, 1997), le récepteur endothélial de la protéine réactive C (*C-reactive protein*, CRP) (Devaraj *et al.*, 2003), les protéoglycans y compris les glycosaminoglycans sulfatés (par exemple l'héparane-sulfate) et la thrombomoduline

(qui lie la thrombine en la transformant en facteur anti-coagulant) (Seigneur *et al.*, 1993), et l'activateur tissulaire du plasminogène (*tissue plasminogen activator*, tPA) (Devaraj *et al.*, 2003; Dichek *et al.*, 1996). Tous ces facteurs endothéliaux sont reconnus pour leur rôle clé dans l'inhibition de la thrombose (Pries *et al.*, 2006).

Les facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium peuvent de plus agir en tant qu'anti-thrombotiques (Flammer *et al.*, 2010). Parmi ces facteurs on compte le NO, le plus puissant facteur protecteur sécrété par l'endothélium : le NO produit un effet inhibiteur direct sur l'activation et l'agrégation plaquettaires (Vanhoutte, 2009; Yao *et al.*, 1992). Ce gaz naturel intervient aussi dans la modulation de la prolifération des CML; il agit de manière paracrine et en synergie avec la PGI<sub>2</sub> afin d'inhiber leur prolifération (Jeremy *et al.*, 1999). L'effet athéroprotecteur du NO a été mis en évidence pour la première fois en étudiant la formation des plaques athérosclérotiques dans un modèle de souris transgéniques double *knock-out* (KO) (délétion des gènes codants pour l'apolipoprotéine E (ApoE) et la NO synthase endothéliale (eNOS), souris ApoE<sup>-/-</sup>; eNOS<sup>-/-</sup>). L'apparition de l'athérosclérose est accélérée chez ces souris comparativement au souris ApoE<sup>-/-</sup> et/ou aux souris de type sauvage (Knowles *et al.*, 2000; Kuhlencordt *et al.*, 2001).

Aux effets anti-thrombotiques de l'endothélium, s'ajoutent des fonctions anti-adhésives : les CE quiescentes synthétisent peu de récepteurs spécifiques à l'adhésion des cellules sanguines tels que la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (*intracellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) ou la molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, VCAM-1). De ce fait, l'endothélium assure une prévention efficace de la thrombose (Levi *et al.*, 1999; Paulus *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2001).

L'endothélium vasculaire sain a également des propriétés anti-inflammatoires, principalement grâce au NO qui agit comme un inhibiteur des facteurs de transcription pro-inflammatoires tels que le facteur nucléaire-Kappa B (NF-κB, *nuclear factor Kappa B*) et la protéine activatrice-1 (AP-1, *activator protein-1*) (Katsuyama *et al.*, 1998; Tabuchi *et al.*, 1994). Ces facteurs de transcription sont en effet particulièrement riches en cystéines susceptibles d'être nitrosylées et désactivées par le NO (Reynaert *et al.*, 2004). Cette nitrosylation empêche la liaison des facteurs de transcription aux sites spécifiques de l'ADN, et diminue donc leur activité transcriptionnelle (Kelleher *et al.*,

2007; Reynaert *et al.*, 2004). Selon un autre scénario, le NO stabiliserait l'interaction entre NF- $\kappa$ B et son inhibiteur endogène (I- $\kappa$ B) (Albrecht *et al.*, 1995).

En résumé, en plus de son rôle crucial dans la régulation du tonus vasculaire, un endothélium vasculaire sain assure des fonctions physiologiques essentielles à l'homéostasie des cellules environnantes *via* ses propriétés anti-thrombotiques, anti-coagulantes et anti-inflammatoires.

### **1.1.2. Un endothélium vasculaire dysfonctionnel mène à l'athérosclérose**

La dysfonction endothéliale est le premier signe d'une inflammation, qui, si elle devient chronique, conduit à une maladie vasculaire, incluant l'athérosclérose; l'effet des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium est alors diminué, voire aboli et remplacé par une réponse vasoconstrictrice (Vanhoutte, 2009). Ceci peut se traduire à long terme par une réduction de la perfusion sanguine, menant à l'ischémie, à l'infarctus et à l'accident vasculaire cérébral (Sitia *et al.*, 2010; Vanhoutte, 2003). Sur le plan moléculaire, la dysfonction endothéliale est caractérisée par une diminution de la production et/ou par une inactivation du NO. La balance entre la biodisponibilité du NO et la production des espèces réactives oxygénées (ROS) qui l'inactivent, contrôle la fonction endothéliale (Kojda *et al.*, 1999). La perte de la fonction endothéliale ne se limite pas à l'altération des propriétés vasodilatatrices dépendantes de l'endothélium, mais elle s'applique aussi à toutes les propriétés anti-thrombotiques, anti-adhésives et anti-inflammatoires endothéliales (Brevetti *et al.*, 2008; Vita *et al.*, 2002).

À l'état dysfonctionnel, l'endothélium synthétise des facteurs pro-inflammatoires tels que l'interleukine-6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ , *tumor necrosis factor*), réduit les propriétés anti-thrombotiques et favorise un environnement pro-adhésif pour les cellules sanguines en exprimant massivement des molécules d'adhésion à sa surface (Ley *et al.*, 2007b; Wilhelmi *et al.*, 2005). Le contrôle exercé par l'endothélium sur la prolifération des CML est également altéré avec la dysfonction endothéliale; il en résulte une forte augmentation du nombre des CML qui, tout en

entraînant une perte de la vasodilatation, confère une hausse du tonus vasculaire (Creager *et al.*, 1990; Gilligan *et al.*, 1994; McVeigh *et al.*, 1992; Panza *et al.*, 1990).

Tous ces changements générés par la dysfonction endothéliale jouent un rôle clé dans la pathogenèse de l'athérosclérose.

## **1.2. La pathologie de l'athérosclérose**

L'inflammation est la cause majeure, voire unique, qui dirige toutes les étapes de l'athérosclérose, de la formation des stries lipidiques jusqu'aux manifestations cliniques. L'athérosclérose est un processus progressif qui, une fois amorcé, évolue de façon chronique et souvent irréversible.

### **1.2.1. Différentes théories de l'athérogenèse**

L'athérosclérose a longtemps été considérée comme une accumulation de cholestérol dans les parois vasculaires et ce n'est qu'à partir des années 1970 que nos connaissances sur la pathophysiologie de cette maladie complexe ont commencé à s'accumuler (pour revue, (Libby, 2002)).

Plusieurs théories ont tenté d'expliquer l'origine de l'athérosclérose. La théorie proposée par Russel Ross en 1976, «la théorie de la réponse à une agression» (*The response-to-injury theory*) (Ross *et al.*, 1976 a; Ross *et al.*, 1976 b) suggère qu'une dénudation endothéliale suite à un dommage de la paroi vasculaire interne est le facteur initiateur de la formation des lésions athérosclérotiques. Ceci permettrait l'infiltration de lipides plasmatiques dans les CE auxquelles adhèrent les autres cellules sanguines. La structure finale ainsi formée évolue vers une calcification qui aboutit au blocage de la lumière vasculaire (Ross, 1986; Stocker *et al.*, 2004). Les travaux de Taylor et collaborateurs ont toutefois invalidé cette théorie, en montrant que si l'endothélium perd sa fonction au cours du processus de l'athérosclérose, il garde néanmoins son intégrité physique (Taylor *et al.*, 1989).

Peu de temps après, une théorie qui fait intervenir la synthèse génique dans le développement de l'athérosclérose a été proposée. C'est «la théorie monoclonale» (*The monoclonal theory*) de Benditt (Benditt, 1988), qui préconise qu'une mutation génétique est à l'origine de la sélection d'un clone de CML formant la plaque athérogénique. Ainsi, selon cette théorie, toutes les CML qui constituent la plaque seraient dérivées de la même cellule ayant subi auparavant des modifications génétiques (Stary *et al.*, 1995). Ces deux théories n'ont pas clairement expliqué la complexité du processus de l'athérosclérose, jusqu'à la proposition de Russell Ross en 1993, «la théorie de la modification oxydative» (*The oxidative modification theory*) (Raines *et al.*, 1993; Ross, 1993; Stocker *et al.*, 2004). Selon cette théorie, l'intégrité de l'endothélium n'est pas affectée au cours du processus de l'athérosclérose, mais ce sont des dommages au niveau des parois artérielles qui causent son activation, et en bout de ligne, son dysfonctionnement. Cette théorie considère que l'oxydation par l'environnement cellulaire des lipoprotéines de basse densité (LDL, *low density lipoprotein*) circulantes est l'étape essentielle pour déclencher le processus de l'athérosclérose *via* une réaction immuno-inflammatoire (Stocker *et al.*, 2004). Lorsque cette réponse inflammatoire persiste et devient chronique, elle dépasse les capacités réparatrices de l'endothélium qui devient pathologique (Glass *et al.*, 2001; Hansson *et al.*, 2011; Libby, 2002). L'inflammation déclenche le recrutement des cellules sanguines à la surface de l'endothélium ce qui, par la suite, donne naissance à la plaque athérosclérotique (Glass *et al.*, 2001).

### **1.2.2. Les facteurs hémodynamiques et la dysfonction endothéliale**

L'athérosclérose attaque toutes les artères de moyen et gros calibres ; les plus susceptibles au développement des lésions athérosclérotiques sont les artères coronaires, les carotides, l'aorte et les artères des membres inférieurs dont l'artère fémorale (Stary *et al.*, 1995). Dans l'arbre artériel, il existe des zones privilégiées pour la formation de la plaque athérosclérotique, notamment aux points des bifurcations et des courbures artérielles (Libby, 2002). Les facteurs hémodynamiques sont donc des paramètres

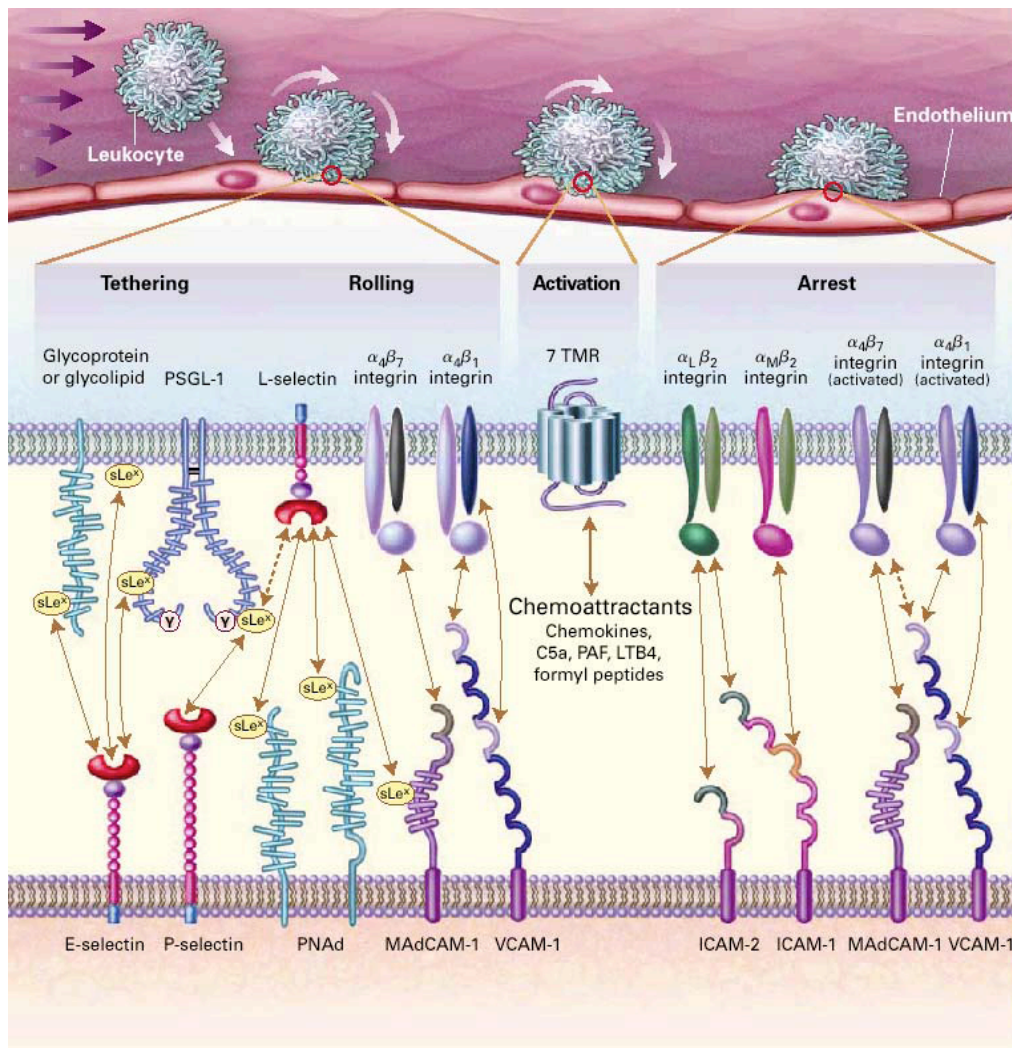


importants dans la progression de la maladie et une perturbation locale du flux laminaire peut conduire à une dysfonction endothéliale (Cunningham *et al.*, 2005) et faciliter la rupture brutale de la plaque (Libby *et al.*, 2011b). En effet, les forces de cisaillement locales, autrement dit les forces engendrées par le frottement du flux sanguin sur les parois vasculaires, sont moindres au niveau des points de bifurcations artériels permettant ainsi l'accumulation des lipoprotéines de basse densité oxydées (ox-LDL). Bien que ces forces soient faibles, elles s'accompagnent d'un flux sanguin turbulent qui conduit à une adaptation structurale, se traduisant par un épaissement compensateur des parois (Chatzizisis *et al.*, 2007).

En plus des modifications structurales, les faibles forces de cisaillement régulent l'expression des gènes contenant un élément de réponse aux forces de cisaillement (*shear stress response element*) dans leur promoteur. Par exemple, l'expression de l'enzyme antioxydante, superoxyde dismutase (SOD) est régulée à la baisse dans les régions où les forces de cisaillement sont faibles, stimulant ainsi l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1/ICAM-1 et d'autres protéines pro-athérosclérotiques telles que la protéine chimio-attractante monocytaire-1 (MCP-1, *monocyte chemotactic protein-1*) (Pan, 2009; Topper *et al.*, 1999). L'expression des protéines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et celle de facteurs vasoconstricteurs tels que l'ET-1, sont aussi stimulées dans ces régions, alors que celle des protéines anti-athérosclérotiques eNOS et PGI<sub>2</sub> est diminuée (Chien, 2007; Libby, 2002; Topper *et al.*, 1999). L'activation de l'expression des gènes pro-inflammatoires, des protéines d'adhésion, ainsi que des cytokines et/ou l'altération de l'expression des gènes protecteurs, résultent en une activation accrue de la prolifération des CML et en un épaissement de la couche musculaire. Tous ces changements structuraux et géniques collaborent de plus pour augmenter la perméabilité des CE qui tolèrent ainsi d'avantage le passage des lipoprotéines athérogènes et des cellules inflammées (Resnick *et al.*, 2000; Valgimigli *et al.*, 2003). L'infiltration de cellules circulantes telles que les leucocytes, à travers l'endothélium vasculaire dysfonctionnel, et tous les mécanismes moléculaires qui l'accompagnent, jouent un rôle crucial lors du développement de l'athérosclérose.

### **1.2.3. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à l'athérosclérose**

Les maladies inflammatoires chroniques sont caractérisées par un mécanisme cellulaire commun qui engendre une augmentation anormale du nombre de cellules inflammatoires dans la circulation, précédée par une phase de recrutement cellulaire au site affecté qui endommage le tissu concerné et entraîne la perte de sa fonction physiologique (Barreiro *et al.*, 2009). Dans le cas de l'athérosclérose, maladie inflammatoire chronique par excellence, des mécanismes cellulaires et moléculaires s'associent pour donner naissance à la plaque athérosclérotique (Blankenberg *et al.*, 2003; Price *et al.*, 1999). L'infiltration des lipides dans la paroi vasculaire est l'étape indispensable à l'initiation de la plaque. Cette étape est obligatoirement suivie par la présence physique des leucocytes en quantité élevée au site d'inflammation dans l'intima et par leur transmigration dans l'espace sous-endothélial sous l'effet des chimiokines (Ley *et al.*, 2007b) (Figure 1). Dans l'espace sous-endothélial, les leucocytes deviennent engorgés de lipides pour donner naissance aux macrophages (Ross, 1986). Le processus de recrutement leucocytaire représente en soi une cascade d'évènements composée de différentes étapes d'interactions dynamiques et de complémentarités entre les molécules d'adhésion à la surface des leucocytes et de leurs ligands spécifiques à la surface des CE (Figure 1 et Tableau I). Il est clair que les molécules d'adhésion ne servent pas seulement à l'accrochage des leucocytes, elles sont aussi les premières responsables pour assurer la spécificité, la sélectivité et l'efficacité du processus de recrutement tout entier (Blankenberg *et al.*, 2003; van Buul *et al.*, 2009). Le Tableau I présenté dans cette section résume le patron d'expression des différentes molécules d'adhésion, leurs ligands spécifiques, leur implication au cours du processus d'athérosclérose ainsi qu'une brève description structurale de leur mode d'organisation (Blankenberg *et al.*, 2003; Huo *et al.*, 2001; Price *et al.*, 1999; Springer, 1990).



**Figure 1** Schéma représentatif de la cascade d'adhésion des leucocytes sur l'endothélium vasculaire et des différentes molécules d'adhésion impliquées dans la pathogénèse de l'athérosclérose.

Tiré de (von Andrian *et al.*, 2000). Réimprimé avec la permission de: [The New England Journal of Medicine](#), Ulrich H. von Andrian, T-Cell Function and Migration. Two Sides of the Same Coin, 343 (14) : 1020-34, Copyright (2000), "Reproduced with permission from (scientific reference citation), Massachusetts Medical Society".

**Tableau I** Spécificités structurales et fonctionnelles des molécules d'adhésion impliquées dans le processus d'athérosclérose

Molécules d'adhésion	Autres noms	Ligands	Distribution		Fonctions	Constitutives	Formes solubles
			Endoth	Leuco			
<i>Sélectines/Ligands</i>							
P-sélectine	CD62P	PSGL-1, CD24	+		Capture/Roulement	+	sP-sélectine
E-sélectine	CD62E	ESL-1, PSGL-1	+		Capture/Roulement	+	sL-sélectine
L-sélectine	CD62L	PSGL-1, GlyCAM		+	Capture primaire	+	sL-sélectine
E-sélectine ligand 1	ESL-1	E-sélectine		+	Capture primaire et secondaire		
P-sélectine ligand 1	CD162, PSGL-1	P-, L-, E-sélectine		+	Capture primaire et secondaire	+	sPSGL-1
<i>Immunoglobulines</i>							
ICAM-1	CD54	$\alpha$ L $\beta$ 2, $\alpha$ M $\beta$ 2, $\alpha$ X $\beta$ 2	+	+	Adhésion stable	+	s-ICAM-1
ICAM-2	CD102	$\alpha$ L $\beta$ 2, $\alpha$ M $\beta$ 2,	+	+	Adhésion stable	+	s-ICAM-2
VCAM-1	CD106	$\alpha$ 4 $\beta$ 1, $\alpha$ 4 $\beta$ 7, $\alpha$ D $\beta$ 2	+		Adhésion stable	+	s-VCAM-1
PECAM-1	CD31	PECAM-1, $\alpha$ V $\beta$ 3	+	+	Transmigration	+	s-PECAM-1
<i>Intégrines</i>							
$\alpha$ 4/ $\beta$ 1	CD49d/CD29, VLA-4	VCAM-1	+		Adhésion stable		
$\alpha$ L/ $\beta$ 2	CD11a/CD18, LFA-1	ICAMs		+	Adhésion stable	+	
$\alpha$ M/ $\beta$ 2	CD11b/CD18, Mac1	ICAMs		+	Adhésion stable	+	
$\alpha$ X/ $\beta$ 2	CD11c/CD18	ICAM-1		+	Adhésion stable	+	
$\alpha$ D/ $\beta$ 2	CD11d/CD18	ICAM-3, VCAM-1		+	Adhésion stable	+	

CD : marqueur de différenciation; ESL-1: ligand-1 de la E-sélectine; GlyCAM : molécule d'adhérence cellulaire dépendante de la glycosylation; ICAM : molécule d'adhésion intracellulaire; LFA-1 : antigène-1 associé à la fonction leucocytaire Mac-1 ; protéine chimio-attractante monocyttaire-1; PSGL : ligand de la P-sélectine; VCAM : molécule d'adhésion cellulaire vasculaire; VLA-4 : antigène d'activation très tardive-4. s- : la forme soluble des différentes molécules d'adhésion.

### 1.2.3.1. Le mécanisme cellulaire de la cascade de l'adhésion leucocytaire

Les étapes de la cascade dynamique de recrutement leucocytaire (Figure 1) englobent premièrement l'attachement et le piégeage des leucocytes circulants à la membrane des CE, c'est l'étape de capture. Cet évènement progresse vers l'adhérence transitoire ou réversible, suivie par l'étape de roulement et finalement, par l'étape de l'adhérence stable ou irréversible et celle de la transmigration à travers la barrière endothéliale (Blankenberg *et al.*, 2003; Rivera-Nieves *et al.*, 2008). Toutes ces étapes se déroulent en séquence, et non en parallèle, chaque phase de la chaîne réactionnelle étant régulée par l'expression conjointe des molécules d'adhésion spécifiques, à la fois sur l'endothélium (les sélectines et les immunoglobulines) et les leucocytes (L-sélectine et les intégrines) (Fernandez-Borja *et al.*, 2010). Les sélectines ont pour rôle de réguler les premières étapes de la capture et du roulement. Les intégrines et les immunoglobulines, quant à elles, ont la responsabilité d'immobiliser les leucocytes lors de l'adhérence stable (Blann *et al.*, 2003; Springer, 1990).

#### 1.2.3.1.1. La capture des leucocytes circulants sur l'endothélium

L'habilité des leucocytes à former des interactions avec la surface de l'endothélium vasculaire est une étape nécessaire et suffisante pour la rétention des leucocytes lors de leur migration dans le flux sanguin. Un endothélium sain a des propriétés anti-adhésives, les molécules d'adhésion sont donc exprimées à des taux extrêmement faibles qui ne sont pas suffisants pour accrocher les leucocytes (Paulus *et al.*, 2011). Une fois dysfonctionnel, l'endothélium régule à la hausse l'expression des molécules d'adhésion, ce qui favorise les interactions physiques et dynamiques avec les leucocytes (Wilhelmi *et al.*, 2005).

Les premières liaisons entre les leucocytes et les CE, correspondant à la capture leucocytaire (capture primaire), se déroulent par l'intermédiaire des sélectines endothéliales et plaquettaires (E- et P-sélectine) et des sélectines leucocytaires (L-sélectine) et le ligand de la P-selectine (PSGL-1, *P-selectin glycoprotein ligand 1*) (Tableau I). Dans un modèle de souris déficientes en P-sélectine, le nombre de leucocytes adhérents à la surface de l'endothélium suite à une activation inflammatoire

diminue de façon drastique (Mayadas *et al.*, 1993). Une inhibition totale de l'adhésion leucocytaire a été observée dans le même modèle de souris P-selectin<sup>-/-</sup> en bloquant de surcroît la fonction de la E-sélectine (Bullard *et al.*, 1996). De même, chez les souris déficientes en E-sélectine, il faut bloquer la P-sélectine pour empêcher l'initiation de l'athérosclérose (Frenette *et al.*, 1996). Ces données démontrent le rôle essentiel joué par les sélectines lors de la phase précoce du recrutement des leucocytes et prouvent que les sélectines, du moins la E- et P-sélectine, sont complémentaires. Cependant, il ne faut pas négliger le mécanisme de capture secondaire (interaction entre deux cellules leucocytaires), qui contribue pour environ 50% des leucocytes capturés *via* des interactions inter-leucocytaires entre la L-sélectine et le PSGL-1 (Eriksson *et al.*, 2001). Ce contact dynamique entre les deux compartiments cellulaires résulte en l'expression massive de chimiokines telles que la MCP-1 et l'interleukine-8 (IL-8), des molécules indispensables au roulement des leucocytes sur l'endothélium (Lawson *et al.*, 2009; Rivera-Nieves *et al.*, 2008).

#### **1.2.3.1.2. Le roulement des leucocytes le long de l'endothélium**

Une fois la liaison avec l'endothélium vasculaire stabilisée, les leucocytes établissent de nouvelles liaisons qui sont faibles (dissociables) et réversibles. Sous l'influence du flux sanguin et des facteurs chimio-attracteurs, le processus de formation et de déformation des liaisons résulte en un mouvement de roulement des leucocytes le long de l'endothélium vasculaire (Kunkel *et al.*, 1996b). Ce processus est communément appelé le roulement transitoire. Durant cette étape, un chevauchement entre les P- et E-sélectine a été observé (Kunkel *et al.*, 1996b). Une collaboration existe de plus entre les intégrines et les sélectines: dans leur étude, Kunkel et al. démontrent que chez les souris double déficientes pour la P-sélectine et l'ICAM-1, le nombre de leucocytes présents à l'étape de roulement est partiellement réduit suite à une stimulation par le TNF- $\alpha$ . En présence d'un anticorps qui bloque la E-sélectine, l'étape de roulement est de plus complètement abolie (Kunkel *et al.*, 1996a). La E-sélectine semble aussi collaborer avec les intégrines afin de ralentir la vitesse des leucocytes (Ley *et al.*, 1998).

Les liens établis *via* les intégrines semblent plus forts que ceux établis *via* les sélectines, générant une vitesse de déplacement plus lente à l'étape de roulement transitoire (Campbell *et al.*, 1998; Ebnet *et al.*, 1999; Mackay, 2001). Finalement, il a été démontré que les molécules d'adhésion peuvent exister dans la circulation sanguine sous formes solubles (tronquées au niveau de la région transmembranaire) (Peschon *et al.*, 1998) et que ces formes solubles semblent être impliquées dans l'accélération de l'étape de roulement leucocytaire. En effet, ces protéines stimulent la production des molécules intégrines (VCAM-1 et ICAM-1) à la surface endothéliale dans le but de faciliter le roulement des leucocytes de façon transitoire (Garton *et al.*, 2006).

#### **1.2.3.1.3. L'adhérence stable et la transmigraton subendothéliale des leucocytes**

À cette étape de la cascade, les intégrines subissent des changements conformationnels et, en conséquence, augmentent leur affinité de liaison aux ligands afin de conférer des interactions stables entre les deux compartiments cellulaires. Une fois attachés à l'endothélium vasculaire par des liaisons stables, les leucocytes peuvent migrer lentement vers les sites de jonction entre les CE, où ils s'accumuleront et finiront par traverser la barrière endothéliale vers l'espace extravasculaire; c'est l'étape de la «migration trans-endothéliale» (Blankenberg *et al.*, 2003; Fernandez-Borja *et al.*, 2010). L'arrêt du roulement des leucocytes et les liaisons stables entre les CE et les leucocytes dépendent essentiellement des interactions entre l'antigène-1 associé à la fonction leucocytaire (LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen 1*) et ICAM-1, entre l'antigène d'activation très tardive-4 (VLA-4, *very late antigen-4*) et VCAM-1 et entre l'intégrine  $\alpha 4\text{-}\beta 7$  et la molécule d'adhésion cellulaire adressine des muqueuses (MadCAM-1, *mucosal addressin adhesion molecule-1*) (Tableau I) (Garton *et al.*, 2006; Huo *et al.*, 2001). En plus des intégrines, les chimiokines sont essentielles pour le déroulement de cette étape de par leur effet chimio-attractant exercé sur les leucocytes (pour revue (Weber, 2003)). Les signaux délivrés par les chimiokines telles que MCP-1, CXC ou CX3CL1 qui impliquent des récepteurs endothéliaux spécifiques, déclenchent l'activation des intégrines (Schwarz *et al.*, 2010; Weber, 2003); ceci représente un

mécanisme indispensable pour l'étalement et l'adhésion stable des leucocytes. La chimiokine CXC, par exemple, favorise l'interaction adhésive entre l'intégrine  $\beta 2$  (Mac-1, *monocyte chemoattractant protein-1*) et son ligand à la surface de l'endothélium vasculaire indépendamment de la densité de Mac-1 synthétisée à la surface cellulaire, suggérant un rôle dominant des chimiokines au cours de l'étape de l'adhésion leucocytaire (Lo *et al.*, 1989). De manière similaire, différentes chimiokines sont capables d'activer l'intégrine LFA-1 pour stabiliser les leucocytes sur l'endothélium vasculaire (Campbell *et al.*, 1998; Stein *et al.*, 2000). De plus, les CE elles-mêmes produisent des cytokines et des chimiokines, dont l'IL-8 et le TNF- $\alpha$ , qui facilitent et amplifient l'adhésion stable des leucocytes aux CE (Weber, 2003).

En ce qui concerne le mécanisme de la transmigration, il a été proposé que les protéines de jonction [i.e. les molécules d'adhésion plaquette-cellule endothéliale-1 (PECAM-1, *platelet endothelial cell adhesion molecule-1*) et la cadhérine vasculaire endothéliale (VE-cadherine, *vascular endothelial cadherin*)] qui sont localisées au niveau des sites de contact cellule/cellule, servent comme médiateurs dans la transmigration leucocytaire (van Buul *et al.*, 2009). Une autre hypothèse propose que l'activation de ICAM-1 déclenche la contraction des CE par un mécanisme qui implique une augmentation du calcium intracellulaire; cette contraction augmenterait l'espace entre les CE et faciliterait le passage des leucocytes (van Buul *et al.*, 2009). Il ne s'agit que de propositions, le mécanisme exact utilisé par les leucocytes pour traverser la monocouche endothéliale n'est pas encore connu (Lawson *et al.*, 2009; van Buul *et al.*, 2009). On sait cependant que les chimiokines telles que MCP-1, sont particulièrement importantes car la migration des leucocytes à travers l'endothélium dépend directement de leur concentration (Campbell *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1995).

#### **1.2.4. Quelle est l'évolution de la plaque athérosclérotique?**

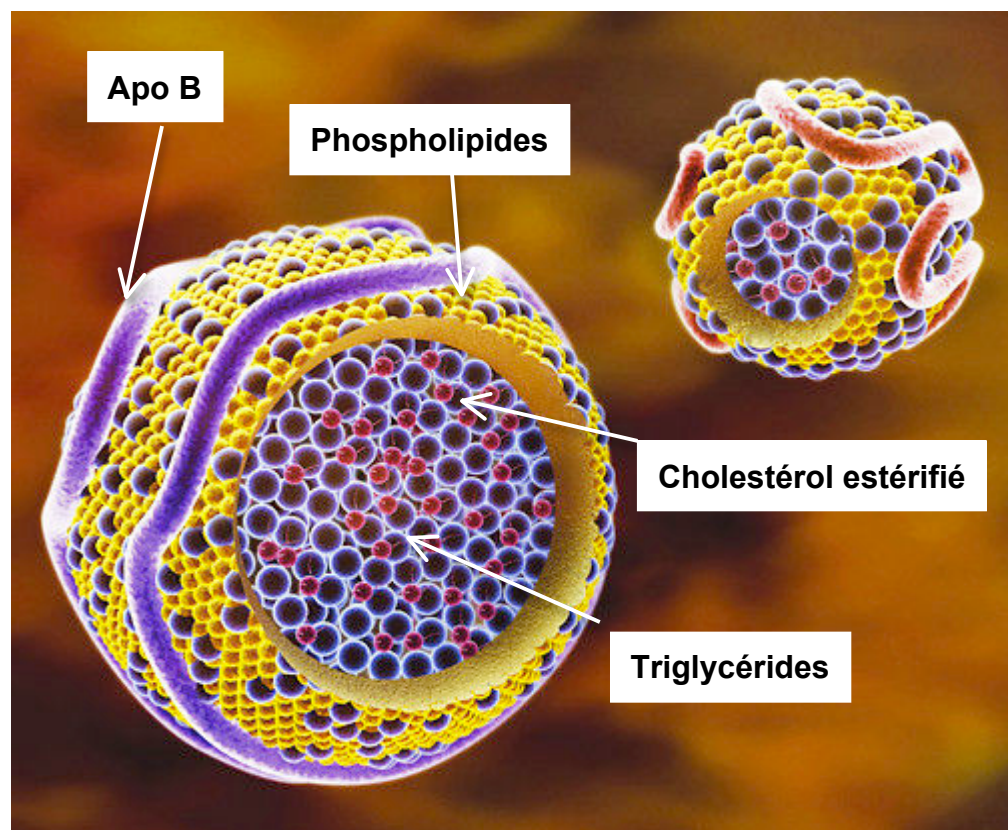
L'inflammation, l'accumulation de lipides -en particulier les LDL- et leur oxydation sont des processus essentiels à la genèse de la plaque (Hansson *et al.*, 2011; Libby, 2002). Suite à la dysfonction endothéliale, les lipoprotéines sanguines (surtout représentées par l'abondance de LDL-cholestérol) sont captées par les protéoglycans



provenant de la matrice extracellulaire dans l'espace subendothélial (Feldman *et al.*, 1984; Tabas *et al.*, 2007). Suite à leur infiltration, les lipides sont oxydés, ce qui représente une phase indispensable pour le recrutement des cellules inflammatoires (Libby *et al.*, 2011b).

#### **1.2.4.1. Les LDL oxydés : la première étape vers l'athérosclérose**

Les particules de LDL sont composées principalement de glycoprotéines, les apolipoprotéines, ayant le rôle structural de retenir le cholestérol circulant dans des petites sphères graisseuses et hydrophobiques (Figure 2) : en surface se trouvent les phospholipides, le cholestérol non-estérifié et une seule molécule volumineuse d'apolipoprotéine B (ApoB), le composant majeur de la surface des LDL; au centre se trouvent protégés le cholestérol estérifié (plus de 1500 molécules) et les triglycérides (Fogelstrand *et al.*, 2012). La concentration de LDL-cholestérol dans la circulation est un critère déterminant de la formation des plaques (Fogelstrand *et al.*, 2012; Skalen *et al.*, 2002). La prévention thérapeutique la plus simple pour ralentir le processus athérosclérotique est donc de baisser le taux de LDL-cholestérol circulant par un traitement avec une statine, un inhibiteur de la synthèse du cholestérol (Mora *et al.*, 2006).



**Figure 2** Schématisation d'une molécule de LDL.

L'interaction physique entre les récepteurs spécifiques des LDL exprimés à la surface de l'endothélium vasculaire et l'ApoB des LDL-cholestérol (par l'intermédiaire d'interactions ioniques) permet la transcytose des particules lipidiques vers l'intérieur des CE où elles subissent des modifications biochimiques (Simionescu *et al.*, 1993; Tabas *et al.*, 2007). En effet, les radicaux libres produits par les CE conduisent à l'oxydation des particules infiltrées de LDL-cholestérol, nommées les ox-LDL. Les ox-LDL seront alors piégées dans le réseau de fibres cytosquelettiques à l'intérieur des cellules pour être, par la suite, libérées vers l'espace intimal où elles seront reconnues par le système immunitaire comme étant des corps étrangers. Les ox-LDL déclenchent un processus d'inflammation qui est responsable de l'expression accrue des molécules d'adhésion à la surface endothéliale (VCAM-1, ICAM-1 et P-sélectine) (Cybulsky *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1993). De plus, les ox-LDL stimulent les CE à sécréter des facteurs chimio-attractants tels que le MCP-1 et déclenchent la synthèse de facteurs de

différenciation spécifiques aux cellules du système immunitaire tels que le facteur de stimulation des colonies macrophages (M-CSF, *macrophage colony stimulating factor*) (Gu *et al.*, 1998). Sous l'influence de ces deux facteurs, les monocytes pénètrent dans l'espace sous-endothélial et se différencient en macrophages; la MCP-1 est indispensable à la pénétration des monocytes et le M-CSF est responsable de leur différenciation (Gu *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1995). Il a été démontré qu'une altération des propriétés chimio-attractrices suite à une mutation dans les gènes codants pour le MCP-1 ou son récepteur spécifique (CCR2, C-C *Chemokine receptor type 2*), diminue significativement l'adhérence des monocytes sur la paroi vasculaire et, en conséquence, empêche le développement de la lésion athérosclérotique chez la souris (Boring *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 1998).

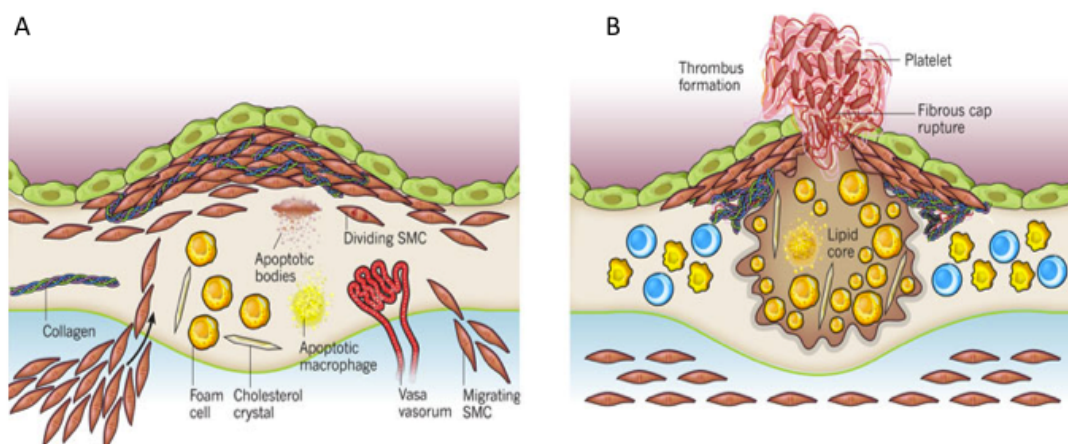
Bien que l'action de la chimiokine MCP-1 et de l'IL-8 soit spécifique aux monocytes et aux macrophages, d'autres chimiokines sont présentes dans la zone athéromateuse afin de recruter les autres lymphocytes circulants; c'est le cas par exemple des chimiokines de la famille CXC qui sont inductibles par l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Ces chimiokines sont la protéine inductible (IP-10, *inducible protein-10*), la monokine induite par l'IFN- $\gamma$  (Mig, *Monokine induced by IFN- $\gamma$* ) et I-TAC (*IFN-inducible T-cell  $\alpha$ -chemoattractant*); elles sont présentes pour guider et activer les cellules T. Il y a aussi les chimiokines (motif C-C) ligands (CCL)2 (CCL2), CCL5, CXCL10 et CX3CL1, qui se trouvent dans l'environnement inflammatoire afin de recruter les monocytes, les cellules T (ratio de 1 : 4 à 1 : 10 en comparaison avec les monocytes) et les cellules dendritiques (Hansson *et al.*, 2011; Libby, 2002; Smith *et al.*, 1995).

À la lumière de toutes ces données, les ox-LDL semblent être la composante clé déclenchant l'initiation et la formation de la plaque athérosclérotique. Cependant, une plaque passe par plusieurs étapes avant de progresser, allant de la formation de simples stries lipidiques jusqu'aux manifestations cliniques graves ou mortelles.

#### **1.2.4.2. La formation des stries lipidiques**

Les macrophages et les autres cellules du système immunitaire, qui contiennent des récepteurs dits «éboueurs» (*scavengers*) des ox-LDL, seront recrutés au niveau du site

de la lésion afin d'éliminer les particules de LDL (Boullier *et al.*, 2001). En effet, les récepteurs des ox-LDL sont exprimés en quantité massive à la surface des macrophages et comprennent les CD 36/68, CXCL 16 (*CXC-chemokine ligand 16*), le récepteur "scavenger" de classe-A (SR-A, *scavenger receptor-A*) et le récepteur de type lectine des LDL oxydés (LOX-1, *lectin-type oxidized LDL receptor-1*) (Boullier *et al.*, 2001; Shashkin *et al.*, 2005). Ces récepteurs ne sont pas régulés et ils permettent aux macrophages de phagocyter les ox-LDL de façon non contrôlée (Sitia *et al.*, 2010). Dès leur infiltration dans la paroi, les macrophages participent de façon cruciale à l'évolution de la plaque : ils synthétisent des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des facteurs de croissance plaquettaires (PDGF, *platelet derived growth factor*), des enzymes protéolytiques ainsi que des ROS afin de stimuler l'activation endothéliale, de favoriser d'avantage l'adhésion des nouveaux monocytes et de déclencher la déstabilisation de la plaque à un stade avancé de la maladie (Clinton *et al.*, 1992; Rosenfeld *et al.*, 1992). Quand les macrophages sont imbibés de lipides, ils se transforment en cellules spumeuses. En même temps, les ox-LDL peuvent se regrouper pour former des amas lipidiques dans l'espace subendothélial. Ensemble, les amas de lipides et les cellules spumeuses sont à l'origine de l'expansion de la plaque athérosclérotique et du développement du «*core*» athéromateux, aussi appelé noyau ou centre athéromateux (Figure 3) (Libby, 2002; Ross, 1999).



**Figure 3** Schématisation de l'expansion de la plaque athérosclérotique.

A) migration des CML (*smooth muscle cells*, SMC), accumulation des LDL et formation des cellules spumeuses (*foam cells*); B) augmentation du volume de la plaque et rupture de la plaque. Tiré de (Libby *et al.*, 2011b).

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: [Nature](#). Peter Libby, Paul M Ridker, Göran K. Hansson, Progress and Challenges in Translating the Biology of Atherosclerosis, 473, 317–325, Copyright (2011). License Number : 2986061473703

La réponse inflammatoire des macrophages est avant tout un déclencheur de nécrose cellulaire : l'amplification de la réaction inflammatoire finit tôt ou tard par éliminer certaines cellules, dont les macrophages et les lymphocytes T eux-mêmes. Les débris de ces cellules nécrotiques s'accumulent à l'intérieur du noyau athéromateux et a pour conséquence d'augmenter le volume de la plaque et de fragiliser la lésion (Hansson *et al.*, 2011).

Simultanément, les cellules musculaires migrent de la média vers l'intima où elles prolifèrent sous l'effet des facteurs de croissance dérivés des macrophages comme le PDGF. Suite à cette prolifération, les cellules musculaires perdent leur fonction contractile et elles se transforment en cellules sécrétrices synthétisant des fibres de collagène, d'élastine et des protéoglycans (Cohen *et al.*, 1992; Rekhter, 1999). Dans la matrice extracellulaire, les cellules musculaires forment une couche fibromusculaire

protectrice autour du cœur athéromateux, appelée la chape fibreuse ou la capsule fibreuse. Ainsi, une plaque d'athérosclérose mature est formée d'un cœur athéromateux et d'une capsule fibreuse. À ce stade de la formation de la plaque, il est possible de détecter la première strie lipidique. Ces stries lipidiques, aussi appelées les plaques pré-athérosclérotiques, peuvent se produire tôt au cours de la vie, dès l'enfance, et peuvent être réversibles. En effet, un diagnostic précoce de sujets jeunes présentant des facteurs de risque telle l'hypercholestérolémie permet une intervention clinique et une prévention des complications pathologiques (Ross, 1999; Stary *et al.*, 1995).

#### **1.2.4.3. La progression de la plaque**

Les LDL continuent d'adhérer aux CE et de s'oxyder et les macrophages se transforment progressivement en cellules spumeuses. Le développement d'une strie lipidique vers l'étape de formation d'une plaque athéromateuse mature est un processus qui s'étale sur de nombreuses années (Sitia *et al.*, 2010). On parle d'une plaque avec des manifestations cliniques lorsque sa taille bouche 50% ou plus de la lumière artérielle par rapport à une artère saine; à ce stade de l'évolution, l'athérosclérose est considérée significative et irréversible (Bulelzai *et al.*, 2012).

Les études réalisées sur le plan anatomo-pathologique décrivent deux formes distinctes de plaques athéromateuses en fonction de la sévérité de lésion: la plaque athéromateuse stable qui est cliniquement silencieuse et sans incidents graves, et la plaque athéromateuse instable ou vulnérable à la rupture et à l'érosion qui, elle, est symptomatique et représente un obstacle à la circulation menant à l'ischémie du tissu concerné (Levin *et al.*, 1982; Stary *et al.*, 1995). La stabilité de la plaque n'est pas déterminée nécessairement par sa dimension, qui peut être de plusieurs centimètres de diamètre, mais plutôt par la taille du noyau lipidique et l'épaisseur de la chape fibreuse qu'elle entoure, ainsi que par la sévérité de la réponse inflammatoire globale (Stary *et al.*, 1995). En effet, la plaque devient vulnérable lorsque son noyau athéromateux augmente en volume (Figure 3) et est séparé de la surface intimale uniquement par une mince chape fibreuse, un processus qui se déroule sur de nombreuses années. Ainsi, la présence (migration et prolifération) des CML au niveau de la lésion peut jouer un rôle

essentiel et bénéfique dans la mesure où l'épaisseur de la couche de CML formée détermine la vulnérabilité de la plaque (Libby *et al.*, 2011b; Naghavi *et al.*, 2003a; Naghavi *et al.*, 2003b).

Une fois détachée de son lieu de formation, il y a la rupture. La plaque circulante peut alors entraîner l'obstruction d'une artère et donc, la thrombose. Ce phénomène est à l'origine de presque toutes les maladies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux.

#### **1.2.4.4. La rupture de la plaque**

Plusieurs questions se posent quant au devenir d'une plaque athérosclérotique : qu'est-ce qui déclenche sa rupture? Pourquoi la plaque reste-t-elle silencieuse ou évolue-t-elle vers sa forme instable? Quels sont les mécanismes responsables des accidents ischémiques aigus?

Trois hypothèses peuvent expliquer la fissuration mécanique et le détachement de la plaque : le premier scénario, le plus commun (plus de 60 % des cas cliniques) est l'évolution brutale du volume de la plaque athéromateuse elle-même, qui mène à la rupture mécanique de la chape fibreuse; la deuxième hypothèse est l'érosion endothéliale en aval de la plaque avec la formation d'un thrombus qui peut obstruer la lumière artérielle et la troisième hypothèse fait appel à l'hémorragie des petits capillaires au sein de la plaque athérosclérotique (hémorragie intra-plaque) (Davies, 1997; Libby, 2002; Virmani *et al.*, 2000).

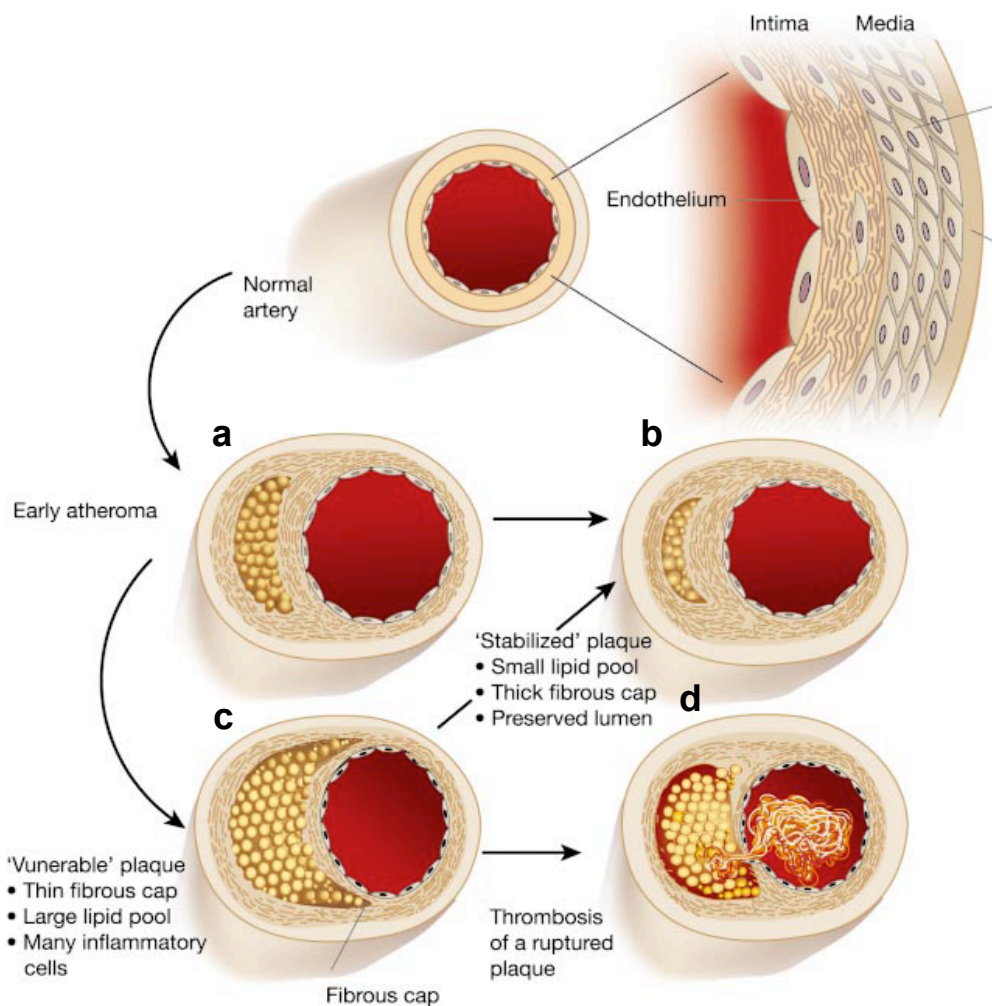
##### **1.2.4.4.1. Premier mécanisme: augmentation du volume de la plaque**

De toute évidence, l'augmentation du volume de la plaque dans la lumière vasculaire aboutit à une réduction de calibre et diminue progressivement l'apport sanguin vers l'organe qui est nourri par cette artère (Figure 4a). Pour contrer une telle situation, l'artère recourt au remodelage excentrique, un phénomène qui exige une hypertrophie de la paroi artérielle (Cai *et al.*, 2008; Libby, 2002). Ceci est tout à fait logique dans la mesure où l'artère essaie d'adapter son calibre aux changements hémodynamiques

produits. Sur le plan structural, deux types de remodelage artériel ont été décrits : compensatoire et constrictif.

Comme son nom l'indique, un remodelage compensatoire se produit suite à la progression de la plaque, afin de garder la lumière artérielle à sa taille normale et de façon comparable à celle d'une artère non touchée. Il s'agit d'un élargissement latéral au niveau de la paroi vasculaire (Libby, 2001). Ce phénomène, connu comme le phénomène de Glogov, engendre la formation d'une plaque athérosclérotique stable et silencieuse (Figure 4b). Lorsque la plaque fibrolipidique augmente de façon à rétrécir significativement l'espace du passage du sang, le remodelage de la paroi est constrictif : la chape fibreuse est plus mince que dans les stades précédents et le noyau nécrotique gagne beaucoup en volume (Figure 4c). Deux critères sont essentiels pour rendre la plaque vulnérable: l'effet protéolytique de certaines enzymes et le phénomène d'apoptose des CML (Lee *et al.*, 1997).





**Figure 4** Schématisation des différentes étapes possibles dans le mécanisme d'augmentation du volume de la plaque.

Tirée de (Libby, 2002).

Réimprimé avec la permission de Macmillan Publishers Ltd: [Nature](#). Peter Libby, Inflammation in Atherosclerosis, 420 (6917), 868-874, Copyright (2002). License Number : 2986071383583

Suite à leur migration de la média vers l'endothélium et à travers la lame basale, les CML dans l'intima sont susceptibles d'entrer en apoptose, un phénomène essentiel pour contrôler le nombre des CML autant dans le remodelage que lors de la rupture de plaque

(Bennett, 1999). Les CML sensibles à l'apoptose sont surtout localisées dans la région fragile de la plaque (site de rupture), une observation qui laisse croire à leur implication directe dans le mécanisme de rupture (Geng *et al.*, 1995). En plus de la mort des CML qui entraîne la diminution de la synthèse des éléments structuraux, les cytokines (par exemple TNF- $\alpha$ , IL1/6 et INF- $\gamma$ ) inhibent la synthèse du collagène par les CML, et créent une autre voie par laquelle les cytokines inflammatoires vulnérabilisent la plaque (Bennett, 1999; Geng *et al.*, 1995; Libby, 2002).

L'apoptose des CML est le déterminant final de la rupture de plaque. En effet, plusieurs stimuli de surface, des voies de signalisation intracellulaires, des cytokines et des mécanismes de régulation de l'expression génique (protéines impliquées dans la signalisation de la mort cellulaire) réagissent en synergie ou de façon individuelle afin de déclencher l'apoptose des CML (pour revue (Bennett, 1999)).

Tous les changements transitoires produits, c'est à dire 1) la persistance des facteurs de risque déclenchant, 2) l'inflammation chronique, 3) la mort des CML, 4) la dégradation de la matrice fibreuse (activation de la protéolyse), ainsi que 5) l'accumulation des débris cellulaires suite à l'apoptose des CE et des macrophages, aboutissent tôt ou tard à l'amincissement de la couche de la chape qui tapisse le noyau lipidique et finissent par provoquer l'ulcération de la plaque (à partir du site fragile de la chape), permettant ainsi la libération des constituants du noyau lipidique dans la circulation. La maladie silencieuse devient alors une maladie symptomatique (Figure 4d).

Une déchirure de la plaque initie la cascade de coagulation et l'activation plaquettaire au niveau de la lésion, deux critères essentiels pour exacerber la pathogenèse de la thrombose.

#### **1.2.4.4.2. Deuxième mécanisme: la lésion endothéliale**

Un autre mécanisme potentiel fait intervenir l'intégrité de l'endothélium (Eliasziw *et al.*, 1994). En effet, une lésion endothéliale peut conduire à la formation d'une zone de dénudation provoquant la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines, ce qui stimule l'adhésion des cellules circulantes ainsi que la migration et la prolifération intensives des CML. La lésion endothéliale expose le collagène, ce qui déclenche

rapidement l'agrégation plaquettaire au niveau du site concerné. Une grande étude a été réalisée sur une cohorte de 659 patients dans la phase avancée de la maladie (sténose sévère) ; elle démontre qu'indépendamment de la taille de la lésion, la présence d'un ulcère est suffisante pour augmenter significativement le risque des accidents cérébraux (Fisher *et al.*, 2005). Ce type d'ulcération de plaque peut être d'une importance clinique assez grande puisqu'il représente un quart des cas mortels de thrombose coronaire (Fisher *et al.*, 2005; Saba *et al.*, 2007).

#### **1.2.4.4.3. Troisième mécanisme: néo-vascularisation et hémorragie**

La croissance de la plaque athérosclérotique s'accompagne toujours d'un phénomène de néo-vascularisation (Doyle *et al.*, 2007; Moulton, 2006) : les nouveaux capillaires prennent leur origine dans l'adventice et migrent à travers la média vers la plaque. Ceci produit une abondance de capillaires au sein de la plaque et fait en sorte d'assurer la diffusion non seulement des nutriments, mais aussi des composants sanguins vers le tissu néo-formé, incluant les lymphocytes et les LDL (Libby, 2002). Il y a quelques années, des chercheurs (Moreno *et al.*, 2004) ont rapporté une association entre la rupture de la plaque et la densité de néovascularisation au sein de la plaque. Cette étude confirme que l'abondance des microvaisseaux corrèle avec des niveaux accrus d'inflammation et d'infiltration des macrophages. Lorsque le volume de la plaque atteint son maximum, le phénomène d'hémorragie de ces petits capillaires particulièrement fragiles peut entraîner une ulcération, voire une rupture des parois de la chape fibreuse et causer l'instabilité de la plaque (Jeziorska *et al.*, 1999). Bien que ce mécanisme soit complexe et ne soit pas complètement compris, les facteurs angiogéniques joueraient un rôle dans l'initiation de cet évènement.

En résumé, la formation de la plaque athéromateuse fait intervenir plusieurs étapes successives où la strie lipidique évolue vers la formation des cores athéromateux et aboutit à une plaque vulnérable à la rupture. Les acteurs principaux dans ce processus sont les lipoprotéines des ox-LDL, les macrophages, les CML et les CE. Ces joueurs interviennent dans la régulation de tous les mécanismes associés à la progression de la

plaque : l'entrée des LDL dans l'espace intimal, l'infiltration des monocytes et leur transformation en macrophages et en cellules spumeuses. Ces étapes sont alimentées par l'inflammation, l'oxydation et l'apoptose cellulaires menant enfin à la rupture de la plaque. La physiopathologie de l'athérosclérose et l'expansion du volume de la plaque font également appel à l'angiogenèse qui, non seulement sert à vasculariser, mais participe aussi à l'instabilité de la plaque.

### **1.2.5. L'angiogenèse physiologique, pathologique et son rôle dans le développement de la plaque**

#### **1.2.5.1. L'angiogenèse physiologique**

L'angiogenèse est le processus à partir duquel de nouveaux capillaires sanguins (le *vasa vasorum*) se forment à partir de vaisseaux préexistants. Ce concept de base a été proposé pour la première fois par Judah Folkman, selon qui la vascularisation est un processus essentiel pour la croissance des tumeurs car elle assure l'apport d'éléments nutritifs au tissu cancéreux (Folkman, 1971). L'angiogenèse est un phénomène physiologique qui intervient dans des processus vitaux de l'organisme tels que le développement embryonnaire, la réparation tissulaire et la reproduction. Il s'agit d'un processus complexe nécessitant l'implication cruciale des CE qui, malgré leur faible taux de renouvellement dans les situations habituelles (Grover-Paez *et al.*, 2009), sont capables après stimulation par l'hypoxie ou des facteurs de croissance, de se répliquer et de former des nouveaux vaisseaux (Ribatti *et al.*, 2008). L'ensemble conduit à la formation de capillaires dont la lumière est en continuité avec celle des troncs vasculaires où ils ont pris naissance (Folkman, 1971). Le processus de néo-angiogenèse débute dans la partie de la paroi vasculaire destinée à émettre un nouveau capillaire, par une perte de contact entre les CE et les péricytes avec une augmentation de la perméabilité vasculaire induite par les facteurs angiogéniques (Goudar *et al.*, 2008). Suite à cette activation, les CE secrètent des protéases afin de dégrader la lame basale. Par la suite, les CE migrent à travers la matrice extracellulaire vers la source angiogénique où elles se mettent à proliférer sous l'effet des facteurs de croissance sécrétés dans le milieu et elles finissent

par former un capillaire dépourvu de cellules périvasculaires (Goudar *et al.*, 2008). Ultérieurement, il y a recrutement et différenciation des cellules périvasculaires par les facteurs pro-angiogéniques en formant des bourgeons sous forme de tubes capillaires, les nouveaux vaisseaux sanguins dont les parois sont non perméables mais fonctionnelles (Carmeliet, 2000; Hickey *et al.*, 2006). Sous l'influence de différents stimuli, ce processus biologique peut devenir néfaste pour l'organisme et est à l'origine de l'apparition de plusieurs pathologies. Par exemple, un excès d'angiogenèse accompagné d'inflammation favorise la formation d'une tumeur; en revanche, une baisse d'angiogenèse peut entraîner une hypoxie dans l'organe touché. La situation est complexe puisque l'hypoxie serait elle-même le déclencheur majeur du processus d'angiogenèse (Hickey *et al.*, 2006; Ribatti *et al.*, 2008).

#### **1.2.5.2. L'angiogenèse pathologique**

Dès 1957, Paterson et ses collaborateurs décrivaient la présence de microvaisseaux dans la plaque athérosclérotique (Paterson *et al.*, 1957). En 1981, cette observation a été confirmée par Heistad et al. qui ont rapporté une forte perfusion intimale et adventitielle dans des conditions pathologiques telles que l'hypercholestérolémie et l'athérosclérose (Heistad *et al.*, 1981). Dans un travail remarquable, Kumamoto et al. ont confirmé que dès le stade précoce de la formation de l'athérosclérose, ou même tôt au cours de l'initiation des premières stries lipidiques, la néovascularisation est dérivée de l'adventice (dans 97% des cas) et prend place préférentiellement dans l'intima qui s'épaissit typiquement avec la maladie (Kumamoto *et al.*, 1995). De nos jours, plusieurs résultats expérimentaux supportent la corrélation entre l'angiogenèse et la progression de l'athérosclérose chez l'humain ; toutefois, un lien de causalité n'a pas été établi (Moreno *et al.*, 2004). Au début des années 90, O'Brien et son équipe ont réalisé une étude clinique sur 201 patients coronariens et ils ont montré la présence d'une zone de vascularisation dans la plaque athérosclérotique (O'Brien *et al.*, 1994). Cette même étude démontre que les CE dans la plaque possèdent une capacité répliquative élevée (avec une indice de réplication de 43%), normalement absente dans les CE d'une personne adulte (indice de réplication <0,25%), suggérant un mécanisme d'angiogenèse

au sein de la plaque athérosclérotique (O'Brien *et al.*, 1994). Le processus d'angiogenèse de la plaque athérosclérotique chez l'Homme a été décrit par plusieurs autres chercheurs: en 2004, Moreno *et al.*, dans une étude incluant 269 patients, ont noté que la densité de la néovascularisation était plus grande dans la plaque instable comparativement à la plaque stable et que le nombre de microvaisseaux nouvellement formés est en corrélation directe avec la sévérité de l'inflammation dans l'environnement de la plaque (Moreno *et al.*, 2004). En accord avec ces données, des analyses récentes par résonance magnétique, sur une période de 18 mois, confirment que l'abondance de néocapillaires est corrélée avec une augmentation du volume du corps nécrotique à l'intérieur de la plaque (Takaya *et al.*, 2005), suggérant ainsi que l'hémorragie stimule aussi le processus d'inflammation.

La région de néovascularisation est riche en macrophages qui pourraient être une des sources de libération de cholestérol libre à l'intérieur de la plaque (Mofidi *et al.*, 2001; O'Brien *et al.*, 1994; Virmani *et al.*, 2005). De plus, O'Brien *et al.* ont décrit une présence accrue des molécules d'adhésion, E-sélectine, VCAM-1 et ICAM-1 au niveau des néocapillaires en corrélation avec l'augmentation de la densité des cellules inflammatoires dans cet environnement tissulaire (O'Brien *et al.*, 1996). Cette infiltration cellulaire est considérée comme extrêmement importante pour attirer les leucocytes vers l'espace sous-endothélial (Moulton *et al.*, 2003). Ce concept est non négligeable si on prend en considération l'importance de la surface endothéliale résultant de la néovascularisation. La vascularisation permet non seulement la diffusion des LDL, des cellules inflammatoires et de l'oxygène, mais aussi le transport des cytokines et des facteurs de croissance plasmatiques (Chen *et al.*, 2006a; Moreno *et al.*, 2004). En effet, l'excès de capillaires conduit à une accumulation de LDL et de phospholipides oxydés dans l'espace de la plaque (Bochkov *et al.*, 2006), qui, à leur tour, stimulent la libération de facteurs angiogéniques (Chen *et al.*, 2006a).

La néovascularisation est donc une source de nutriments et d'oxygène pour la plaque, mais son rôle essentiel est de contribuer à son expansion et de mener à sa rupture.

### 1.2.5.3. Les régulateurs endogènes de l'angiogenèse

Chez l'adulte et dans des conditions physiologiques, l'angiogenèse est biologiquement silencieuse. Ce processus est soumis à l'influence de différents régulateurs dont la balance qualitative (activateurs *versus* inhibiteurs) et quantitative (régulation à la hausse *versus* régulation à la baisse) dicte le destin de l'artère (Moulton, 2006; Ribatti *et al.*, 2008). Une augmentation de la concentration des facteurs activateurs ne suffit pas pour initier le processus d'angiogenèse, il est impérativement nécessaire de diminuer en parallèle les inhibiteurs endogènes, quelque soit la nature des stimuli: l'hypoxie, l'inflammation et/ou les ROS (Moulton, 2006).

#### 1.2.5.3.1. Les facteurs pro-angiogéniques endogènes

Dans le tissu néo-vascularisé de la plaque athérosclérotique, plusieurs facteurs ont été identifiés et validés pour leur rôle pro-angiogénique; il s'agit des facteurs de croissance, des chimiokines, des cytokines inflammatoires et des métalloprotéinases (Chen *et al.*, 2006a; Herrmann *et al.*, 2006; Moulton, 2006).

##### a) Le VEGF

Le facteur de croissance dérivé de l'endothélium vasculaire, le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est le facteur angiogénique le mieux caractérisé. Il augmente la perméabilité endothéliale aux protéines circulantes, aux macromolécules et même à des cellules (pour revue (Nagy *et al.*, 2008)). La participation du VEGF au processus d'athérosclérose a été mise en évidence par une augmentation du nombre de macrophages circulants et une expansion du volume de la plaque suite à l'injection d'une faible dose (2 $\mu$ /kg) chez des souris athérosclérotiques (Celletti *et al.*, 2001). Le VEGF déclenche le mécanisme de transmigration monocytaire (Barleon *et al.*, 1996; Clauss *et al.*, 1990). Son expression et son abondance corrélient positivement avec la sévérité de la plaque et avec l'apparition des symptômes pathologiques de l'athérosclérose (Bjornheden *et al.*, 1999). Une baisse de la quantité d'oxygène dans l'environnement hypoxique des CE et des macrophages, stabilise et active le facteur de transcription nucléaire inductible par l'hypoxie (HIF-1, *hypoxia inducible factor-1*) qui augmente le niveau circulant de VEGF (Bjornheden *et al.*, 1999; Namiki *et al.*, 1995).

De plus, la surexpression de VEGF a été détectée dans les CE avant l'apparition des stries lipidiques et même avant la dysfonction endothéliale (Herrmann *et al.*, 2001), ce qui suggère que l'angiogenèse joue un rôle décisif dans la prédiction de l'avenir de la plaque. Le VEGF intervient également au niveau de l'accumulation des leucocytes dans la paroi vasculaire par un mécanisme qui stabilise les interactions entre les cellules inflammatoires et les CE (Kim *et al.*, 2001).

En plus d'avoir un rôle pro-angiogénique, le VEGF agit comme une cytokine pro-inflammatoire au cours du processus d'angiogenèse de la plaque. En effet, dans un modèle de souris athérosclérotiques (hypercholestérolémiques et déficientes en ApoE), l'expression de VEGF déclenche une réponse pro-inflammatoire menant à la formation d'une nouvelle intima chez ces souris (Zhao *et al.*, 2004). L'utilisation d'un anticorps contre le récepteur au VEGF (Flt-1) diminue la formation de la plaque athéromateuse (Zhao *et al.*, 2004) et réduit le taux des monocytes circulants (Luttun *et al.*, 2002), suggérant un rôle pathologique du VEGF dans l'athérosclérose. Cependant, la complexité du processus d'athérosclérose fait en sorte que la modulation de l'angiogenèse n'est pas contrôlée par un seul facteur.

#### *b) Le FGF*

De façon similaire au VEGF, l'expression d'un autre médiateur pro-angiogénique, le facteur de croissance des fibroblastes (FGF, *Fibroblast growth factor*), est augmentée au niveau de la plaque (Brogi *et al.*, 1993; Herrmann *et al.*, 2006). La surexpression du FGF induit à la fois une angiogenèse et une progression de la plaque athérosclérotique (Edelman *et al.*, 1992; Nabel *et al.*, 1993). Point intéressant, il a été proposé que l'effet du VEGF ne puisse pas être dissocié de celui du FGF, puisque l'expression de ces deux facteurs angiogéniques est augmentée en présence des ox-LDL (Edelman *et al.*, 1992). De plus, l'inhibition de la voie du VEGF par un antagoniste spécifique au Flt-1 amplifie le signal angiogénique passant par le FGF, ce qui annule l'effet de l'antagoniste (Edelman *et al.*, 1992).

#### *c) Les angiopoïétines*

La famille des angiopoïétines pourrait également jouer un rôle dans l'athérosclérose (Trollope *et al.*, 2011). L'isoforme-1 de cette molécule, l'angiopoïétine-1, est essentielle pour garder l'intégrité et la stabilité des vaisseaux sanguins lors de l'angiogenèse, elle



inhibe la perméabilité vasculaire et elle est anti-inflammatoire (Trollope *et al.*, 2011). Il a été démontré que l'angiopoïétine-1 prévient l'effet inflammatoire du VEGF en empêchant ce dernier de stimuler l'expression des molécules d'adhésion telles que ICAM-1 et VCAM-1 à la surface des CE, ce qui réduit l'adhésion des cellules inflammatoires et, en conséquence, diminue l'inflammation (Kim *et al.*, 2001). Au contraire, l'angiopoïétine-2, considérée comme un antagoniste naturel de l'angiopoïétine-1 (Post *et al.*, 2008), est caractérisée par ses effets anti-angiogéniques, pro-inflammatoires et pro-athérogéniques. En effet, les souris déficientes pour l'angiopoïétine-2 ont une résistance aux stimuli inflammatoires, alors qu'une injection de la protéine angiopoïétine-2 recombinante redonne la capacité à ces souris de répondre à l'environnement inflammatoire (Fiedler *et al.*, 2006). Dans une étude récente, Post *et al.* ont montré qu'un ratio élevé d'angiopoïétine-2 : angiopoïétine-1 est nécessaire pour assurer la vulnérabilité de la plaque à la rupture (Post *et al.*, 2008).

#### *d) Les angiopoïétines-like*

Finalement, mais non les moindres, les protéines *angiopoïétines-like* (Angptls), homologues aux angiopoïétines, ont été décrites initialement pour leur rôle angiogénique et métabolique (Camenisch *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 1999a; Le Jan *et al.*, 2003; Oike *et al.*, 2004a; Oike *et al.*, 2009b). Cependant, l'implication des Angptls lors de l'athérogénèse est encore méconnue. Les Angptls constituent un ensemble de protéines nouvellement identifiées, sécrétées dans la circulation sanguine (Hato *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 1999b). Une section (1.3.2.) est dédiée pour détailler les principales fonctions biologiques connues de ces protéines.

#### **1.2.5.3.2. Les facteurs anti-angiogéniques endogènes**

Un des facteurs anti-angiogéniques endogènes les mieux étudiés est la thrombospondine-1 (TSP1) (Ren *et al.*, 2006). TSP1 inhibe la prolifération des CE alors qu'elle produit un effet mitogénique autocrine dans les CML de la lésion athérosclérotique, lui suggérant un rôle dans la maturation des vaisseaux sanguins (Moura *et al.*, 2008). TSP1 pourrait être impliquée dans la régulation de l'athérosclérose parce qu'elle possède des effets anti-inflammatoires (Frangiannis *et al.*, 2005) et anti-

adhésifs (Bonney *et al.*, 2006) et parce que son expression est fortement augmentée dans la plaque athérosclérotique de souris hypercholestérolémiques (Riessen *et al.*, 1998). Une délétion génétique de cette protéine chez la souris augmente l'infiltration leucocytaire à travers l'endothélium vasculaire, induit une réponse inflammatoire accrue et une accélération de la formation de la plaque (Moura *et al.*, 2008). Toutefois, l'effet de cette protéine sur la progression de la maladie chez l'Homme n'a pas encore été étudié.

La collagénase XVIII est une autre protéine anti-angiogénique dont la présence dans l'environnement de la plaque inhibe l'extension des *vasa vasorum* et, en conséquence, diminue la vulnérabilité de la plaque. En effet, Moulton *et al.* ont démontré qu'une perte génétique de l'expression de cette collagénase favorise la formation de nouveaux vaisseaux, augmente le nombre des macrophages circulants et la taille de la plaque athéromateuse (Moulton *et al.*, 2004).

Certains membres de la famille des protéines angiopoïétines-like, tels que l'Angptl1 et 4, exercent des effets anti-angiogéniques (section 1.3.2.1.). L'implication des angiopoïétines-like dans le mécanisme d'angiogenèse est discuté en détails dans les sections 1.3.2.1 et 1.4.3.1.

En plus des facteurs anti-angiogéniques endogènes, des traitements pharmacologiques ont été évalués dans le cadre de l'athérosclérose. Des souris déficientes en ApoE (ApoE<sup>-/-</sup>) et soumises à un régime riche en cholestérol ont été traitées avec deux facteurs anti-angiogéniques, l'endostatine et le TNP-470, des molécules qui agissent exclusivement sur la prolifération des CE; ces traitements ont conduit à une réduction de la néovascularisation et à une régression de la taille de la plaque (Moulton *et al.*, 1999). Cependant, chez l'Homme, aucune thérapie anti-angiogénique n'a encore démontré d'efficacité dans la progression de la plaque (Herrmann *et al.*, 2006).

Tous ces travaux pris dans leur ensemble suggèrent que l'angiogenèse est un élément critique dans l'évolution (expansion et rupture) de la plaque et laissent croire aux effets bénéfiques potentiels d'une thérapie anti-angiogénique dans le traitement de l'athérosclérose. Bien que la plaque évolue sur plusieurs années, souvent de façon

asymptomatique, plusieurs facteurs de risque peuvent être la cause directe de sa progression.

### **1.2.6. Les facteurs de risque cardiovasculaires**

L'athérosclérose est une maladie chronique multifactorielle. Parmi les facteurs de risque qui contribuent largement à son développement, on compte la dyslipidémie, l'âge, l'obésité, le diabète, l'hypertension et le tabagisme. Dans cette thèse, je ne parlerai que de la dyslipidémie et du tabagisme, deux aspects que j'ai considérés durant mes travaux.

#### **1.2.6.1. La dyslipidémie et le risque d'athérosclérose**

La dyslipidémie athérogénique constitue un désordre quantitatif et/ou qualitatif des cholestérols et des triglycérides sanguins. La dyslipidémie correspond à une augmentation du niveau des LDL-cholestérols et une réduction des lipoprotéines de haute densité (HDL, *high density lipoprotein*) (hypercholestérolémie) et à une concentration élevée des triglycérides (hypertriglycéridémie) (Cooney *et al.*, 2009).

Tel que mentionné précédemment, la responsabilité des LDL dans l'initiation et l'évolution de l'athérosclérose est largement établie. Dès 1948, les données de l'étude de Framingham chez l'Homme confirment la corrélation positive entre le taux de cholestérol circulant et le risque de maladie coronarienne (Castelli, 1988). La dyslipidémie est donc considérée comme un facteur prédictif des événements cardiovasculaires (Grover-Paez *et al.*, 2009; Sitia *et al.*, 2010). Par la suite, de nombreux travaux ont démontré que le mécanisme d'action de la dyslipidémie affecte directement la fonction de l'endothélium : la dyslipidémie déclenche une dysfonction endothéliale en altérant la fonction vasodilatatrice de l'endothélium, augmente la rigidité vasculaire et stimule l'adhésion des leucocytes (Gratchev *et al.*, 2012; Mitra *et al.*, 2011). La dyslipidémie est associée à un stress oxydant, une surproduction endothéliale de superoxyde qui est capable d'inactiver le NO et de produire des peroxynitrites (ONOO), d'oxyder les LDL et de causer des dommages à l'ADN et à la membrane cellulaire (O'Brien *et al.*, 1997). De plus, les concentrations de l'inhibiteur endogène de la eNOS, la diméthylarginine asymétrique (*asymmetric dimethylarginine*, ADMA), sont plus

élevées chez les patients hypercholestérolémiques (Vladimirova-Kitova *et al.*, 2008), ce qui pourrait également contribuer à la dysfonction endothéliale et à l'athérogenèse.

La dyslipidémie peut également conduire à la prolifération des CML, à la formation de cellules spumeuses et à la sécrétion de cytokines inflammatoires (Sitia *et al.*, 2010). De plus, les taux élevés de LDL sont associés à un état inflammatoire *via* la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (Gratchev *et al.*, 2012; Mitra *et al.*, 2011). Finalement, l'hypercholestérolémie déclenche la synthèse et la sécrétion des formes circulantes des molécules d'adhésion telles que sICAM-1 et sVCAM (Hackman *et al.*, 1996). Il est donc évident que la dyslipidémie favorise le développement de l'athérosclérose et des plaques athérosclérotiques.

#### **1.2.6.2. Le tabagisme et le risque d'athérosclérose**

L'exposition à la fumée de cigarette active ou passive est un facteur de risque cardiovasculaire bien établi. La cigarette est responsable de plus de la moitié des décès liés aux maladies cardiovasculaires en Amérique du Nord (Ezzati *et al.*, 2004). L'inhalation de la fumée libérée dans l'environnement augmente de 30 % les risques de mourir de maladies cardiaques (Law *et al.*, 2003).

La fumée de cigarette est capable d'activer à elle seule des réactions pro-oxydantes, pro-inflammatoires, pro-athérombotiques et cancérigènes (Ambrose *et al.*, 2004; Mazzone *et al.*, 2010). Tous ces effets néfastes sont principalement causés par les ROS produits suite à la combustion du tabac. En effet, la fumée de cigarette est très riche en superoxyde, hydroxyle radicalaire, peroxyde d'hydrogène et en peroxydinitrite responsables de la cytotoxicité et de la dysfonction endothéliale (Peluffo *et al.*, 2009; Rajj *et al.*, 2001; Tsuchiya *et al.*, 2002). Les ROS induisent la peroxydation des lipides membranaires, des dommages à l'ADN (cassures dans le double brin, un mécanisme responsable de l'effet cancérigène), l'oxydation de l'ARN, des dommages mitochondriaux et l'apoptose (Chen *et al.*, 2004b; Mazzone *et al.*, 2010; Rajj *et al.*, 2001). Des études réalisées *in vivo* et *in vitro* démontrent qu'un traitement avec des antioxydants prévient les dommages causés par l'exposition à la fumée de cigarette (Kelly, 2003; Kelly, 2002).

La multitude de substances oxydantes contenues dans la fumée de cigarette provoquent des dommages à la surface de l'endothélium vasculaire; la puissante réponse inflammatoire qui en résulte est la cause directe de la dysfonction endothéliale menant au développement de l'athérosclérose. En effet, chez les fumeurs le taux circulant de cellules sanguines inflammatoires et surtout, leur recrutement et leur transmigration au niveau du site d'inflammation, sont des mécanismes considérablement actifs comparativement à ceux des non fumeurs (Hansen *et al.*, 1990). De plus, la production en excès des ROS chez les fumeurs déclenche l'expression de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-8 et le TNF- $\alpha$  (Lee *et al.*, 2012) ainsi que la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des CE telles que la sélectine, l'ICAM-1 et VCAM-1 (Alamanda *et al.*, 2012; Ueno *et al.*, 2006). Un tel environnement provoque une altération de la matrice extracellulaire suite à l'activation des enzymes métalloprotéinases (MMP-1 et MMP-9) (Palozza *et al.*, 2012) et est relié avec un plus haut niveau de chimiokines circulantes qui sont essentielles pour le recrutement des cellules inflammatoires, ainsi que d'autres marqueurs sanguins notamment le CRP (Mazzone *et al.*, 2010; McMullen *et al.*, 2000; Nordskog *et al.*, 2003). Les fumeurs ont donc un plus grand risque de thrombose.

Dans le contexte des maladies inflammatoires chroniques, par exemple la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), nous avons démontré que le niveau circulant du marqueur d'inflammation, l'angiopoïétine-like2 (Angptl2), est plus élevé chez les fumeurs comparativement aux sujets non-fumeurs (Farhat *et al.*, 2008). Dans le cadre de l'athérosclérose, les fumeurs présentent un profil lipidique propice au développement de la maladie : un niveau élevé des LDL, des triglycérides et des LDL totaux, accompagné par un faible taux de HDL (Criqui *et al.*, 1987; Neufeld *et al.*, 1997). C'est l'environnement parfait pour l'oxydation lipoprotéique, en particulier des LDL, par les ROS générés suite à la combustion de la cigarette. Par ailleurs, il a aussi été démontré que le tabac déclenche le remodelage vasculaire en favorisant la migration des CML de la média vers l'intima (Chen *et al.*, 2010). Ainsi, les fumeurs ont non seulement plus de risques de former la plaque athérosclérotique, mais ont aussi un taux de rupture de la plaque significativement plus élevé que les non-fumeurs (Ambrose *et al.*, 2004; Mazzone *et al.*, 2010).

En résumé, la liste des effets néfastes de la fumée de cigarette sur le système cardiovasculaire est longue, elle conduit à 1) la lésion et la dysfonction endothéliales, 2) l'oxydation des LDL pour favoriser leur phagocytose par les cellules, 3) le recrutement de cellules inflammatoires dans les parois vasculaires, 4) l'augmentation des taux circulants des marqueurs inflammatoires et la relâche de chimiokines qui causent la migration et la différenciation des CML, 5) la formation de plaques athérosclérotiques et 6) l'ulcération des plaques. Étonnamment, il a été démontré que le simple fait d'arrêter de fumer renverse, à long terme, les effets délétères de la cigarette (Pipe *et al.*, 2010).

En conclusion, les différents facteurs de risque cardiovasculaire induisent tous une inflammation chronique et une dysfonction endothéliale, qui se traduit par une altération de la capacité de l'endothélium à vasodilater et par une transformation de ses fonctions physiologiques en propriétés pro-adhésives, pro-thrombotiques et pro-athérosclérotiques. Des marqueurs circulants qui reflètent la présence de facteurs de risque sont présentement utilisés en clinique afin d'évaluer le risque d'un accident cardiovasculaire.

### **1.2.7. Les biomarqueurs potentiels de l'athérosclérose**

Par définition, un biomarqueur doit fidèlement refléter la présence de facteurs de risque et l'apparition de la maladie. Parmi les biomarqueurs de l'athérosclérose figurent les marqueurs de l'inflammation, les marqueurs lipoprotéiques, les cytokines et les formes solubles des molécules d'adhésion (Kampoli *et al.*, 2009; Virani *et al.*, 2008).

#### **1.2.7.1 Les marqueurs de l'inflammation**

##### *a) La protéine CRP*

Parmi les marqueurs les plus étudiés, on compte la protéine CRP, un marqueur inflammatoire chronique dont une faible augmentation de niveau circulant est un indicateur de risque cardiovasculaire significatif (Ridker *et al.*, 2000). La protéine CRP est principalement sécrétée par les hépatocytes (MacIntyre *et al.*, 1983) mais aussi par

les adipocytes et les CML de l'aorte (Calabro *et al.*, 2003) face à une réaction inflammatoire et à la présence de cytokines (notamment l'IL-6, l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$ ) (Calabro *et al.*, 2003; Hirschfield *et al.*, 2003). L'avantage de la CRP comparativement à un autre marqueur inflammatoire est sa stabilité dans le plasma ou le sérum et son dosage reproductible (Ridker *et al.*, 2000).

Depuis une dizaine d'années, toutes les études épidémiologiques effectuées rapportent une association positive entre la concentration circulante de la CRP et la progression des maladies cardiovasculaires (Ballantyne *et al.*, 2004; Ridker *et al.*, 2008). En 2004, une vaste analyse qui a ciblé 7068 patients coronariens, confirme que la CRP est un biomarqueur des maladies cardiovasculaires (Danesh *et al.*, 2004). De plus, il a également été prouvé que suite à un traitement avec des statines qui réduit le taux de LDL circulant et améliore les événements cliniques qui y sont associés, le niveau de hs-CRP [protéine réactive C à haute sensibilité (*high sensitivity C reactive protein*)] est diminué (Ridker *et al.*, 2005).

À la lumière de ces résultats, il a été proposé qu'une augmentation de CRP est causée par la lésion athérosclérotique, reflétant son expansion et sa sévérité, mais aucune donnée expérimentale n'a confirmé cette hypothèse (Abd *et al.*, 2011; Paffen *et al.*, 2006). Par ailleurs, plusieurs études décrivent une fonction délétère directe de la protéine CRP sur la paroi vasculaire en favorisant l'apparition de la lésion athérosclérotique à une concentration égale ou proche de celle détectée chez les sujets coronariens (Paffen *et al.*, 2006). En effet, la protéine CRP produit une dysfonction endothéliale en inhibant la production du NO (Qamirani *et al.*, 2005) et en augmentant l'expression des molécules d'adhésion telles que l'ICAM-1, VCAM-1 et la E-sélectine à la surface de CE (Pasceri *et al.*, 2000). De même, l'expression des facteurs chimiotactiques, le MCP-1 et CXCL, est déclenchée en présence de CRP (Devaraj *et al.*, 2004; Pasceri *et al.*, 2001). Ces changements favorisent l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium vasculaire, première étape de la formation de la plaque athérosclérotique. Les CML peuvent aussi être des cibles de l'action pro-inflammatoire et pro-athérogénique de la CRP. Cette protéine stimule en effet la migration, la prolifération et la production des ROS par les CML (Hattori *et al.*, 2003). Enfin, la CRP se lie spécifiquement aux ox-LDL de la plaque pour favoriser leur capture par les

macrophages induisant ainsi la formation des cellules spumeuses au sein de la plaque athéromateuse (Zwaka *et al.*, 2001). En résumé, la protéine CRP pourrait non seulement être considérée comme un biomarqueur mais aussi comme un facteur de risque impliqué dans le processus de la lésion athérosclérotique.

#### b) La Lp-PLA2

La phospholipase A2 associée à une lipoprotéine (Lp-PLA2, *Lipoprotein associated phospholipase A2*), aussi appelée le facteur d'activation des plaquettes acétylhydrolase (*platelet-activating factor acetylhydrolase*, PAF-AH), est sécrétée dans la sang par les monocytes et les macrophages (Asano *et al.*, 1999; Stafforini *et al.*, 1990) où elle circule majoritairement associée aux LDL (70-80%) et aux HDL (Stafforini *et al.*, 1987). Cette enzyme est connue pour son rôle dans l'hydrolyse des phospholipides oxydés des ox-LDL, ce qui libère des médiateurs pro-inflammatoires tels que les acides gras oxydés et des lysophosphatidylcholines (Gorelick, 2008). Il a récemment été démontré qu'au niveau de la lésion athérosclérotique, l'enzyme Lp-PLA2 hydrolyse les ox-LDL et génère des particules des LDL phospholipolysées qui sont facilement accumulées dans les macrophages (Karabina *et al.*, 2006). Ces particules peuvent elles-mêmes déclencher la production de cytokines pro-inflammatoires et possèdent des propriétés pro-athérogéniques (Gora *et al.*, 2010; Karabina *et al.*, 2006), ce qui suggère que la Lp-PLA2 est un facteur de risque athérogénique potentiel (Gilstrap *et al.*, 2012).

Plusieurs études prospectives ont affirmé qu'une élévation du niveau plasmatique de l'enzyme Lp-PLA2 est hautement associée à un risque accru d'événements cardiovasculaires (Ballantyne *et al.*, 2004; Koenig *et al.*, 2004). Dans une vaste étude réalisée sur 5595 patients, l'étude *West of Scotland Coronary Prevention Study* (WOSCOPS), le risque des événements cardiovasculaires est 2 fois plus élevé chez les patients avec les plus hauts taux sanguins de Lp-PLA2 (Shepherd *et al.*, 1995). Cette corrélation semble de plus être indépendante des facteurs de risque traditionnels et/ou d'autres marqueurs inflammatoires, y compris la protéine CRP (Kampoli *et al.*, 2009; Shepherd *et al.*, 1995). Ces observations ont été supportées par trois autres grandes études, l'étude ARIC (*Atherosclerosis Risk in Communities*) (Ballantyne *et al.*, 2004), l'étude MONICA (*Monitor Trends in Cardiovascular disease*) (Koenig *et al.*, 2004) et



l'étude *Rotterdam study* (Oei *et al.*, 2005), qui montrent que le taux de Lp-PLA2 est un marqueur prédictif des maladies cardiovasculaires, y compris l'athérosclérose.

### 1.2.7.2 Les marqueurs lipoprotéiques

Vu l'implication majeure des lipides dans l'athérogénèse, le dosage des apolipoprotéines B et A-1 (en particulier le rapport ApoB/ApoA-I) a suscité beaucoup d'espoirs en tant que biomarqueur prédictif des maladies cardiovasculaires (Kampoli *et al.*, 2009). L'ApoB est présente dans les particules lipidiques athérogéniques telles les lipoprotéines de très basse densité (VLDL, *very low-density lipoproteins*), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL, *intermediate density lipoproteins*) et plus particulièrement dans les LDL (Kampoli *et al.*, 2009; Walldius *et al.*, 2004). Pour cette raison, la mesure des niveaux de l'ApoB reflète les quantités totales des particules lipidiques athérogéniques présentes dans le sang. L'ApoA-I, quant à elle, est le composant majeur des particules HDL anti-athérogéniques. C'est pourquoi la mesure de l'ApoA-I est inversement associée au risque, alors que l'ApoB l'est positivement; les valeurs indiquent que le rapport de ces deux lipoprotéines dans le sang est un index prédictif des maladies cardiovasculaires (Walldius *et al.*, 2001).

Les études épidémiologiques ont permis de valider cliniquement l'utilisation de ces deux biomarqueurs lipoprotéiques. L'étude AMORIS (*Apolipoprotein-related MOrtality RiSk*), étalée sur 12 ans chez plus de 300 000 sujets, a montré que l'ApoB et l'ApoA-I sont des biomarqueurs plus puissants que le cholestérol-LDL, en particulier chez les sujets ayant un niveau de LDL normal ou faiblement élevé (Walldius *et al.*, 2001). L'étude INTERHEART est comparable à l'étude AMORIS et confirme l'association ( $p < 0,00001$ ) existante entre le ratio ApoB/ApoA-I et le risque de maladies cardiovasculaires quelque soit le sexe, l'âge ou l'origine ethnique (Yusuf *et al.*, 2004). Finalement l'étude *Copenhagen City Heart Study* confirme que les profils plasmatiques des apolipoprotéines prédisent le risque des maladies cardiovasculaires (Benn *et al.*, 2007).

### 1.2.7.3 Les cytokines et les molécules d'adhésion solubles

Les cytokines circulantes, l'IL-1 et l'IL-8 sont exprimées par les différentes cellules participant aux processus inflammatoires et jouent un rôle dans le développement des pathologies vasculaires et la formation de la plaque athéromateuse (Kampoli *et al.*, 2009). De ce fait, leurs taux circulants augmentent avec la progression de la maladie ; elles peuvent donc être considérées comme des biomarqueurs des maladies cardiovasculaires. L'IL-1 par exemple, est capable à elle seule de stimuler la production des cytokines inflammatoires, des molécules d'adhésion, de recruter des leucocytes aux sites de la lésion et de stimuler la prolifération des CML (Dinarello, 1996). L'administration de l'inhibiteur endogène de l'IL-1, l'antagoniste  $\alpha$  du récepteur de l'IL-1 (IL-1R  $\alpha$ , *IL-1 receptor antagonist*  $\alpha$ ), chez des souris est suffisante pour prévenir l'inflammation (Arend *et al.*, 1998). De façon similaire, une délétion du gène codant pour cette protéine atténue la lésion athérosclérotique (Merhi-Soussi *et al.*, 2005).

Les résultats expérimentaux obtenus avec l'IL-8, qui appartient elle aussi à la superfamille de l'IL-1 (Gracie *et al.*, 2003), sont très similaires à ceux obtenus avec l'IL-1. En effet, l'injection de la protéine recombinante de l'IL-18 chez la souris conduit au développement spontané de l'athérosclérose, alors que celle de son inhibiteur naturel prévient la lésion en réduisant le volume de la plaque (Dinarello, 2006). Bien que ces cytokines démontrent une forte association avec le développement des maladies cardiovasculaires, l'utilisation de ces biomarqueurs est encore au stade précoce de la recherche et des études supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer leur intérêt clinique.

En conclusion, cette revue de littérature souligne l'intérêt de détecter des molécules dans la circulation sanguine afin d'évaluer et diagnostiquer le risque d'athérosclérose. Parmi les biomarqueurs de l'athérosclérose figurent les marqueurs inflammatoires et les lipoprotéines. Récemment, les angiopoïétines-like (Angptls) circulantes ont été identifiées comme des régulateurs potentiels du métabolisme énergétique, des facteurs pro-angiogéniques et pro-inflammatoires : l'équipe du Dr Oike a rapporté un rôle potentiel des angiopoïétines-like dans les maladies inflammatoires chroniques telles que

le diabète, l'obésité et les maladies coronariennes (Tabata *et al.*, 2009). Les Angptls ne sont cependant pas considérées comme des biomarqueurs et leur rôle dans l'athérogenèse n'est pas encore défini.

### **1.3. La super famille des angiopoïétines-like**

Les Angptls sont une famille de protéines constituée de sept membres qui partagent des similitudes structurales avec les membres de la famille des angiopoïétines (Kim *et al.*, 1999a), ce qui leur a valu le nom d'*angiopoïétin-like proteins* ou *angiopoïétin-related protein* (ARP) (Kim *et al.*, 1999b).

Nous nous intéressons tout particulièrement au deuxième membre de la famille des Angptls, l'Angptl2. Un chapitre complet (1.4) est consacré à la littérature publiée sur le sujet de l'Angptl2, le thème central de cette thèse.

#### **1.3.1. Identification et caractérisation structurale des Angptls**

Le clonage moléculaire et l'identification de la première Angptl ont été réalisés par l'équipe sud-coréenne du Dr Koh en 1999 (Kim *et al.*, 1999b). Dans cette étude remarquable, les auteurs ont utilisé la technique de PCR (pour réaction d'amplification en chaîne) à la base d'homologie structurale [avec une séquence d'acides aminés (a.a.) conservée entre les angiopoïétines] afin d'isoler de nouveaux candidats potentiels à partir de la librairie des cADN du cœur humain adulte. Une nouvelle protéine de 491 a.a. a été isolée et identifiée comme la troisième angiopoïétine (nommée initialement angiopoïétine-3), car elle possédait les caractéristiques typiques des autres membres de cette famille : un domaine *coiled-coil* en N terminal suivi par un domaine d'homologie au fibrinogène (*fibrinogen-like domain*) à son extrémité C terminale (Figure 5).



Réimprimé avec la permission du journal : It is the policy of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology to allow reuse of any material published in its journals ([the Journal of Biological Chemistry](#), [Molecular & Cellular Proteomics](#) and [the Journal of Lipid Research](#)) in a thesis or dissertation at no cost and with no explicit permission needed.

La protéine dénommée angiopoïétine-3 possède 29% et 26% d'homologie avec l'angiopoïétine-1 et -2, respectivement (Kim *et al.*, 1999a) (Figure 5). De plus, en se basant sur les analyses de la séquence peptidique de cette nouvelle protéine, les auteurs ont démontré la présence d'une région hautement hydrophobe de 21 a.a., correspondant à une séquence typique de peptide signal, ce qui signifie pour l'angiopoïétine-3 la possibilité d'être sécrétée dans la circulation sanguine (Kim *et al.*, 1999a). La même année, le groupe de Yancopoulos a identifié d'autres membres de la famille des angiopoïétines qu'ils ont nommés angiopoïétine-3 et angiopoïétine-4, dévoilant une plus grande homologie de séquence avec l'angiopoïétine-1 et l'angiopoïétine-2 qu'avec la protéine identifiée en Corée (Valenzuela *et al.*, 1999). Suite à cette découverte, l'équipe du Dr Koh a alors remplacé le nom de leur protéine originalement baptisée angiopoïétine-3 par ARP1 (ou Angptl1).

Quelques mois plus tard, l'équipe du Dr Koh a isolé et identifié l'ARP2 (ou Angptl2) qui, elle, partage 59% d'homologie avec l'ARP1 (Kim *et al.*, 1999b). Par la suite, le travail du Dr Conklin a démontré la présence d'une troisième Angptl (Angptl3) avec une expression qui semble être restreinte dans foie chez la souris et chez l'Homme (Conklin *et al.*, 1999; Romeo *et al.*, 2009).

A partir de l'an 2000, des recherches intensives sur cette nouvelle famille de protéines ont permis d'identifier quatre membres supplémentaires : l'Angptl4 (aussi appelée *fast-induced adipose factor*) (Kersten *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000), l'Angptl5 (Zeng *et al.*, 2003), l'Angptl6 (couramment nommée le facteur de croissance relié à l'angiopoïétine, *angiopoietin-related growth factor*, AGF) (Oike *et al.*, 2004a; Zeng *et al.*, 2003) et l'Angptl7 (Katoh *et al.*, 2006). Très récemment, une nouvelle Angptl, l'Angptl8, a été découverte, elle régulerait l'Angptl3 (Quagliarini *et al.*, 2012).

Malgré la similitude structurale avec les angiopoïétines, les Angptls se distinguent par une absence d'affinité pour les récepteurs tyrosine-kinase Tie1 ou Tie2, les récepteurs spécifiques des angiopoïétines (Kim *et al.*, 1999b). De ce fait, les Angptls ont été considérées, jusqu'à très récemment (voir section 1.4.2), comme des ligands orphelins. Quelques études récentes ont tenté d'identifier les récepteurs spécifiques de ces protéines. La comparaison de la structure primaire (Figure 5) des membres de la famille Angptls avec celle des angiopoïétines révèle que la région C terminale, domaine de liaison au récepteur Tie2, est conservée parmi toutes les Angptls (Oike *et al.*, 2004b). De plus la séquence primaire en acides aminés du domaine C terminal des Angptls prédit que celles-ci contiennent 4 (Kim *et al.*, 1999b; Oike *et al.*, 2004b) des 6 cystéines indispensables pour la liaison des angiopoïétines au récepteur Tie2 (Figure 5) (Maisonpierre *et al.*, 1997). Ces observations réfutent donc l'hypothèse selon laquelle une hétérogénéité structurale entre les Angptls et les angiopoïétines serait à l'origine de la différence de fonctions entre ces deux familles de protéines (Hato *et al.*, 2008).

**Tableau II** Résumé des différentes fonctions identifiées pour les Angptls  
(Adapté de (Miida *et al.*, 2010))

Angptls	Autres noms	Distribution (Tissus spécifiques)	Angiogenèse	Effet sur les lipoprotéines	Expansion de CSH
<i>Angptl1</i>	ARP1, Ang3, AngY, ANGPT3, angioarrestin	Cœur, reins, placenta, thyroïde, intestins	Pro/anti	Pas connu	Pas connu
<i>Angptl2</i>	ARP2, HARP	Cœur, intestins, rate, estomac	Pro	Pas connu	Stimulation
<i>Angptl3</i>	ANGPT5	Foie (exclusive?)	Pro	HDL-cholestérol ↑ TG ↓	Stimulation
<i>Angptl4</i>	ARP4, NL2, pp1158, FIAF, PGAR, HARP	Foie (fortement exprimée), tissu adipeux, et autres (reins, poumons, pancréas, placenta)	Pro/anti	HDL-cholestérol ↓ TG ↑	Pas connu
<i>Angptl5</i>	Pas connu	Tissu adipeux (fortement exprimée), cœur et autres	Pas connu	Pas connu	Stimulation
<i>Angptl6</i>	ARP5, AGF	Foie	Pro	Pas connu	Pas connu
<i>Angptl7</i>	CDT6, AngX	Cornée	Pas connu	Pas connu	Stimulation

TG : Triglycérides; CSH : Cellules souches hématopoïétiques.

Réimprimé avec la permission de Wolters Kluwer Health: [Current Opinion in Lipidology](#). Miida Takashi, Hirayama Satoshi, Impact of angiopoietin-like protein metabolism and cardiovascular events, 21 (1), 70-75, Copyright (2010). License Number : 3010920663031

## 1.3.2. Fonctions exercées par les Angptls

### 1.3.2.1 Rôle des Angptls dans l'angiogenèse

Pour caractériser des composés pro/anti-angiogéniques, l'étude *in vitro* de leur impact chimio-attractant et de leur capacité à stimuler la tubulogénèse est couramment utilisée. Ces tests préliminaires sont complétés par des études fonctionnelles *in vivo*. Les études effectuées jusqu'à présent concernant les propriétés angiogéniques des différentes Angptls sont résumées dans le Tableau II.

En 1999, le Dr Kim et son équipe ont rapporté pour la première fois un rôle possible de l'Angptl1 et de l'Angptl2 dans la régulation du processus angiogénique *in vitro* (Kim *et al.*, 1999b). Dans des CE en culture de l'artère pulmonaire de porc, quelques jours après une exposition à l'Angptl1 ou l'Angptl2, ils ont noté une augmentation de la formation de bourgeons tubulaires, de l'ordre de 3,4 fois en présence d'Angptl1 et de 6,5 fois pour l'Angptl2 (Kim *et al.*, 1999b), ce qui suggère que l'Angptl1 et 2 stimulent le processus d'angiogenèse.

Une autre série d'expériences réalisées *in vivo* par le Dr Oike et ses collaborateurs va sensiblement dans la même direction. Ces auteurs ont généré deux types de souris transgéniques surexprimant les gènes de l'Angptl1 ou de l'Angptl2, où l'expression de ces protéines est sous le contrôle du promoteur K14 spécifique aux kératinocytes (Oike *et al.*, 2004b). Chez les souris qui surexpriment l'Angptl2, mais pas l'Angptl1, on observe une augmentation du nombre de vaisseaux sanguins au niveau de la peau. L'Angptl2, mais pas l'Angptl1, apparaît donc comme un facteur pro-angiogénique (Oike *et al.*, 2004b). En fait, les études publiées sur l'Angptl1 sont contradictoires puisqu'en 2002 le Dr Dhanabal démontre que l'Angptl1 possède un profil anti-angiogénique en empêchant la formation de tumeurs chez la souris par l'inhibition des processus critiques reliés à l'angiogenèse tels que la migration, la prolifération et la formation de tubules par les CE (Dhanabal *et al.*, 2002). Ainsi, selon le contexte, il a été proposé que l'Angptl1 puisse avoir des actions anti- ou pro-angiogéniques (Tableau II) (Dhanabal *et al.*, 2002).



Des données limitées concernant le rôle de l'Angptl3 dans le processus d'angiogenèse suggèrent que cette protéine stimule l'angiogenèse *in vitro* : elle produit la migration des CE de la veine ombilicale (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) et elle induit la formation de tubules lorsque les HUVEC sont cultivées sur une couche de matrice extracellulaire synthétique, une fonction qui semble être régulée par les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  (Camenisch *et al.*, 2002). Ces données supportent un rôle de l'Angptl3 dans l'angiogénèse (Tableau II). De plus, l'Angptl3 a également comme effet d'augmenter la synthèse de VEGF (Song *et al.*, 2009). Des études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si l'action pro-angiogénique de l'Angptl3 est un effet direct et propre, ou s'il est indirectement relié à l'effet pro-angiogénique du VEGF. Les propriétés pro-angiogéniques de l'Angptl3 ont été confirmées *in vivo* où elle déclenche la néo-angiogenèse de la cornée chez le rat, à des niveaux comparables à ceux induits par le VEGF (Camenisch *et al.*, 2002).

L'Angptl4 semble également exercer un rôle angiogénique (Tableau II): son expression est augmentée par plusieurs facteurs de croissance tels que le facteur de croissance transformant  $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* , TGF $\beta$ ) (Padua *et al.*, 2008). De plus, dans un modèle d'angiogenèse *in vitro*, la protéine recombinante d'Angptl4 prolonge la survie et stimule la formation des tubules par les CE, un effet qui est indépendant du VEGF (Gealekman *et al.*, 2008; Hermann *et al.*, 2005). De même, l'expression d'Angptl4 a été associée à l'angiogenèse induite par l'expansion du tissu adipeux dans un modèle de souris obèses (Gealekman *et al.*, 2008). Il a été proposé que l'Angptl4 est un des gènes cibles les plus sensibles à l'hypoxie (Gonzalez-Muniesa *et al.*, 2011). En effet, l'hypoxie contrôle l'expression de l'Angptl4 en favorisant la stabilisation de son ARN et en déclenchant sa synthèse protéique, spécifiquement dans les régions hypoxiques (Le Jan *et al.*, 2003). Finalement, l'Angptl4 étant induite par l'hypoxie, il a été confirmé qu'elle modifie l'environnement tumoral et stimule l'angiogenèse en faveur du cancer (Ma *et al.*, 2010; Nakayama *et al.*, 2011).

Des résultats contradictoires suscitent cependant de la confusion concernant l'implication de l'Angptl4 dans l'angiogenèse (Tableau II) : certaines équipes ayant démontré qu'elle est anti-angiogénique. *In vitro*, l'ajout de la forme recombinante de

l'Angptl4 dans des CE en culture inhibe leur capacité migratoire, empêche leur pouvoir invasif et inhibe même la prolifération de ces cellules (Ito *et al.*, 2003). *In vivo*, ces phénomènes s'accompagnent d'une suppression de la néovascularisation après perfusion d'Angptl4 dans la cornée des souris (Ito *et al.*, 2003). La formation de tumeurs est aussi atténuée sous l'effet de l'Angptl4, une observation qui pourrait être due à l'inhibition de l'angiogenèse au sein de la zone tumorale (Ito *et al.*, 2003). Récemment, l'équipe du Dr Yang (Yang *et al.*, 2008) a proposé que la divergence des résultats obtenus, pro- *versus* anti-angiogéniques, est due à l'existence d'une forme tronquée circulante de l'Angptl4 (au niveau carboxyterminal), suite à la protéolyse extracellulaire de la forme longue (Ge *et al.*, 2004a; Mandard *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2009). Cette forme tronquée semble être capable d'exercer une fonction anti-angiogénique dans les CE (Yang *et al.*, 2008).

L'Angptl6 semble également exercer une fonction pro-angiogénique (Tableau II) car les souris surexprimant cette protéine au niveau de l'épiderme présentent une hypervascularisation de la peau, comparativement aux souris témoins (Oike *et al.*, 2004b). De plus, les souris qui surexpriment l'Angptl6 ont une prolifération accrue de kératinocytes, de cellules de l'épiderme et de cellules vasculaires qui les entourent (Oike *et al.*, 2003). Cette fonction mitogénique de l'Angptl6 pourrait s'expliquer par son effet chimio-attractant qu'elle exerce sur les CE et qui conduirait à la néovascularisation (Okazaki *et al.*, 2012). Il a aussi été démontré que l'Angptl6 stimule la migration, la propagation, ainsi que l'adhésion des CE *in vitro* (Zhang *et al.*, 2006b). *In vivo*, dans un modèle murin d'ischémie au niveau des membres inférieurs, une injection intraveineuse d'Angptl6 recombinante dans les régions affectées augmente le flux sanguin *via* l'induction des mécanismes d'angiogenèse et d'artériogenèse (Urano *et al.*, 2008).

Malgré l'absence de données concernant un rôle potentiel de l'Angptl1, 5 ou 7 dans le processus de néoangiogenèse (Tableau II), l'ensemble des études mentionnées ci-dessus suggère que les Angptls sont globalement impliquées dans le mécanisme d'angiogenèse, dans un contexte pathologique tel que les maladies ischémiques. De ce fait, le développement thérapeutique de molécules dirigées contre ces protéines pourrait être intéressant.

### 1.3.2.2 Rôle des Angptls dans le métabolisme des lipides

Plusieurs études décrivent un rôle de l'Angptl3, 4 et 6 dans le contrôle énergétique (Tableau II). En effet, l'Angptl3 et 4 régulent le métabolisme des lipides (Kadomatsu *et al.*, 2011) et l'Angptl6 contrôle le bilan énergétique (Hato *et al.*, 2008; Oike *et al.*, 2009b). La relation, si elle existe, entre les Angptl1, 5 et 7 et le métabolisme des lipides n'est pas connue (Tableau II). Le rôle de l'Angptl2 dans le métabolisme des lipides n'est de même pas connu, aucun variant génétique n'ayant encore été associé avec des désordres métaboliques chez l'Homme (Mattijssen *et al.*, 2012). Les fonctions connues de l'Angpt2 sont détaillées au chapitre 1.4.

L'Angptl4, le membre le plus étudié de sa famille, a originalement été référée comme étant induite dans les adipocytes lors du jeûne ; elle est aussi appelée le facteur induit par le jeûne ou *fasting-induced adipocyte factor* (Kersten *et al.*, 2000), ce qui sous-entend une implication dans les processus métaboliques. Cette protéine est majoritairement exprimée par les adipocytes et les hépatocytes, où elle est régulée positivement par les récepteurs stimulés par les activateurs de peroxyosome (*Peroxisome proliferator-activated receptors*, PPAR) tels que les PPAR $\alpha$  dans le foie et les PPAR $\gamma$  dans le tissu adipeux (Mattijssen *et al.*, 2012), ainsi que par leurs agonistes (par exemple la rosiglitazone, un puissant agoniste du PPAR $\gamma$ ) (Xu *et al.*, 2005). L'Angptl4 a pour fonction d'inhiber l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL), l'enzyme responsable de l'hydrolyse des triglycérides des lipoprotéines (HDL et LDL) (Yoshida *et al.*, 2002). Etant donné que les PPAR et la LPL influencent directement le métabolisme des lipides, l'Angptl4, joue elle aussi un rôle non négligeable dans la régulation du profil lipidique, avec une implication pathologique potentielle.

Les souris surexprimant Angptl4, avec une surexpression modérée de la protéine dans le muscle squelettique, le cœur et le tissu adipeux, présentent les phénotypes suivants : un faible poids corporel et un tissu adipeux moins important (réduction jusqu'à 50 %), une réduction du volume des adipocytes et une augmentation du niveau des acides gras libres dans la circulation (Mandard *et al.*, 2006). Ces changements sont typiquement observés lors d'une masse adipeuse réduite chez l'Homme (Mandard *et al.*, 2006). Dans

le même ordre d'idée, une autre étude montre que l'administration d'un adénovirus codant pour l'Angptl4 chez des souris témoins produit une hyperlipidémie accompagnée d'une stéatose hépatique résultante de l'accumulation des lipides (triglycérides) dans les hépatocytes (Xu *et al.*, 2005). En revanche, les souris déficientes pour l'Angptl4 présentent les phénotypes inverses : une hypotriglycéridémie et une activité accrue de la LPL (Koster *et al.*, 2005). L'abondance de l'Angptl4 dans le tissu adipeux est associée à une stimulation de l'expression de la lipase des triglycérides (triglycéride lipase des adipocytes) qui cause directement la lipolyse dans le tissu adipeux, empêche ou réduit la synthèse de triglycérides et favorise l'oxydation des acides gras (Lichtenstein *et al.*, 2007). Dans le foie, la deuxième source majeure de l'Angptl4, sa surexpression déclenche les mêmes mécanismes (Figure 6) : une inhibition de l'activité de la lipase hépatique, l'enzyme responsable de la capture du cholestérol au niveau du foie, influençant ainsi le métabolisme du cholestérol (Lichtenstein *et al.*, 2007). Il a été de plus prouvé que la surexpression de l'Angptl4 chez la souris accélère la vitesse de synthèse du cholestérol et empêche son stockage dans le foie par un mécanisme qui implique l'inhibition des deux lipases (la LPL et la lipase hépatique) (Lichtenstein *et al.*, 2007). Ces résultats prouvent que l'Angptl4 (circulante ou locale) agit comme communicateur inter-organe afin de moduler les taux de lipides dans le sang.

Alors que l'Angptl4 inactive la LPL en dissociant irréversiblement ses dimères actifs en monomères solubles et non actifs, l'Angptl3, quant à elle, bloque l'activité de la LPL de façon réversible en interagissant avec le domaine catalytique (Shan *et al.*, 2009). Tout comme pour l'Angptl4, l'Angptl3 conduit à une augmentation du niveau de triglycérides plasmatiques (Shan *et al.*, 2009), et une mutation de perte de fonction déclenche une hypolipidémie chez la souris (Koishi *et al.*, 2002). L'Angptl3, qui s'exprime en grande partie dans le foie chez l'Homme comme chez la souris (Conklin *et al.*, 1999), déclenche la clairance des triglycérides et augmente le niveau des LDL dans le sang *via* l'inhibition de la LPL (Tableau II), un effet qui semble être additif à celui de l'Angptl4 (Koster *et al.*, 2005). Inversement, les souris Angptl3<sup>-/-</sup> ont un faible niveau de triglycérides et elles sont capables de réduire l'expansion du tissu adipeux suite à une

diète riche en gras (Fujimoto *et al.*, 2006), ce qui indique l'importance de l'Angptl3 dans la régulation de l'adipogenèse.

Chez la souris surexprimant l'Angptl3, une inhibition de l'activité de la LPL résulte en une baisse du taux des acides gras libres (non estérifiés) plutôt qu'en une hausse (Shimamura *et al.*, 2003), ce qui suggère que l'Angptl3 stimule en parallèle un mécanisme de lipolyse en se liant à un récepteur extracellulaire exprimé par le tissu adipeux (Kersten, 2005; Shimamura *et al.*, 2003) (Figure 6). En plus d'avoir des fonctions similaires, les Angptl 3 et 4 possèdent des mécanismes de régulation moléculaires très homologues ; ces deux protéines sont détectées sous formes oligomériques dans la circulation et subissent un clivage protéolytique générant ainsi différentes formes (Kersten, 2005). Il est donc possible que l'impact physiopathologique et les mécanismes d'action des Angptl3 et 4 soient, du moins en partie, semblables.

Malgré cette homologie, certaines fonctions sont propres à chaque Angptl (Hato *et al.*, 2008). En effet, l'Angptl3 est surtout régulée par le récepteur nucléaire X du foie (LXR, ou récepteur des oxystérols, *liver X receptor*) (Inaba *et al.*, 2003), sans toutefois démontrer une sensibilité aux PPAR (Kersten, 2005). Le gène de l'Angptl3 est une cible directe du LXR par l'intermédiaire des éléments régulateurs de la transcription génique (LXRE, éléments de réponse au LXR, *LXR response elements*) qui se trouvent dans le promoteur de l'Angptl3 (Inaba *et al.*, 2003). L'administration d'un agoniste du LXR, le TO901317, pendant deux jours, produit une nette élévation des triglycérides chez les souris normales, alors que les souris Angptl3<sup>-/-</sup> sont protégées contre les effets néfastes du TO901317, ce qui suggère que les effets hypertriglycéridémiques résultants de l'activation des LXR sont en réalité transmis par l'Angptl3. En plus de sa fonction comme inhibiteur de la LPL, il a été récemment rapporté que l'Angptl3 est capable de réguler l'activité de la lipase endothéliale (Shimamura *et al.*, 2007). Cette dernière est spécifique pour sa capacité à hydrolyser les phospholipides des HDL et en inhibant cette activité, l'Angptl3 favorise une élévation des HDL circulants (Hato *et al.*, 2008). De façon intéressante, chez l'Homme, une forte corrélation est présente entre le niveau de l'Angptl3 et le taux plasmatique de HDL-cholestérol mais pas avec celui de triglycérides (Shimamura *et al.*, 2007), ce qui laisse croire que l'effet de l'Angptl3 sur l'inhibition de

la lipase endothéliale (métabolisme des HDL) domine celui de l'inhibition de la LPL (Hato *et al.*, 2008).

L'Angptl6, quant à elle, est un puissant facteur de croissance jouant un rôle dans le développement et la maturation du système vasculaire (Oike *et al.*, 2004a). La génération de souris invalidées pour le gène Angptl6 (souris Angptl6<sup>-/-</sup>) s'est avérée difficile puisque 80 % des souris meurent de malformations au niveau du système cardiovasculaire (Oike *et al.*, 2005b). Bien que la consommation de nourriture de ces souris Angptl6<sup>-/-</sup> semble normale, le phénotype métabolique des souris Angptl6<sup>-/-</sup> est atypique : il se caractérise par un stockage de gras dans les muscles et les hépatocytes, une hypercholestérolémie et une élévation du taux des acides gras circulants (Oike *et al.*, 2005b). Inversement, les souris chez qui l'Angptl6 est constitutivement exprimée à l'aide d'adénovirus sont minces et caractérisées par une réduction des dépôts de tissus adipeux par comparaison avec leurs homologues témoins (Oike *et al.*, 2005b). De plus, contrairement à l'Angptl3 et 4, l'Angptl6 n'affecte en aucune manière les niveaux plasmatiques de triglycérides, démontrant que l'Angptl6 n'est pas un inhibiteur de la LPL (Kersten, 2005).

### 1.3.2.3. Rôle des Angptls dans le métabolisme du glucose

Outre leur rôle dans le métabolisme des lipides, les Angptls possèdent aussi un rôle dans la régulation de l'homéostasie du glucose. La surexpression de l'Angptl4 diminue le niveau de glucose chez la souris (*db/db*) (Xu *et al.*, 2005). Les auteurs proposent un effet inhibiteur direct de l'Angptl4 sur la production du glucose hépatique comme mécanisme possible (Figure 6) (Xu *et al.*, 2005). Le rôle modulateur exercé sur le foie a été confirmé dans des hépatocytes en culture où l'adénovirus surexprimant l'Angptl4 entraîne une inhibition de la gluconéogenèse et une augmentation de la sensibilité à l'insuline (Koster *et al.*, 2005).

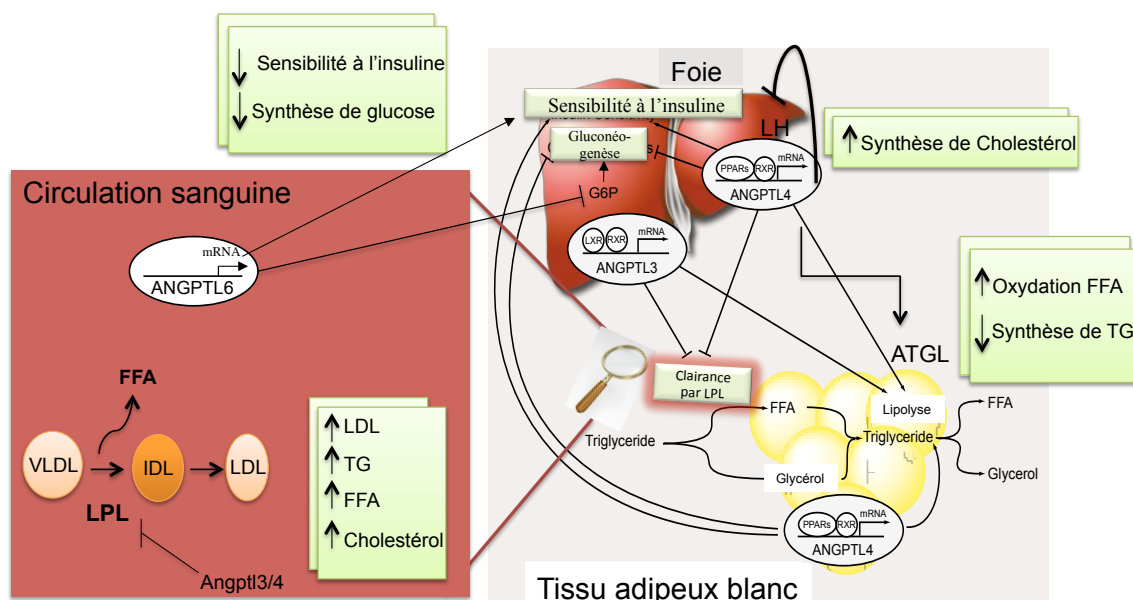
La littérature publiée au sujet de l'Angptl3 ne permet pas d'établir un lien avec l'homéostasie du glucose.

L'Angptl6 semble avoir un effet sur le métabolisme du glucose (Figure 6) ; elle augmente la sensibilité à l'insuline et inhibe la glyconéogenèse. D'un point de vue

mécanistique, il a été démontré que l'Angptl6 produit un effet suppresseur de la voie de la gluconéogenèse dans le foie, et de façon moins claire dans le tissu adipeux, *via* l'activation de la voie PI3K/Akt, menant ainsi à l'inhibition de l'expression de l'enzyme clé dans la voie de gluconéogenèse, la glucose-6-phosphatase (Kadomatsu *et al.*, 2011) (Figure 6).

Les fonctions connues de l'Angptl2 sur le métabolisme du glucose sont détaillées au chapitre 1.4.

Pour résumer, nous avons regroupé les différentes données concernant les effets métaboliques des Angptl3, 4 et 6 dans le schéma suivant (Figure 6) :



**Figure 6** Les Angptl3, 4 et 6 sont de puissants signaux pour le tissu adipeux et le foie.

L'Angpt3 dérivée du foie produit un effet délétère sur les adipocytes en inhibant l'activité de la LPL et en favorisant la lipolyse, conduisant ainsi à une augmentation du cholestérol, des acides gras libres (FFA), des triglycérides (TG) et des LDL. L'Angptl4 contrôle le métabolisme des lipides et l'homéostasie du glucose : elle inhibe la LPL et la lipase hépatique (LH), favorisant ainsi la capture et la synthèse du cholestérol, elle stimule le métabolisme du glucose *via* la diminution de la sensibilité hépatique à l'insuline et l'inhibition de la sécrétion du glucose. Dans le tissu adipeux,

l'Angptl4 active l'adipocyte triglyceride lipase (ATGL), l'oxydation des acides gras libres et empêche la formation de triglycérides, en faveur de l'usage énergétique. L'Angptl6 joue un rôle bénéfique dans l'homéostasie du glucose par le foie : elle améliore la sensibilité à l'insuline, bloque la production de glucose-6-phosphate (G6P) et par conséquent, la synthèse du glucose (gluconéogenèse).

Le concept des désordres métaboliques étant étroitement lié au développement des maladies cardiovasculaires, l'identification des Angptls comme des molécules potentiellement impliquées dans le métabolisme des lipides et du glucose est d'une haute importance. Les données présentées dans cette section suggèrent un impact non négligeable des Angptl3, 4 et 6 dans le maintien ou le déplacement de l'équilibre métabolique et, par conséquent, un rôle physio-pathologique.

### **1.3.3. L'impact des fonctions métaboliques des Angptls sur les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires**

#### **1.3.3.1. La dyslipidémie**

Plusieurs études décrivent un rôle potentiel de l'Angptl3 et 4 dans la dyslipidémie chez la souris (Inukai *et al.*, 2004; Koishi *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2009); ce phénomène est moins bien caractérisé chez l'humain (Pisciotta *et al.*, 2012; Shoji *et al.*, 2009). Concernant l'Angptl6, peu de données ont été publiées à ce sujet : deux études concernant des variants génétiques de l'Angptl6 ont été effectuées chez l'Homme, mais elles n'indiquent pas l'impact des différents polymorphismes sur la dyslipidémie (Legry *et al.*, 2009; Romeo *et al.*, 2009).

La première étude qui visait à déterminer le rôle des Angptls dans la dyslipidémie, chez la souris, a montré qu'une injection intraveineuse de l'adénovirus dans le but de surexprimer les protéines Angptl3 ou 4, entraîne un profil lipidique typique de la dyslipidémie : une élévation des triglycérides et du cholestérol dans le sang de la souris (Shimizu-gawa *et al.*, 2002). De plus, cette même étude a démontré qu'une délétion de perte de fonction résulte en une hypotriglyceridémie malgré une hyperglycémie causée



par une insulino-résistance (Shimizu-gawa *et al.*, 2002). Ces études ont prouvé que les effets marqués de l'Angptl3/4 sur le niveau de triglycérides (après une longue période de jeûne) pourraient résulter de l'inhibition de la clairance des VLDL-TG (suite à l'inhibition de LPL), plutôt que de la stimulation de la synthèse hépatique de VLDL (Ando *et al.*, 2003), sans toutefois démontrer un effet direct des Angptl 3/4 dans la dyslipidémie. Quelques années plus tard, il a été rapporté qu'une injection de l'anticorps spécifique contre l'Angptl3 diminue le niveau de triglycérides et améliore l'état pathologique des souris dyslipidémiques (ApoE<sup>-/-</sup>) (Desai *et al.*, 2007). Un traitement de 8 semaines de ces souris dyslipidémiques (ApoE<sup>-/-</sup>) avec un composé dérivé du xanthone, un antioxydant connu pour diminuer le niveau circulant de l'Angptl3, améliore significativement le profil lipidique en baissant le niveau des LDL et de triglycérides dans le plasma et en augmentant le niveau de HDL (Xiao *et al.*, 2008). Cette amélioration est reliée à une diminution de l'expression de l'Angptl3, et à une augmentation de l'expression de la LPL (Xiao *et al.*, 2008). L'Angptl3 pourrait donc être un médiateur de la régulation de la lipidémie, comme c'est le cas de l'Angptl4, et de ce fait pourrait jouer un rôle dans la dyslipidémie (Hato *et al.*, 2008).

Chez l'humain et dans une étude récente, l'équipe du Dr Pisciotta rapporte que des mutations récessives sur l'allèle du gène codant pour l'Angptl3, causant la perte totale de la fonction de cette protéine, sont associées à une décélération de l'efflux du cholestérol et à une hypolipidémie chez ces sujets avec une réduction du niveau plasmatique des lipoprotéines LDL, HDL et des triglycérides (Pisciotta *et al.*, 2012). En se basant sur ces données, on peut conclure que l'Angptl3 contrôle potentiellement la dyslipidémie par un mécanisme qui empêche la clairance des triglycérides et augmente le niveau des LDL dans le sang *via* l'inhibition de la LPL.

De façon similaire à l'Angptl3, une mutation génétique de perte de fonction (mutation E40K) dans le gène de l'Angptl4 chez l'Homme est associée à une diminution du taux de triglycérides et à une augmentation de la concentration en HDL-cholestérol (Romeo *et al.*, 2007; Romeo *et al.*, 2009). Ce profil lipidique diminue le risque de développer des maladies cardiovasculaires coronariennes telles que l'athérosclérose (Folsom *et al.*, 2008). L'impact de la mutation dans le gène codant pour l'Angptl4 sur le niveau circulant de triglycérides a été confirmé par plusieurs autres études (Nettleton *et al.*,

2009; Talmud *et al.*, 2008). Un autre variant génétique (mutation T266M) a aussi été identifié comme étant associé à un faible niveau de triglycérides (Staiger *et al.*, 2008). Cependant, dans ces études d'association génétique, il n'est pas clair si les sujets porteurs de la mutation E40K ont été exclus de l'analyse (Staiger *et al.*, 2008). De manière intéressante, la mutation T266M résulte en une augmentation de l'Angptl4 plasmatique ; comment la mutation génétique affecte-t-elle le niveau de triglycérides alors que le niveau plasmatique d'Angptl4 n'a pas d'influence directe sur les triglycérides? (Mattijssen *et al.*, 2012). Jusqu'à présent, il n'y a pas de réponse à cette question.

L'ensemble des données de la littérature concernant les effets des différentes Angptls suggèrent que certains membres de cette famille, comme l'Angptl3/4 et potentiellement l'Angptl6, sont impliqués dans l'altération des bilans lipidiques et participent activement au développement de la dyslipidémie. De ce fait, ces protéines peuvent être considérées comme des candidats ou des cibles pour le traitement des maladies cardiovasculaires associées à la dyslipidémie (Kadomatsu *et al.*, 2011).

### 1.3.3.2. Le diabète et l'obésité

Outre leur rôle dans le métabolisme des lipides, certaines Angptls sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie du glucose et pourraient donc contribuer aux processus du diabète et /ou de l'obésité.

L'Angptl4, aussi considérée comme une adipokine (Xu *et al.*, 2005), est une des Angptls potentiellement impliquées dans l'homéostasie du glucose (section 1.3.2.3.). Toutefois, un effet direct de l'Angptl4 dans la régulation du diabète et/ou de l'obésité n'a pas encore été établi. Les souris *ob/ob* et *db/db* (obèses et diabétiques) ont un taux élevé d'Angptl4 plasmatique (Ge *et al.*, 2004b). En 2005, Xu et al. montrent que l'injection d'adénovirus surexprimant l'Angptl4 chez les souris *db/db* entraîne une diminution de la glycémie et une augmentation de la tolérance au glucose (Xu *et al.*, 2005). Par contre, l'étude de délétion du gène spécifique à l'Angptl4 (souris *Angptl4<sup>-/-</sup>*) ne démontre aucune influence de l'Angptl4 sur le niveau du glucose chez les souris soumises à une diète régulière (Koster *et al.*, 2005), suggérant une intervention de l'Angptl4

préférentiellement dans le cas où les niveaux circulants en glucose sanguin dépassent les taux physiologiques.

Les résultats de la littérature concernant les effets de l'Angptl4 sur le métabolisme du glucose ne sont pas tous constants. En effet, Mandard et ses collaborateurs ont démontré que la surexpression générale de l'Angptl4 chez la souris entraîne une augmentation de la glycémie et que, de plus, combinée à une régime alimentaire riche en graisse, la surexpression d'Angptl4 amplifie les effets délétères de ce régime sur la tolérance au glucose (Mandard *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2012). Les auteurs rapportent une résistance à l'insuline au niveau périphérique mais une amélioration au niveau hépatique (Mandard *et al.*, 2006). Finalement, il a été rapporté que le niveau circulant d'Angptl4 dans le plasma de patients diabétiques et obèses est significativement plus faible en comparaison avec les patients obèses mais non-diabétiques (Xu *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que l'Angptl4 est un joueur actif dans la régulation de la glycémie, la sensibilité à l'insuline et l'obésité, mais ils restent à confirmer.

En ce qui concerne l'Angptl3, son implication dans le diabète et l'obésité n'est pas encore bien décrite. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'Angptl3 et l'index de masse corporelle, l'âge, l'insuline et le taux de glucose à jeun (Miida *et al.*, 2010). Chez la souris diabétique, l'Angptl3 augmente de 2,5 fois dans le foie, une réponse qui pourrait être renversée suite à l'administration d'insuline (Inukai *et al.*, 2004). Cet effet de l'Angptl3 est amplifié de trois fois si l'obésité est accompagnée par un diabète de type 2 (souris *db/db*), suggérant un rôle de l'Angptl3 dans le diabète, mais le mécanisme impliqué n'est pas encore clarifié (figure 6).

L'Angptl6 semble avoir des propriétés bénéfiques puisqu'elle permet de contrecarrer l'obésité et d'améliorer la sensibilité à l'insuline (facteur anti-diabétique) (Kadomatsu *et al.*, 2011; Oike *et al.*, 2009b). Ces fonctions ont été mises en évidence pour la première fois en utilisant des modèles de souris transgéniques KO (souris *Angptl6<sup>-/-</sup>*) ou qui surexpriment l'Angptl6. En effet, les souris *Angptl6<sup>-/-</sup>* présentent une obésité significativement accrue comparativement aux souris sauvages, une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose (Oike *et al.*, 2005b). Au contraire, les souris qui surexpriment l'Angptl6 ont une meilleure sensibilité à l'insuline et elles sont relativement plus minces (Kadomatsu *et al.*, 2011; Oike *et al.*, 2005b). De même, la surexpression d'Angptl6 dans

des tissus spécifiques (par exemple les kératinocytes ou dans les hépatocytes), provoque une élévation de son niveau circulant qui semble être suffisant pour exercer ses effets endocrines aboutissant à des phénotypes semblables à ceux observés chez les souris transgéniques surexprimant l'Angptl6 (Kadomatsu *et al.*, 2011). Enfin, chez une souris normale soumise à une diète hyperlipidique, la surexpression d'Angptl6 semble être protectrice contre le surpoids, l'obésité et la résistance à l'insuline induits par cette alimentation (Kadomatsu *et al.*, 2011; Oike *et al.*, 2005a). Ces travaux suggèrent que l'Angptl6 agit comme un facteur antidiabétique, prévenant l'obésité et favorisant une meilleure sensibilité à l'insuline chez la souris.

Chez l'humain, la seule étude publiée par le Dr Ebert présente des résultats inattendus et surprenants : les sujets obèses ou diabétiques possèdent des niveaux circulants plus élevés d'Angptl6 comparativement à ceux de sujets non-diabétiques (Ebert *et al.*, 2009). Ces données, contraires à celles observées chez la souris, ont été interprétées par le Dr Kadomatsu qui propose que le niveau circulant d'Angptl6 n'est pas un facteur unique et suffisant pour renverser l'obésité (Kadomatsu *et al.*, 2011). D'autres études sont nécessaires pour pouvoir expliquer et comprendre les mécanismes impliqués dans le contrôle de ces effets.

### 1.3.3.3. L'athérosclérose

À la lumière des résultats présentés ci-haut, il est clair que les Angptls régulent le métabolisme énergétique, ont un impact direct sur la dyslipidémie, le diabète et l'obésité et ont un contrôle direct sur le processus d'angiogenèse (effets anti- ou pro-angiogéniques). Bien que ces propriétés des Angptls suggèrent leur contribution dans le processus d'athérosclérose, les données de la littérature concernant les fonctions pro-athérogéniques des Angptls sont très limitées.

Chez la souris ApoE<sup>-/-</sup>, une réduction du niveau d'Angptl3 suite à une mutation récessive de son gène codant, protège contre le développement de l'athérosclérose (Ando *et al.*, 2003). Cette étude a été confirmée chez l'Homme, sans toutefois clarifier le mécanisme précis du rôle joué par l'Angptl3 dans le processus d'athérosclérose (Korstanje *et al.*, 2004). Une analyse par cartographie des loci à effet

quantitatif a permis d'identifier chez la souris quelques gènes candidats sur le chromosome 4 dont l'Angptl3 (Korstanje *et al.*, 2004). Un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP, *single-nucleotide polymorphism*) dans ces gènes est significativement relié avec la susceptibilité de développer l'athérosclérose chez l'Homme (Korstanje *et al.*, 2004). Deux SNP ont été identifiés au niveau du promoteur du gène de l'Angptl3; une association positive a été mise en évidence entre le génotype observé et la taille de la lésion athéromateuse (Korstanje *et al.*, 2004; Miida *et al.*, 2010). Quelques années plus tard, une autre étude basée sur le suivi de volontaires sains (381 personnes) dévoile le lien entre le niveau de facteurs de risque, incluant l'Angptl3 circulant plasmatique, l'âge, la pression sanguine, le glucose plasmatique et les niveaux lipidiques et l'épaississement des parois des artères carotides et fémorales (Hatsuda *et al.*, 2007). Il existe une association positive entre l'Angptl3 plasmatique et l'hypertrophie vasculaire (le remodelage athérogénique), et ce indépendamment des niveaux de triglycérides et de cholestérol totaux (Hatsuda *et al.*, 2007). L'ensemble de ces travaux suggère que l'Angptl3 contribue à l'athérosclérose chez l'humain.

Le niveau plasmatique de l'Angptl4 est similaire chez des patients hypercholestérolémiques ou souffrant de syndromes métaboliques (Stejskal *et al.*, 2008). Les études d'association sur les variants génétiques du gène de l'Angptl4 et les maladies cardiovasculaires ne reflètent pas nécessairement une susceptibilité accrue de développement de l'athérosclérose chez les porteurs de polymorphismes nucléotidiques (Miida *et al.*, 2010). Les études publiées suggèrent que ces sujets sont moins à risque de développer les maladies cardiovasculaires (Folsom *et al.*, 2008), plus à risque (Talmud *et al.*, 2008) ou sans lien avec les maladies coronaires (Smart-Halajko *et al.*, 2010). Une délétion génétique du gène de l'Angptl4 chez la souris athérosclérotique ApoE<sup>-/-</sup> (Angptl4<sup>-/-</sup>/ApoE<sup>-/-</sup>) protège contre le développement et l'expansion de la plaque athéromateuse (réduction de 75 % de la taille de plaque comparativement aux souris ApoE<sup>-/-</sup>) (Adachi *et al.*, 2009). L'absence d'Angptl4 (Angptl4<sup>-/-</sup>) est suffisante pour supprimer l'habilité des macrophages à se transformer en cellules spumeuses (Adachi *et al.*, 2009). De plus, les auteurs de cette étude démontrent que les macrophages isolés des souris Angptl4<sup>-/-</sup> possèdent une faible capacité de synthèse des esters de cholestérol, suggérant un rôle pro-athérogénique de l'Angptl4.

Il faut cependant être très prudent dans l'interprétation des données : les effets observés avec les Angptl3/4 sur le développement de l'athérosclérose sont-ils directs ? dus à leur rôle dans le métabolisme des lipoprotéines (section 1.3.2.2) et/ou leur rôle dans l'angiogenèse (section 1.3.2.1)? Ou *via* d'autres fonctions ?

Puisque des niveaux élevés de triglycérides et de cholestérol sont associés à l'athérosclérose et que les Angptl3 et 4 régulent directement les niveaux circulants de ces composés, l'explication la plus acceptable serait que l'implication des Angptl3 et 4 dans le développement de l'athérosclérose est liée à leurs effets sur le métabolisme des lipoprotéines (Olivecrona *et al.*, 2010). Cependant, aucune preuve directe n'a encore été mise en évidence.

Pris dans leur ensemble, ces données suggèrent que l'Angptl3 et 4 pourraient être les cibles de médicaments hypo-lipidémiant. Une inhibition des Angptl3/4 pourrait empêcher l'accumulation des lipoprotéines athérogéniques en augmentant leur catabolisme et la clairance des triglycérides, et protéger contre le développement de l'athérosclérose.

## **1.4. L'angiopoïétine-like 2 (Angptl2)**

Outre son rôle pro-angiogénique (Kim *et al.*, 1999b; Tabata *et al.*, 2009), l'Angptl2 est un médiateur clé de l'inflammation chronique (Aoi *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012; Ogata *et al.*, 2012; Okada *et al.*, 2010; Tabata *et al.*, 2009; Tazume *et al.*, 2012). Sa fonction pro-inflammatoire explique sa participation dans les maladies cardiovasculaires (Kadomatsu *et al.*, 2011; Kubota *et al.*, 2005b; Oike *et al.*, 2005b; Oike *et al.*, 2009b), le cancer (Aoi *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012; Kikuchi *et al.*, 2008), l'arthrite rhumatoïde (Okada *et al.*, 2010) et la dermatomyosite (Ogata *et al.*, 2012). L'implication potentielle de l'Angptl2 dans le processus d'athérogenèse est encore peu étudiée. Dans ce chapitre, nous aborderons les différents aspects connus sur l'Angptl2, le sujet central de nos études.

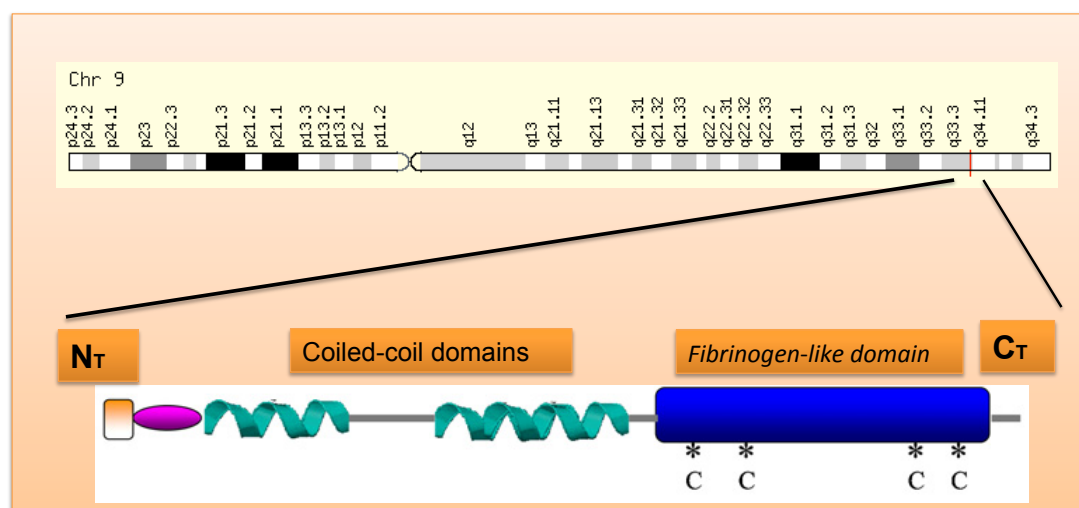
### 1.4.1. Structure primaire et profil d'expression de l'Angptl2

La structure primaire de l'Angptl2 (493 a. a.) (Figure 5) (Kim *et al.*, 1999b) ainsi qu'une proposition de sa structure secondaire (Figure 7) montrent les deux domaines typiques de cette famille de protéines: en N terminal se trouve un domaine hélice-alpha (*coiled-coil*) (entre les a.a. 1 et 310) et dans la région C terminale se trouve un domaine d'homologie au fibrinogène (entre les a.a. 311 et 493). La nature hautement hydrophobe de la région en N terminal représente une structure typique pour un peptide signal, ce qui a permis d'identifier un site de clivage situé entre les a.a. 21 et 22, signifiant que l'Angptl2 est une protéine sécrétée (Kim *et al.*, 1999b) que l'on peut doser dans la circulation sanguine (Tabata *et al.*, 2009). Comme c'est le cas pour les angiopoïétines et les autres Angptls, il a été proposé que le domaine hélice-alpha de l'Angptl2 forme des structures circulaires favorisant des dimères et/ou des oligomères de taille variable (Broxmeyer *et al.*, 2012). Quant au domaine d'homologie au fibrinogène de la région C terminale, il pourrait potentiellement être impliqué dans la fixation de l'Angptl2 à son récepteur (Kubota *et al.*, 2005b; Oike *et al.*, 2004b).

La glycosylation est une modification post-traductionnelle qui prend place à la surface de la membrane du réticulum endoplasmique dans la cellule. Il s'agit d'une modification indispensable pour toutes les protéines sécrétées (Weerapana *et al.*, 2006). Or, *in vitro*, la transfection de cellules humaines avec les cDNA codant les différents isoformes des Angptls permet de détecter ces protéines dans le milieu de culture cellulaire (Ito *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1999b; Oike *et al.*, 2004a). De même, les isoformes 2, 3, 4, 6 et 7 sont présents dans la circulation sanguine (Kim *et al.*, 2000; Oike *et al.*, 2005a; Shimizugawa *et al.*, 2002; Tabata *et al.*, 2009), suggérant que ces protéines sont potentiellement glycosylées. Différentes équipes ont étudié la glycolysation de l'Angptl2 (Kim *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 2006a), l'Angptl3 (Conklin *et al.*, 1999; Schjoldager *et al.*, 2010), l'Angptl4 (Ge *et al.*, 2004a; Kim *et al.*, 2000) et l'Angptl7 (Kuchtey *et al.*, 2008). En ce qui concerne l'Angptl2, Kim et ses collaborateurs ont été les premiers à démontrer que cette protéine est glycosylée (Kim *et al.*, 1999b). En effet, l'analyse de la protéine sécrétée dans le milieu de culture de cellules transfectées avec le cDNA de l'Angptl2, indique qu'elle possède un poids moléculaire apparent de 64 kDa, plus élevé que celui

déduit de la séquence primaire de 57 kDa; une incubation adéquate avec la glycosylase résulte en une seule bande correspondante à la taille théorique de la protéine (Kim *et al.*, 1999b). De plus, la synthèse de l'Angptl2 chez la bactérie, un organisme dépourvu de la machinerie responsable de la maturation post-transcriptionnelle des protéines chez les mammifères, produit à une protéine de 57 kDa, non glycosylée (Zhang *et al.*, 2006a). Cependant, l'impact de cette glycosylation sur l'activité et la stabilité de l'Angptl2 n'est pas encore connu.

Il existe une forte similitude de structure primaire entre les espèces, ainsi l'Angptl2 de la souris est homologue à 95% à celle de l'humain (Kim *et al.*, 1999b). En revanche, dans une même espèce le profil d'expression spatial de l'Angptl2 varie remarquablement entre les différents organes. L'Angptl2 semble être exprimée majoritairement dans le tissu adipeux, mais elle est aussi présente dans le cœur, le foie, l'estomac, les muscles squelettiques et en quantité moindre dans le foie, la rate et le cerveau (Kim *et al.*, 1999b; Kitazawa *et al.*, 2011; Tabata *et al.*, 2009). Dans un même organe, l'expression de l'Angptl2 est cellule spécifique : nous (Farhat *et al.*, 2013), et d'autres (Kim *et al.*, 1999a), avons démontré qu'au niveau du système vasculaire, l'Angptl2 est exprimée par les CE mais pas par les CML. Ces résultats suggèrent que l'expression de l'Angptl2 obéit à un très haut niveau de contrôle et questionnent la spécificité du récepteur responsable des fonctions de l'Angptl2 .



**Figure 7** Structure secondaire de l'Angptl2 représentant le côté N terminal (N<sub>T</sub>).



Le domaine hydrophobe (peptide signal, en rose), le domaine coiled-coil (en vert), le domaine d'homologie au fibrinogène (en bleu) en C terminal (C<sub>T</sub>). Cette protéine est dérivée d'un gène localisé sur le chromosome 9.

Réimprimé de [Biochem Biophys Res Commun](#),141/3, Mohanrai Dhanabal, Michael Jeffers, William J. LaRochelle, Henri S. Lichenstein, Angioarrestin: A unique angiopoietin-related protein with anti-angiogenic properties. 308-315, Copyright (2005), avec la permission de Elsevier.

#### 1.4.2. Que connaît-on des récepteurs potentiels de l'Angptl2 ?

Des recherches ont été menées afin d'identifier le récepteur commun aux différents membres des Angptls (Tabata *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2012b). Il a été proposé que l'Angptl3 et 4 sont capables d'interagir avec les intégrines de la matrice extracellulaire : les sites de liaisons se trouvent dans le domaine *coiled-coil* pour l'Angptl4 (Chomel *et al.*, 2009) et dans le domaine d'homologie au fibrinogène dans le cas de l'Angptl3 (Camenisch *et al.*, 2002).

Récemment, il a été proposé que l'Angptl2 soit un ligand de différentes intégrines via son domaine d'homologie au fibrinogène (Tabata *et al.*, 2009). Dans leur étude, le Dr Tabata *et al.* proposent que les intégrines et plus spécifiquement l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , confèrent à l'Angptl2 sa capacité de déclencher la cascade d'inflammation au niveau des CE vasculaires (Tabata *et al.*, 2009). Finalement, les auteurs proposent que les intégrines (type  $\alpha 4\beta 2$ ) soient les récepteurs responsables de l'activité chimio-attractante attribuée à l'Angptl2 au niveau des monocytes/macrophages (Tabata *et al.*, 2009). De part son domaine d'homologie au fibrinogène, il a aussi été proposé que l'Angptl2 soit un ligand des récepteurs *Toll-like* (TLR, *Toll-like receptor*) puisque le fibrinogène est un ligand endogène et que ces récepteurs sont impliqués dans les maladies inflammatoires chroniques (Kadomatsu *et al.*, 2011; Tabata *et al.*, 2009). Cette hypothèse reste à être validée.

De façon fort intéressante, l'équipe du Dr Zheng découvre en 2012 un nouveau récepteur pour les Angptls, un récepteur inhibiteur des fonctions effectrices des cellules du système immunitaire, le récepteur d'homologie à l'immunoglobuline de type B2

(LILRB2, *leukocyte immunoglobulin-like receptor B2*) humain et son prototype chez la souris, le PIRB (*paired immunoglobulin-like receptor*) (Zheng *et al.*, 2012b). L'analyse par cytométrie de flux (FACS) montre que les Angptls et en particulier l'Angptl2 et 5 sont capables de se lier aux cellules HEK 293 transfectées avec le cDNA du récepteur LILRB2. Ces résultats ont été confirmés par co-immunoprécipitation *in vitro*, par l'utilisation d'ARN interférent (SiRNA) et dans un modèle de souris KO pour PIRB (Zheng *et al.*, 2012b). Les cellules immunitaires expriment deux types de récepteurs à leur surface: activateurs (tels que les *Toll-like* récepteurs) ou inhibiteurs (tels que les LILRB2). Ainsi, l'intégration de multiples signaux activateurs et inhibiteurs dicte l'activité cytotoxique des cellules immunitaires (Colonna *et al.*, 1999). Zheng et ses collaborateurs proposent un rôle des Angptls dans le développement des leucémies aiguës myéloïdes suite à leurs interactions avec les récepteurs LILRB2 (ou le PIRB), ce qui supprime la différenciation et l'activation des cellules immunitaires, tout en assurant l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Zheng *et al.*, 2012b).

Ces données rejettent-elles l'hypothèse proposée par le Dr Tabata selon laquelle le récepteur activateur des cellules immunitaires, le *Toll like* récepteur, est un des récepteurs potentiels pour l'Angptl2 ? Des études supplémentaires sont nécessaires afin de répondre à ces questions.

### **1.4.3. Les différentes fonctions identifiées de l'Angptl2**

En se basant sur les études qui prouvent que l'Angptl2 est une protéine plasmatique qui peut agir de façon paracrine; son patron d'expression est quasi-ubiquitaire dans les différents organes; en situation physiologique, l'Angptl2 est un facteur de survie pour les CSH, alors qu'en conditions pathologiques inflammatoires l'Angptl2 est exprimée spécifiquement dans les organes affectés (voir les sections 1.4.3.2- 1.4.3.6.), on peut émettre l'hypothèse que l'Angptl2 possède des fonctions clés dans le maintien de l'état physiologique et qu'une variation chronique de son niveau d'expression est à la base du développement de diverses maladies.

### 1.4.3.1. L'Angptl2 est impliquée dans l'angiogenèse

La majorité des protéines membres de la famille des angiopoïétines est associée à l'angiogenèse vasculaire (Hato *et al.*, 2008; Oike *et al.*, 2004b) (Tableau II). L'Angptl2, induit la germination des CE *in vitro* de façon autocrine (Kim *et al.*, 1999a). Cette fonction a été décrite pour la première fois dans une étude génétique coréenne (Kim *et al.*, 1999b) suggérant un rôle de l'Angptl2 lors de l'angiogenèse vasculaire. Quelques années plus tard, le profil des micro-vaisseaux chez le poisson zèbre a permis de confirmer les propriétés pro-angiogéniques de l'Angptl2 *in vivo* (Kubota *et al.*, 2005a). Dans ce modèle expérimental, une baisse de l'expression de l'Angptl2 favorise des malformations cardiaques et des anomalies vasculaires primitives, qui semblent être dues à l'apoptose des CE (Kubota *et al.*, 2005a). Ces observations permettent de définir l'Angptl2 comme un facteur de survie pour les vaisseaux sanguins nouvellement formés (Oike *et al.*, 2009b). Dans les CSH en culture, la présence d'Angptl2 augmente de 8 à 10 fois l'expansion des cellules souches (Broxmeyer *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2006a). Il a été récemment proposé que le domaine *coiled-coil* de l'Angptl2 est responsable non seulement de stimuler la réplication cellulaire, mais aussi d'allonger la survie des CSH (Broxmeyer *et al.*, 2012). Par ailleurs, le domaine fibrinogène de l'Angptl2 semble aussi jouer un rôle dans l'angiogenèse *via* une activité chimioattractante dont l'interaction avec les intégrines de surface serait essentielle pour cette fonction (Tabata *et al.*, 2009). En somme, toutes ces études démontrent que l'Angptl2 est impliquée dans la formation et la maturation des vaisseaux, ce qui suggère que l'endothélium vasculaire (mais aussi les macrophages/monocytes et les CSH) est un des tissus qui exprime le récepteur à l'Angptl2. La relation existante entre l'activité angiogénique de l'Angptl2 et son implication lors du développement des maladies inflammatoires chroniques, n'est pas encore claire.

#### **1.4.3.2. L'Angptl2 est impliquée dans les maladies inflammatoires chroniques : le cancer**

L'inflammation chronique joue un rôle critique dans le développement des différents stades du cancer, d'où l'intérêt d'étudier la fonction pro-inflammatoire de l'Angptl2 dans la cancérogenèse. En 2008, un premier article, contre toute attente, propose qu'une perte de l'expression de l'Angptl2 est la cause du développement du cancer de l'ovaire (Kikuchi *et al.*, 2008). Deux approches ont été utilisées pour rendre silencieux le gène codant pour l'Angptl2 : une mutation homozygote dans le génome et la présence d'un mécanisme de régulation épigénétique par méthylation du promoteur du gène Angptl2. De façon inattendue, les auteurs ont noté que l'Angptl2 possède une fonction anti-proliférative sur les cellules cancéreuses et qu'une altération de son expression semble être néfaste pour la cellule, ce qui a conduit les auteurs à la considérer comme une protéine suppressive de tumeurs (Kikuchi *et al.*, 2008). Ces données qui ont été obtenues sur une lignée de cellules, nécessitent cependant des perspectives à plus grande échelle.

Une étude de l'équipe du Dr Oike, utilisant un modèle murin de cancer de la peau induit chimiquement, conclut au contraire que l'Angptl2 contribue à la carcinogénèse et au développement des métastases du mélanome cutané (Aoi *et al.*, 2011). Les effets pro-inflammatoires et pro-oxydants de l'Angptl2 créeraient un environnement susceptible de causer des dommages majeurs à l'ADN (Aoi *et al.*, 2011). De plus, la fonction pro-angiogénique et la formation de nouveaux vaisseaux sanguins sont indispensables au développement des tumeurs, ce qui augmente à priori le risque de métastases (Aoi *et al.*, 2011). Les résultats de cette étude laissent penser que l'Angptl2 joue un rôle pro-inflammatoire, angiogénique et oncogène, conduisant à l'accélération du stade métastatique du cancer de la peau.

Dans une étude plus complète, l'équipe du Dr Oike a récemment caractérisé l'impact de l'Angptl2 dans la progression des métastases du cancer du poumon chez l'Homme (Endo *et al.*, 2012) : la concentration d'Angptl2 dans le site de tumeurs primaires est plus élevée que dans le tissu non-tumoral ; la plus forte concentration d'Angptl2 se trouve dans les métastases. De plus, l'expression tumorale d'Angptl2 est négativement

reliée avec la durée de survie attendue (pronostic du cancer). Chez la souris, l'injection de cellules tumorales exprimant l'Angptl2 de façon constitutive produit, comme attendu, une forte augmentation des métastases et une angiogenèse plus développée, des phénomènes détectés de manière moins importante dans le cas de tumeurs dotées du vecteur vide (Endo *et al.*, 2012). La sévérité du cancer associée à l'Angptl2 se traduit par une courte période de survie. L'utilisation de SiRNA pour rendre silencieux le gène de l'Angptl2 normalise ces réponses néfastes (Endo *et al.*, 2012). Ainsi, l'Angptl2 dérivée de cellules tumorales est indispensable pour favoriser la formation de tumeurs et est nécessaire pour faire progresser la maladie vers un état métastatique (Endo *et al.*, 2012). Le mécanisme moléculaire derrière la transcription du gène de l'Angptl2 semble faire intervenir les facteurs de transcription NFATc (facteur nucléaire des cellules T activées, *nuclear factor of activated T-cells*) et ATF2 (facteur de transcription activateur, *activating transcription factor 2*), de façon dépendante de la voie d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). En effet, le promoteur du gène de l'Angptl2 contient trois sites de liaison aux facteurs de transcription : ATF/CREB (facteur de transcription activateur/élément de réponse liant l'AMPc, *activating transcription factor/cAMP response element binding*), NF- $\kappa$ B et NFATc. Toutefois, la participation de la sous-unité c-Jun, mais pas Fox, du facteur de transcriptionnel AP-1 est indispensable pour former un complexe avec NFATc ou avec ATF2, augmentant ainsi leur efficacité de liaison au site ATF/CREB du promoteur du gène de l'Angptl2 (Endo *et al.*, 2012). Ensemble, ces travaux indiquent que dans un environnement tumoral où les conditions sont hypoxiques et où le stress du réticulum endoplasmique est exacerbé, les facteurs de transcription importants pour la survie des cellules cancéreuses sont activés afin d'induire la transcription du gène de l'Angptl2, résultant ainsi dans la progression de la maladie vers le stade des métastases.

### **1.4.3.3. L'Angptl2 est impliquée dans les maladies inflammatoires chroniques : la dermatomyosite**

L'implication de l'Angptl2 dans la pathogenèse de la dermatomyosite inflammatoire chronique est peu connue, une seule étude a été publiée sur ce sujet par l'équipe du Dr Oike (Ogata *et al.*, 2012). La dermatomyosite est une atteinte auto-immune causant l'inflammation des muscles squelettiques et des systèmes de vascularisation, ce qui augmente le risque de développer des maladies cardiovasculaires (Mahil *et al.*, 2012).

La dermatomyosite chez les patients est caractérisée par une concentration élevée d'Angptl2 dans le plasma, le muscle squelettique et les kératinocytes (Ogata *et al.*, 2012). Chez la souris, plusieurs changements ont été détectés suite à la surexpression de l'Angptl2 dans les kératinocytes: des paupières rouges et gonflées, une irritation de la peau, une liquéfaction de la couche basale de l'épiderme et une inflammation au niveau de la peau caractérisée par une infiltration leucocytaire accrue et une expression excessive des cytokines (Ogata *et al.*, 2012). Ces données indiquent que l'Angptl2 déclenche une inflammation systémique chronique et provoque des changements phénotypiques identiques à ceux occasionnés par la dermatomyosite. Dans cette même étude, les auteurs proposent un mécanisme moléculaire sous-jacent aux effets inflammatoires de l'Angptl2 par l'intermédiaire de la voie des intégrines et du NF- $\kappa$ B qui contrôle l'expression des cytokines inflammatoires telles que IL-1 $\beta$  et IL-6. Il semble toutefois que la régulation de cette maladie soit plus complexe pour que seule l'expression de l'Angptl2 soit suffisante. En effet, chez des souris surexprimant l'Angptl2, malgré les changements observés suite à l'augmentation d'Angptl2 dans la peau et le sérum, aucune manifestation pathologique n'a été remarquée dans le muscle squelettique des souris (Ogata *et al.*, 2012). Les études cliniques effectuées sur des cohortes montrent que les patients souffrant de dermatomyosite ont plus de risque de développer un cancer et des maladies cardiaques (Ogata *et al.*, 2012). L'action pro-inflammatoire chronique de l'Angptl2 pourrait, vraisemblablement, faire le lien entre la sévérité de la dermatomyosite et le risque de développement d'un cancer ou de maladies cardiovasculaires.

#### **1.4.3.4. L'Angptl2 est impliquée dans les maladies inflammatoires chroniques : l'arthrite rhumatoïde**

L'arthrite rhumatoïde est une maladie inflammatoire résultante de la dégradation du cartilage, normalement alimenté en liquide synovial provenant des synoviocytes (Davis *et al.*, 2012). Le cartilage qui est physiologiquement un tissu acellulaire devient fortement vascularisé dans une étape avancée d'arthrite rhumatoïde, ce qui résulte en un dépôt important de cellules inflammatoires telles que les macrophages et les fibroblastes ressemblants aux synoviocytes (*fibroblast-like synoviocytes*) (Davis *et al.*, 2012). Dans cette situation pathologique, le liquide synovial, mais pas le sérum, d'un individu souffrant d'arthrite rhumatoïde contient plus d'Angptl2 qu'un individu avec ostéoarthrite où le niveau d'inflammation est inférieur (Okada *et al.*, 2010), suggérant un rôle de l'Angptl2 dans l'inflammation locale au niveau de l'articulation. Les analyses effectuées au niveau cellulaire montrent que les macrophages et les fibroblastes homologues aux synoviocytes résidents dans les régions inflammées sont la source majeure de la synthèse d'Angptl2 dans l'arthrite rhumatoïde (Okada *et al.*, 2010). Une fois sécrétée, l'Angptl2 exerce un effet chimio-attracteur non seulement sur les monocytes/neutrophiles afin d'amplifier la réponse inflammatoire mais aussi sur les CE en déclenchant le phénomène d'angiogenèse (Okada *et al.*, 2010). Ceci suggère un rôle non négligeable de l'Angptl2 dans l'arthrite rhumatoïde.

#### **1.4.3.5. L'Angptl2 est impliquée dans les maladies inflammatoires chroniques : le diabète relié à l'obésité**

La majorité des études effectuées sur l'Angptl2 s'est limitée au niveau moléculaire ou cellulaire, sans toutefois clairement identifier des fonctions physiologiques ou pathologiques. En 2009, le groupe du Dr Oike au Japon, le leader dans le domaine de l'Angptl2, a publié une étude remarquable et fort intéressante reliant pour la première fois l'Angptl2 à l'obésité et aux syndromes métaboliques qui y sont associés, notamment la résistance à l'insuline et l'inflammation chronique du tissu adipeux, chez l'Homme et chez la souris (Tabata *et al.*, 2009).

Tout d'abord, les auteurs ont montré que chez des volontaires sains de 20 à 59 ans, il existe une corrélation positive entre la concentration plasmatique d'Angptl2 et l'indice de masse corporelle, l'insuline dans le sérum et le niveau de CRP (Tabata *et al.*, 2009). De façon fort intéressante, l'Angptl2 plasmatique chez les patients diabétiques (testée chez 89 sujets) et coronariens (109 sujets) est significativement augmentée (Tabata *et al.*, 2009). De plus, chez les patients diabétiques, l'Angptl2 est reliée à la graisse abdominale, la résistance à l'insuline, la concentration sanguine en CRP et est inversement reliée à l'indice de la sensibilité à l'insuline (Tabata *et al.*, 2009). Chez les patients diabétiques de type 2 et obèses, un traitement de 3 mois au pioglitazone, un antidiabétique agoniste du récepteur PPAR $\gamma$  qui baisse le gras abdominal et supprime l'inflammation, résulte en une réduction du niveau d'Angptl2 circulant, et cette baisse est proportionnelle à la diminution de la surface occupée par la graisse viscérale, à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline et à la baisse de CRP (Tabata *et al.*, 2009). Ces données cliniques suggèrent que l'Angptl2 est associée à l'expansion du tissu adipeux, à la résistance à l'insuline et à l'inflammation :

a) L'Angptl2 est reliée à l'augmentation de la masse adipeuse

L'obésité engendre un état aggravé d'hypoxie et du stress du réticulum endoplasmique (RE) à l'intérieur de la masse grasseuse (Cnop *et al.*, 2012). Dans des adipocytes (3T3-L1) cultivés en présence des inducteurs du stress du RE (palmitate ou thapsigargin par exemple), la quantité protéique d'Angptl2 est accrue et est spécifiquement augmentée durant la différenciation des pre-adipocytes en adipocytes, ce qui suggère une régulation à la hausse de l'Angptl2 dérivée du gras viscéral dans l'obésité (Tabata *et al.*, 2009).

Chez l'animal et dans le contexte de l'obésité, la concentration circulante de l'Angptl2, ainsi que sa présence dans le tissu adipeux sont significativement augmentées lorsque la souris obèse est soumise à une diète riche en gras (Tabata *et al.*, 2009). Lorsque l'Angptl2 est réprimée (souris Angptl2<sup>-/-</sup>), une baisse de la masse totale de gras et une diminution du poids corporel ont été observées (Tabata *et al.*, 2009). Ces résultats ont également été retrouvés lorsque les souris Angptl2<sup>-/-</sup> suivent une diète riche en gras pendant deux mois, sans variation de l'apport alimentaire ou de la dépense énergétique comparativement aux souris normales exposées à la même diète alimentaire. Une accumulation excessive du gras est marquée dans le foie et le muscle squelettique des



souris de type sauvage, alors que les souris *Angptl2*<sup>-/-</sup> sont protégées (Tabata *et al.*, 2009). Ces observations suggèrent que l'Angptl2 dérivée des adipocytes est un médiateur clé de l'inflammation chronique du tissu adipeux reliée à l'obésité, et qu'un changement de son niveau circulant pourrait être un marqueur de l'obésité (Tabata *et al.*, 2009).

b) L'Angptl2 est reliée à la résistance à l'insuline

Les tissus adipeux sécrètent plusieurs médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans la résistance à l'insuline (Cnop *et al.*, 2012). L'Angptl2 qui est majoritairement sécrétée par le tissu adipeux, exerce-elle un effet pro-diabétique en influençant la résistance à l'insuline ?

Le Dr Oike a mis en évidence un rôle critique de l'Angptl2 dans la sensibilité systémique à l'insuline chez les souris obèses (Tabata *et al.*, 2009). En effet, la délétion d'Angptl2 (souris *Angptl2*<sup>-/-</sup>) améliore la résistance à l'insuline et augmente la tolérance au glucose chez les souris qui ont une alimentation riche en gras. De plus, un traitement d'adipocytes 3T3-L1 en culture avec un agoniste PPAR $\gamma$  produit un effet répressur sur l'Angptl2, mimant ainsi l'effet de la pioglitazone observé chez l'humain. Une suppression de la synthèse d'Angptl2 par les tissus adipeux pourrait donc avoir un effet antidiabétique (Tabata *et al.*, 2009). Il faut néanmoins mentionner que l'amélioration détectée est modeste et que la réponse à l'insuline n'est pas complètement normalisée.

La résistance à l'insuline est une réponse défectueuse du mécanisme responsable de la signalisation intracellulaire, y compris le récepteur à l'insuline ou les effecteurs intracellulaires dans les tissus cibles tels que le foie, les muscles et le tissu adipeux (Bornfeldt *et al.*, 2011). L'activation du récepteur à l'insuline est extrêmement sensible au niveau circulant d'insuline, de glucose et de lipides (Bornfeldt *et al.*, 2011). Dans ce contexte, une injection d'insuline provoque la phosphorylation du récepteur spécifique à l'insuline et déclenche une signalisation intracellulaire qui phosphoryle et active la protéine Akt dans les cellules du foie et du muscle squelettique extraites de souris normales (Tabata *et al.*, 2009). Cette voie est exacerbée dans les mêmes types de cellules provenant des souris *Angptl2*<sup>-/-</sup> qui, en plus d'avoir une meilleure sensibilité à l'insuline, possèdent un faible niveau circulant de triglycérides (Tabata *et al.*, 2009). Cependant, dans le modèle de souris surexprimant l'Angptl2 exclusivement dans le tissu

adipeux, la voie de signalisation à l'insuline est quasi-inhibée et cette réponse est accompagnée par une résistance prononcée à l'insuline (Tabata *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que le muscle squelettique et le foie sont parmi les organes cibles à travers lesquels l'Angptl2 exerce une résistance systémique à l'insuline chez la souris non-obèse (Figure 8). De plus, la voie de signalisation à l'insuline est utilisée par les hépatocytes pour la gluconéogenèse, suggérant que l'Angptl2 déclenche cette voie métabolique; des expériences sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

Puisque l'Angptl2 circulante est reliée positivement avec la masse du tissu adipeux, plusieurs questions se posent : l'influence exercée par l'Angptl2 sur la résistance à l'insuline est-elle causée par la masse totale du tissu adipeux, la source majeure de plusieurs autres cytokines ? la résistance à l'insuline est-elle un effet indirect de l'inflammation amplifiée par la présence d'Angptl2 ? est-ce une réponse spécifique à l'Angptl2 ? Il n'y a pas encore de réponses convaincantes à ces questions, mais les données de la littérature indiquent que l'Angptl2 est un médiateur qui contribue, d'une façon ou d'une autre, à la résistance à l'insuline.

### c) L'Angptl2 est reliée à l'inflammation

Le tissu adipeux intervient vraisemblablement dans la physiopathologie de certaines maladies, notamment la complication cardiovasculaire causée par l'obésité et le diabète, *via* la sécrétion de molécules inflammatoires (Fantuzzi, 2005). Ces dernières sont sécrétées par les adipocytes eux-mêmes ou par les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux, menant à un état inflammatoire chronique critique pour la progression des maladies mentionnées (Fain, 2006). L'Angptl2 exacerbe-t-elle la réaction pro-inflammatoire engendrée par les cytokines locales?

Nous avons démontré que les CE isolées de l'artère mammaire d'un patient coronarien et fumeur expriment 6 fois plus d'Angptl2 comparativement aux CE d'un patient coronarien non fumeur (Farhat *et al.*, 2008). Le tabagisme étant fortement associé à l'inflammation, ceci indique que l'Angptl2 pourrait contribuer à ce processus d'inflammation.

Le groupe japonais du Dr Oike a confirmé cette hypothèse en montrant que l'Angptl2 sécrétée par les CE, les macrophages et les adipocytes, modifie les caractéristiques vasculaires en activant l'inflammation, la perméabilité vasculaire et l'infiltration des

leucocytes (Figure 8) (Tabata *et al.*, 2009). En effet, chez la souris qui surexprime constitutivement l'Angptl2 dans les kératinocytes, une réaction inflammatoire caractérisée par la présence de réseaux vasculaires élargis et "rouges" a été notée (Tabata *et al.*, 2009). Toutefois, le nombre total des vaisseaux ne change pas dans les régions concernées. À l'inverse, chez la souris Angptl2<sup>-/-</sup> alimentée avec un régime riche en gras, la perméabilité vasculaire n'est pas affectée et les marqueurs d'inflammation sont moins exprimés (Tabata *et al.*, 2009). De même, dans les tissus adipeux, l'Angptl2 déclenche une réponse inflammatoire sans activer l'angiogenèse ou améliorer la situation hypoxique (Tabata *et al.*, 2009). L'Angptl2 exerce donc un rôle dans l'inflammation vasculaire pathologique, rôle qui se manifeste par l'augmentation de la perméabilité vasculaire locale laissant s'infiltrer les macrophages afin d'adhérer sur les parois des vaisseaux sanguins (Tabata *et al.*, 2009).

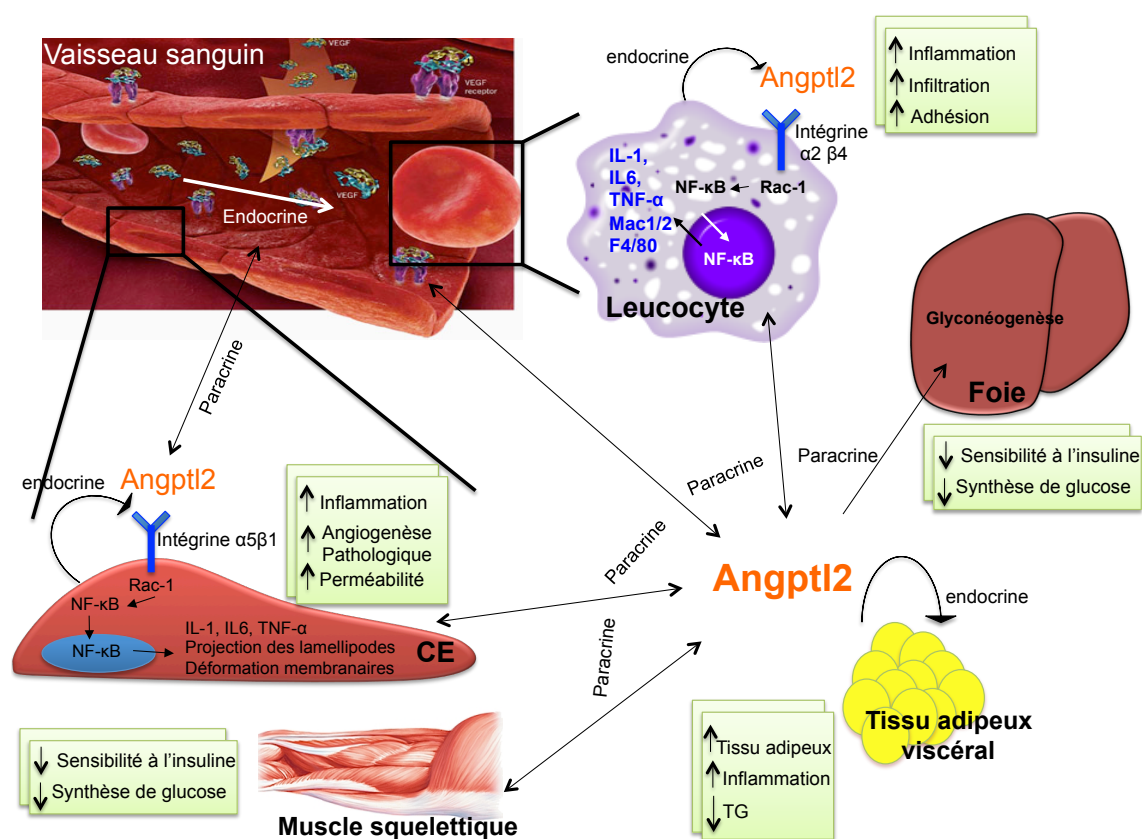
*In vitro*, l'Angptl2 démontre une affinité de liaison bien spécifique aux CE (HUVEC ou CE aortiques) et aux monocytes/macrophages, suggérant que ces cellules possèdent les récepteurs d'ancrage à l'Angptl2 (Tabata *et al.*, 2009). Il pourrait s'agir de l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  et  $\alpha 4$  ou  $\beta 2$  dans le cas des macrophages (Tabata *et al.*, 2009). Une fois liée à la surface des CE, l'Angptl2 induit des changements structuraux tels que la projection de lamellipodes et la déformation de la membrane cytoplasmique menant à la migration des CE et augmente la perméabilité vasculaire (Kim *et al.*, 1999b; Tabata *et al.*, 2009). Ce processus semble être rapide (10 min) et dépendant des intégrines  $\alpha 5\beta 1$  à la surface des CE (Tabata *et al.*, 2009). À l'intérieur de la cellule, le signal engendré par l'Angptl2 fait participer la protéine GTPase (Rac-1), responsable de la formation de protrusions membranaires ou les lamellipodes (Tan *et al.*, 2008). Ainsi, l'Angptl2 sécrétée par les CE (fonction autocrine) ou provenant de la circulation (fonction endocrine) ou du tissu adipeux lui-même (fonction paracrine), agit sur les CE vasculaires afin de déclencher l'angiogenèse et d'amplifier l'inflammation, deux processus qui passent par la protéine Rac-1 (Figure 8).

Au niveau des cellules inflammatoires elles-mêmes, l'activation des intégrines par l'Angptl2 stimule d'un côté, l'infiltration des cellules à travers la couche endothéliale (effets chimio-attracteurs et pro-adhésifs de l'Angptl2) (Tabata *et al.*, 2009), et de l'autre côté, l'activation du facteur de transcription pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B qui induit

la transcription des gènes inflammatoires (Tabata *et al.*, 2009). En effet, l'ajout de l'acide thioglycolique (un agent largement utilisé pour provoquer l'inflammation des macrophages) à des macrophages en culture, induit l'expression d'Angptl2 et stimule la production de marqueurs d'inflammation (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et IL6) (Tabata *et al.*, 2009). Une délétion du gène codant pour l'Angptl2 chez la souris (Angptl2<sup>-/-</sup>) conduit en revanche à une perte de l'expression des cytokines (TNF- $\alpha$  et IL-6), une réduction du taux de chimiokine MCP-1 ainsi que des marqueurs des macrophages (CCR2, CD68) (Tabata *et al.*, 2009). Ces résultats montrent que l'Angptl2 est exprimée, entre autres, par les macrophages et qu'elle agit de façon autocrine *via* les intégrines de surface afin d'amplifier l'expression des cytokines par la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (Figure 8). De plus, plusieurs études rapportent que le NF- $\kappa$ B est le responsable direct de l'expression des molécules d'adhésion endothéliales (ICAM, VCAM et la sélectine) (O'Brien *et al.*, 1996; Price *et al.*, 1999). De ce fait, l'Angpl2 pourrait non seulement activer NF- $\kappa$ B mais aussi stimuler l'expression des molécules d'adhésion, favorisant ainsi l'ancrage des cellules inflammatoires aux parois vasculaires (Tabata *et al.*, 2009).

De façon fort intéressante, le tissu adipeux de souris Angptl2<sup>-/-</sup> nourries avec une diète riche en gras présente un niveau d'inflammation moins marqué que celui de souris témoins (obèses suite à la diète riche en gras) : le tissu adipeux des souris Angptl2<sup>-/-</sup> exprime moins de marqueurs d'inflammation dérivés des macrophages (CCR2, CD68) et moins de cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), suggérant un phénomène de protection de l'inflammation et de l'infiltration des macrophages en absence de l'Angptl2 (Tabata *et al.*, 2009). Cette hypothèse a été confirmée chez les souris non-obèses où une surexpression de l'Angptl2 spécifiquement dans le tissu adipeux provoque une réponse inflammatoire et déclenche l'adhésion des leucocytes sur les parois des vaisseaux sanguins (Tabata *et al.*, 2009). De plus, l'abondance des macrophages est corrélée à la masse de tissu adipeux chez les souris de type sauvage mais pas chez le souris Angptl2<sup>-/-</sup> (Tabata *et al.*, 2009). Toutes ces observations suggèrent que la taille du tissu adipeux est reliée à l'inflammation chez les souris obèses, un mécanisme qui semble être catalysé par la présence de l'Angptl2.

Pour résumer l'étude très complète de l'équipe du Dr Oike (Tabata *et al.*, 2009), nous avons schématisé les trois voies majeures que l'Angptl2 régule pour contribuer au diabète relié à l'obésité : l'expansion du tissu adipeux, la résistance systémique à l'insuline et l'inflammation (Figure 8).



**Figure 8** Schématisation de l'implication de l'Angptl2 dans le diabète relié à l'obésité, selon les données de (Tabata *et al.*, 2009).

Dans des conditions de stress oxydant, de stress du RE et d'hypoxie, l'Angptl2 sécrétée par les CE, les adipocytes et les leucocytes/macrophages, peut agir de façon autocrine, paracrine et endocrine. Dans le tissu adipeux viscéral, une source majeure d'Angptl2, cette dernière déclenche l'augmentation de la masse adipeuse, l'inflammation et inhibe la sécrétion de triglycérides (TG). Sur l'endothélium vasculaire, l'Angptl2 stimule la voie Rac-1/ NF- $\kappa$ B pour produire l'inflammation, l'angiogenèse pathologique augmentant ainsi la perméabilité vasculaire aux cellules inflammatoires. Un fois infiltrés dans l'endothélium, les macrophages eux-mêmes synthétisent l'Angptl2, ce qui

déclenche des signaux intracellulaires favorisant l'adhésion à l'endothélium et l'inflammation. L'Angptl2 sécrétée par les autres organes peut agir de manière paracrine sur les hépatocytes et les muscles squelettiques afin d'augmenter la résistance systémique à l'insuline *via* un mécanisme qui diminue l'activité du récepteur à l'insuline (IR) et la voie Akt.

Récemment, les résultats d'une étude (Kitazawa *et al.*, 2011) sur le rôle de l'Angptl2 dans le diabète, ont contredit ceux de l'équipe du Dr Oike: dans un modèle de souris diabétiques et obèses *db/db*, un traitement chronique avec de l'Angptl2 recombinante pendant 4 semaines a eu comme conséquence surprenante de ralentir la progression du diabète, et non de l'accélérer comme le laissait présager les données précédentes (Tabata *et al.*, 2009). Chez la souris *db/db*, l'administration d'Angptl2 exogène a clairement diminué le taux de glucose circulant et d'insuline plasmatique, et a inhibé l'expression des gènes responsables de la synthèse des acides gras dans le foie (Kitazawa *et al.*, 2011). Les auteurs proposent donc qu'un traitement à l'Angptl2 est bénéfique, améliore la tolérance au glucose et augmente la sensibilité à l'insuline, tout en réduisant la synthèse des acides gras et les stockages lipidiques dans le foie et le tissu adipeux (Kitazawa *et al.*, 2011). Afin d'expliquer les discordances entre les deux études japonaises, le Dr Kitazawa souligne les différences de fond génétique entre les deux modèles de souris étudiés: des souris transgéniques surexprimant l'Angptl2 qui développent le diabète avec le temps pour l'équipe du Dr Oike, et des souris qui sont diabétiques et obèses *db/db* avant même leur exposition à la protéine Angptl2 recombinante pour l'équipe du Dr Kitazawa. Selon ce dernier, puisque les deux modèles représentent deux stades différents de la sévérité du diabète, les résultats entre les études ne sont pas nécessairement contradictoires (Kitazawa *et al.*, 2011). Cependant, des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre la contribution de l'Angptl2 dans la pathologie du diabète de type 2.

En résumé, si le rôle de l'Angptl2 dans les stades précoces ou avancés du diabète n'est pas encore clair, il est en revanche évident que l'Angptl2 exerce un effet pro-inflammatoire sur le système vasculaire *via* l'activation du facteur NF- $\kappa$ B, la production de cytokines inflammatoires et l'infiltration/adhésion des cellules inflammatoires.

Puisque l'inflammation est une étape clé de l'athérogenèse, il est pertinent de se demander si l'effet pro-inflammatoire de l'Angptl2 est relié à la dysfonction endothéliale et au développement de la lésion athéromateuse.

#### **1.4.3.6. L'Angptl2 est impliquée dans les maladies inflammatoires chroniques : l'athérosclérose**

Chez l'humain, les maladies coronariennes entraînent une élévation (~ 1,5 fois,  $p < 0,05$ ) des niveaux circulants d'Angptl2 comparativement à ceux de volontaires sains, taux mesurés dans le plasma ou dans le sérum (Tabata *et al.*, 2009). Chez les patients coronariens, l'Angptl2 plasmatique est plus élevée lorsque la maladie affecte plusieurs vaisseaux sanguins que lorsqu'un simple vaisseau est touché (Oike *et al.*, 2009b). De plus, l'Angptl2 circulante est positivement associée à un niveau élevé du marqueur de risque cardiovasculaire, la CRP (Tabata *et al.*, 2009). Chez les souris transgéniques surexprimant l'Angptl2, la protéine augmente relativement peu dans la circulation (<1,5 fois) alors qu'elle est 3 à 5 fois plus exprimée dans les tissus chez ces mêmes souris (Tabata *et al.*, 2009). Le Dr Oike a proposé l'hypothèse selon laquelle une légère augmentation d'Angptl2 circulante détectée chez des sujets coronariens est reliée à une forte accumulation d'Angptl2 au niveau tissulaire, et par conséquent à une inflammation systémique importante (Oike *et al.*, 2009b).

Une nouvelle étude de l'équipe du Dr Oike présentée au congrès de l'AHA en 2010 et 2013 a tenté de caractériser le rôle de l'Angptl2 endothéliale dans le processus de l'athérosclérose. Chez la souris, au niveau de la lésion athéromateuse, l'expression de la protéine Angptl2 est concentrée dans les CE et les macrophages de la plaque athérosclérotique (Horio *et al.*, 2010). De plus, dans un modèle murin d'anévrisme de l'aorte abdominale, l'expression d'Angptl2 est significativement plus forte dans la région dilatée caractérisée par l'abondance de macrophages et de cytokines inflammatoires, comparativement à une région non dilatée de la même aorte (Tazume *et al.*, 2012). Ces résultats indiquent que l'expression locale de l'Angptl2 dans les régions endommagées joue un rôle afin d'exacerber la cascade d'inflammation.

De façon similaire, la concentration sanguine d'Angptl2 est plus forte chez les patients coronariens ayant une dysfonction endothéliale par rapport aux sujets ayant une fonction endothéliale normale; la concentration d'Angptl2 dans le plasma est négativement reliée avec la réponse dilatatrice induite par l'acétylcholine (Horio *et al.*, 2010). De même, chez la souris où l'Angptl2 est surexprimée dans l'endothélium (sous la dépendance d'un promoteur spécifique aux CE), la dilation dépendante de l'endothélium est diminuée (Horio *et al.*, 2010). En revanche, la dysfonction endothéliale normalement observée chez les souris âgées et/ou chez les souris obèses est améliorée lorsque l'Angptl2 est supprimée chez ces animaux (Horio *et al.*, 2010). Dans un modèle de souris double KO (ApoE<sup>-/-</sup> et Angptl2<sup>-/-</sup>), la taille des lésions athéromateuses est réduite comparativement à celles de souris KO ApoE<sup>-/-</sup> (Horio *et al.*, 2010). Ces résultats suggèrent que sous l'influence de l'Angptl2, une dysfonction endothéliale se développe, un mécanisme déclencheur de l'athérosclérose. Par ailleurs, l'Angptl2 semble stimuler l'activité des enzymes MMP2 et MMP9 sécrétées par les macrophages (sous le contrôle du facteur de transcription NF-κB) comme un moyen de dégradation de la matrice extracellulaire dans le modèle d'anévrisme de l'aorte (Tazume *et al.*, 2012). Ce mécanisme irréversible du remodelage cellulaire est à l'origine de la perméabilité accrue des parois aortiques contribuant à l'infiltration excessive de cellules inflammatoires.

Ensemble, ces données démontrent que l'Angptl2 renforce l'inflammation et accroît la dégradation de la matrice cellulaire au sein des parois vasculaires dans le but de permettre aux macrophages de s'infiltrer et d'exprimer d'avantage des cytokines inflammatoires. Ce mécanisme pourrait être à l'origine du développement de l'athérosclérose, une hypothèse qui reste à valider.

En conclusion, il ressort que l'Angptl2 est sur-exprimée dans un contexte pathologique relié à l'inflammation chronique tels que le diabète lié aux complications de l'obésité, le cancer, la dermatomyosite, l'arthrite rhumatoïde et potentiellement l'athérosclérose. Son abondance locale et systémique pourrait amplifier l'inflammation en recrutant des cellules inflammatoires telles que les macrophages qui, sous l'effet de signaux inflammatoires, constituent à leur tour une source importante d'Angptl2. Ceci suggère



un cercle vicieux d'amplification du signal inflammatoire exacerbant ces différentes maladies.

Les études effectuées présentent des preuves de la contribution de l'Angptl2 dans différents processus pathogéniques. Ces travaux proposent un rôle crucial de l'Angptl2 dans l'angiogenèse et le métabolisme glucidique et lipidique, suggérant un impact direct de l'Angptl2 sur le système cardiovasculaire, sans toutefois répondre à plusieurs questions : Quel lien existe-t-il entre l'Angptl2 et la lésion athérosclérotique ? L'Angptl2 a-elle un effet pro- ou anti-athérogénique? Sachant que l'inflammation et l'oxydation sont deux processus clés dans le développement de l'athérosclérose, l'Angptl2 qui est pro-inflammatoire est-elle aussi pro-oxydante ?

## **Démarche et objectifs**

## **Démarche et objectifs des études**

Puisque les niveaux circulants et tissulaires d'Angptl2 augmentent au cours de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, il est plausible d'imaginer un lien entre l'Angptl2 et l'apparition de l'athérosclérose, une maladie inflammatoire chronique par excellence.

Seul le groupe du Dr Oike (Muramoto *et al.*, 2011; Tabata *et al.*, 2009) a démontré que les niveaux circulants d'Angptl2 augmentent chez les sujets à risque de maladies cardiovasculaires (obèses, diabétiques) et chez les patients coronariens. Cependant, les mécanismes d'action à l'origine des effets potentiellement néfastes de l'Angptl2 sont inconnus. L'Angptl2 pourrait intervenir à différentes étapes de la pathologie, telles que l'accumulation des LDL, l'oxydation, l'inflammation, le recrutement des leucocytes et finalement, la formation de la plaque. Si un lien de causalité était établi, cela permettrait de valider un rôle causal de biomarqueur pour l'Angptl2 dans la pathologie de l'athérosclérose. Dans cette thèse, nous proposons que l'Angptl2 participe à la progression de l'athérosclérose *via* ses propriétés pro-inflammatoires et pro-oxydantes et qu'elle représente un nouveau biomarqueur de l'athérosclérose.

### **2.1. Étude 1 : L'expression d'Angptl2 est-elle associée à la sénescence des cellules endothéliales ?**

#### **2.1.1. Mise en contexte**

Notre laboratoire s'intéresse à la dysfonction endothéliale associée au vieillissement. Nos études confirment que les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires accélèrent le vieillissement de l'endothélium (Voghel, Thorin-Trescases et al. 2007) et que ce processus est principalement contrôlé par une augmentation du stress oxydant (Voghel, Thorin-Trescases et al. 2008). En effet, un traitement chronique avec un antioxydant, la *N-acétyl-L-cystéine* (NAC), a permis de ralentir l'entrée en sénescence de CE en culture isolées de tissus de patients coronariens (Voghel, Thorin-Trescases et al. 2008).

### **2.1.2. Les objectifs spécifiques**

Les objectifs de cette première étude étaient de caractériser et d'identifier les protéines impliquées dans la sénescence endothéliale en analysant la différence dans l'expression génique des CE sénescents comparativement à celle de cellules non sénescents traitées au NAC.

Bien que les résultats de cette étude #1 ne soient pas publiés, je considère qu'il est important de les inclure dans cette thèse, puisqu'ils sont à la base de mes travaux sur le rôle de l'Angptl2 dans le cadre de l'athérosclérose.

## **2.2. Étude 2 : L'Angptl2 joue-t-elle un rôle dans la sénescence prématurée induite par le stress dans les CE isolées de tissus des patients fumeurs ?**

### **2.2.1. Mise en contexte**

Après avoir démontré dans l'étude # 1 que la sénescence des CE est associée à une expression accrue d'Angptl2, que l'entrée en sénescence des CE peut être retardée par un antioxydant et que l'expression de l'Angptl2 par les CE peut être réduite par un antioxydant, nous avons choisi d'étudier les effets du tabac sur l'expression d'Angptl2 par les CE. Le tabac est en effet connu pour induire un déséquilibre massif dans les processus inflammatoires et oxydants.

### **2.2.2. Hypothèse**

L'Angptl2 contribue à la sénescence prématurée induite par le stress oxydant

### **2.2.3. Les objectifs spécifiques**

L'objectif primaire essentiel de cette étude était de mieux caractériser la sénescence des CE isolées de tissus de patients coronariens fumeurs. L'objectif secondaire était de déterminer l'expression de l'Angptl2 dans ce contexte particulier.

## **2.3. Étude 3 : Préparation et purification de l'Angptl2 recombinante**

### **2.3.1. Mise en contexte**

Afin d'étudier l'impact de l'Angptl2 sur la fonction/dysfonction endothéliale, l'oxydation, l'inflammation et l'athérogenèse, une administration exogène d'Angptl2 *in vivo* ou encore *in vitro* est nécessaire.

### **2.3.2. Les objectifs spécifiques**

Puisque l'Angptl2 sous sa forme glycosylée n'est pas disponible dans le commerce, nos objectifs étaient 1) de produire la protéine recombinante (Angptl2-GST) de façon stable dans un système hétérologue de cellules humaines (HEK 293), 2) d'optimiser le rendement en protéine pure et 3) de démontrer la fonctionnalité de l'Angptl2 recombinante purifiée.

Nous avons choisi d'inclure les détails méthodologiques de la préparation et de la purification de l'Angptl2 dans cette thèse, puisque pour des raisons d'espace ces données ne sont pas incluses dans les articles. La purification de l'Angptl2 recombinante est néanmoins un processus long et délicat qu'il ne faut pas sous-estimer.

Un article méthodologique concernant la production et la purification de l'Angptl2 recombinante est soumis à "Protein expression and purification" (Elsevier).

## **2.4. Étude 4 : Propriétés pro-oxydantes de l'Angptl2**

### **2.4.1. Mise en contexte**

Dans l'étude # 2, nous avons démontré que l'expression de l'Angptl2 est augmentée de 6 fois dans les CE de patients coronariens atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique. L'environnement de ces cellules est à la fois hypoxique et associé à un niveau élevé de stress oxydant et d'inflammation (Farhat *et al.*, 2008). Nos données

suggèrent donc que dans les CE de patients atteints de MPOC et d'athérosclérose, l'expression d'Angptl2 est liée à l'environnement oxydant cellulaire.

### **2.4.2. Hypothèse**

L'Angptl2 a des propriétés pro-oxydantes *via* l'inhibition de la voie cytoprotectrice antioxydante contrôlée par le facteur de transcription Nrf2.

### **2.4.3. Les objectifs spécifiques**

Notre objectif était de déterminer si l'Angptl2 est un facteur pro-oxydant, et par le biais de quelle voie moléculaire. Nous avons déterminé que l'Angptl2 inhibe des systèmes antioxydants protecteurs tels que le facteur relié au facteur nucléaire hématopoïétique (Nrf2) et l'enzyme hème oxygénase (HO), faisant appel aux voies de signalisation intracellulaires des MAPK.

## **2.5. Étude 5 : Rôle spécifique de l'Angptl2 dans l'athérosclérose**

### **2.5.1. Mise en contexte**

Puisque la concentration de l'Angptl2 circulante augmente chez les patients coronariens (Tabata *et al.*, 2009), que l'expression d'Angptl2 est accrue dans les CE de patients athérosclérotiques (Farhat *et al.*, 2008), que cette protéine a des effets pro-inflammatoires et pro-oxydants (étude # 4), nous avons étudié la contribution de l'Angptl2 dans le processus d'athérosclérose en utilisant un modèle de souris dyslipidémiques génétiquement modifiées pour développer l'athérosclérose de façon spontanée sans avoir besoin d'être exposées à une diète riche en gras, les souris ATX (LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sub>100</sub><sup>+/+</sup>) (Drouin *et al.*, 2011a; Drouin *et al.*, 2011b; Gendron *et al.*, 2010).

### **2.5.2. Hypothèse**

L'Angptl2 est un facteur pro-athérogénique qui déclenche les mécanismes moléculaires et cellulaires essentiels au développement de l'athérosclérose.

### **2.6.1. Les objectifs spécifiques**

Nos objectifs de travail étaient : 1) de vérifier si l'expression de l'Angptl2 est directement associée avec l'expansion de la plaque athéromateuse, 2) de valider que l'Angptl2 contribue à l'athérogénèse en exacerbant des processus clés tels que l'adhésion des leucocytes à l'endothélium et la sécrétion de cytokines inflammatoires et 3) de prouver qu'une administration chronique d'Angptl2 recombinante pendant un mois est suffisante pour exacerber la formation de la plaque et amplifier les signaux pro-inflammatoires chez les souris pré-athérosclérotiques, ATX (LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sub>100</sub><sup>+/+</sup>).

# Résultats



### **3.1. Étude 1. (Résultats non publiés)**

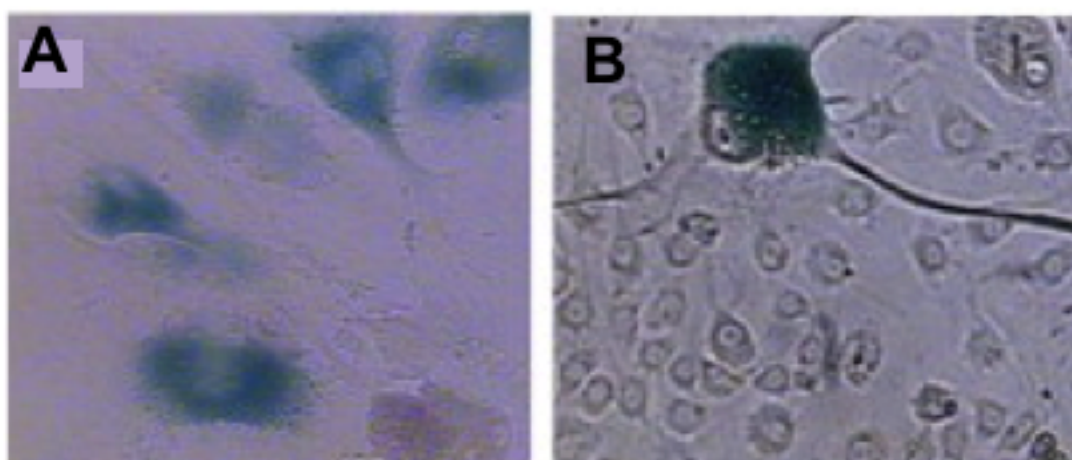
**L'expression d'Angptl2 est associée à la sénescence des  
cellules endothéliales**

### 3.1.1. Introduction

Le vieillissement correspond à l'ensemble des processus physiologiques qui ralentissent le métabolisme et les fonctions des cellules somatiques avec l'âge. Ceci aboutit au déclin progressif de l'ensemble des mécanismes cellulaires, en particulier ceux impliqués dans la division cellulaire (Jeyapalan *et al.*, 2008; Kirkwood *et al.*, 2000). La limite répliquative de la cellule est appelée sénescence; cet état cellulaire est permanent et irréversible (Kirkwood *et al.*, 2000; Thorin-Trescases *et al.*, 2010). La sénescence cellulaire a été décrite pour la première fois dans des fibroblastes en culture où un arrêt de leur prolifération a été observé malgré un apport en facteurs de croissance (Hayflick, 2000). Les cellules sénescents demeurent néanmoins viables et sont métaboliquement actives (Jeyapalan *et al.*, 2008) et elles jouent un rôle *in vivo*, dans les maladies cardiovasculaires par exemple (Minamino *et al.*, 2002). Deux types de sénescence ont été identifiés *in vitro* : 1) la sénescence dite répliquative qui apparaît après une longue période de culture et qui correspond à l'épuisement des capacités répliquatives des cellules (Campisi *et al.*, 2009) et 2) la sénescence induite par le stress qui apparaît de façon plus précoce, en réponse à un stress (Von Zglinicki, 2003).

La sénescence répliquative est déclenchée par le raccourcissement maximal des télomères situés aux extrémités des chromosomes, après chaque cycle de division cellulaire (Campisi *et al.*, 2009). Ce phénomène a surtout été décrit en culture, où les cellules peuvent se diviser un nombre de fois limité avant de devenir sénescents, nombre qui varie selon le type et l'origine de la cellule (Hayflick *et al.*, 1961). Ce processus est dépendant de l'âge et pourrait être la cause naturelle du vieillissement physiologique (Slagboom *et al.*, 1994). Toutefois, suite à l'exposition chronique, ou aigue, à un niveau élevé de stress [stress oxydant, ultraviolet (UV), oncogènes, etc], la sénescence est induite prématurément de manière indépendante, ou combinée, de la longueur des télomères (Ben-Porath *et al.*, 2004b; Von Zglinicki, 2003). Dans une situation pathologique telle que l'athérosclérose, où l'environnement cellulaire est hautement pro-oxydant et inflammatoire, le vieillissement / sénescence des CE contribue à la dysfonction de l'endothélium (Minamino *et al.*, 2002). Chez les patients

athérosclérotiques, les CE sénescents sont surtout présentes dans la région qui couvre la plaque (Minamino *et al.*, 2002). Nous avons montré *in vitro* que la sénescence des CE en culture isolées de patients coronariens athérosclérotiques est prématurée, indépendante de l'âge chronologique des patients, et corrélée à la durée d'exposition aux différents facteurs de risque cardiovasculaires des patients (Thorin-Trescases *et al.*, 2010; Voghel *et al.*, 2007). Nous avons prouvé que la sénescence des CE de patients coronariens était due non seulement à un raccourcissement des télomères mais également à un stress oxydant puisqu'un traitement chronique avec un antioxydant, le NAC, a permis de retarder l'apparition de la sénescence (Figure 9) (Voghel *et al.*, 2008b). En effet, nous avons observé que le NAC diminue le niveau des marqueurs du stress oxydant et d'inflammation, ralentit le taux de raccourcissement des télomères et augmente le potentiel réplcatif des CE, mais seulement dans les cellules où les dommages associés au stress oxydant sont réversibles (Voghel *et al.*, 2008b).



**Figure 9** Effet bénéfique du NAC sur la sénescence de cellules endothéliales en culture isolées à partir d'une artère mammaire d'un même patient athérosclérotique.

En absence de NAC, les CE en culture deviennent rapidement sénescents (A) alors qu'en présence de NAC la sénescence est retardée (B) (Voghel *et al.*, 2008b).

Réimprimé avec la permission de Elsevier Limited : [Mechanisms of Ageing and Development](#). Guillaume Voghel, Nathalie Thorin-Trescases, Nada Farhat, Aida M. Mamarbachi, Louis Villeneuve, Annik Fortier, Louis P. Perrault, Michel Carrier, Eric

Thorin, Chronic treatment with *N*-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients, 129 (5), 261–270, Copyright (2008). License Number : 3013301427464

Mais par quel mécanisme intracellulaire le NAC limite-t-il l'entrée en sénescence? Notre objectif dans cette première étude était d'identifier les protéines impliquées dans la réponse au NAC. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique de *Differential Display*, qui permet de comparer l'expression différentielle des gènes dans une population de CE athérosclérotiques *versus* celles des mêmes cellules, issues du même patient, traitées avec l'antioxydant.

Cette technique possède plusieurs avantages, notamment au niveau de la quantité d'ARN messager nécessaire. Puisqu'il s'agit d'une technique d'amplification des produits génétiques, peu d'ARN suffit pour obtenir un signal. Pour la même raison, la technique de *Differential Display* permet une détection des transcrits différentiels correspondant à des gènes faiblement exprimés, ce qui n'est pas possible avec la technique du micro-array. De plus, les gènes amplifiés ne doivent pas nécessairement être connus, les amorces arbitraires utilisées permettent d'identifier des gènes inconnus et des variants d'épissages alternatifs. Finalement, cette technique est peu coûteuse en comparaison à d'autres techniques telles que le micro-array par exemple. Nous avons donc comparé l'expression des gènes de CE sénescences à celle de cellules, issues d'un même patient, où la sénescence a été inhibée par un traitement chronique à l'antioxydant NAC. L'*Angptl2* était un des gènes identifiés par la technique de *Differential Display*.

### 3.1.2. Matériel et méthodes

#### 3.1.2.1. Culture cellulaire

Nous avons utilisé des cellules humaines endothéliales de l'artère mammaire (hIMAEC) en accord avec le comité d'éthique de l'Institut de Cardiologie de Montréal (Voghel *et al.*, 2007). Lors des pontages coronariens des patients de l'Institut de Cardiologie de Montréal, des segments non utilisés d'artères mammaires sont transférés du bloc opératoire au laboratoire, conservés dans du milieu de culture (DMEM, milieu Eagle modifié de Dulbecco) et dans la glace. Au laboratoire, les segments d'artère mammaire sont isolés du muscle et dénudés du gras qui les entoure, sont ouverts longitudinalement et coupés en petits morceaux qui sont ensuite déposés sur du Matrigel tapissant une boîte de Pétri (de 35 mm), de manière à ce que les CE soient au contact du Matrigel. Les hIMAEC sont alors cultivées selon une technique développée dans notre laboratoire (Voghel *et al.*, 2007), dans un milieu DMEM enrichi avec 10 % de sérum fœtal bovin, 10 % de sérum de veau, 1 % du mélange d'antibiotiques pénicilline/streptomycine, 25 µg/ml de fungizone, 90 µg/ml d'héparine sodique et 60 µg/ml de suppléments de croissance spécifiques aux CE (*endothelial cell growth supplement*) et conservées dans l'incubateur cellulaire, dans une atmosphère humide, avec 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C. La vitesse de prolifération des cellules varie d'un donneur à l'autre. Au bout d'une semaine environ, des CE entourent les morceaux d'artères; ces derniers sont enlevés délicatement et les CE sont cultivées sur le Matrigel jusqu'à confluence (environ 1 mois). Par la suite, les CE sont décollées du Matrigel par une digestion avec de la dispase, réensemencées et cultivées dans des surfaces classiques sans Matrigel.

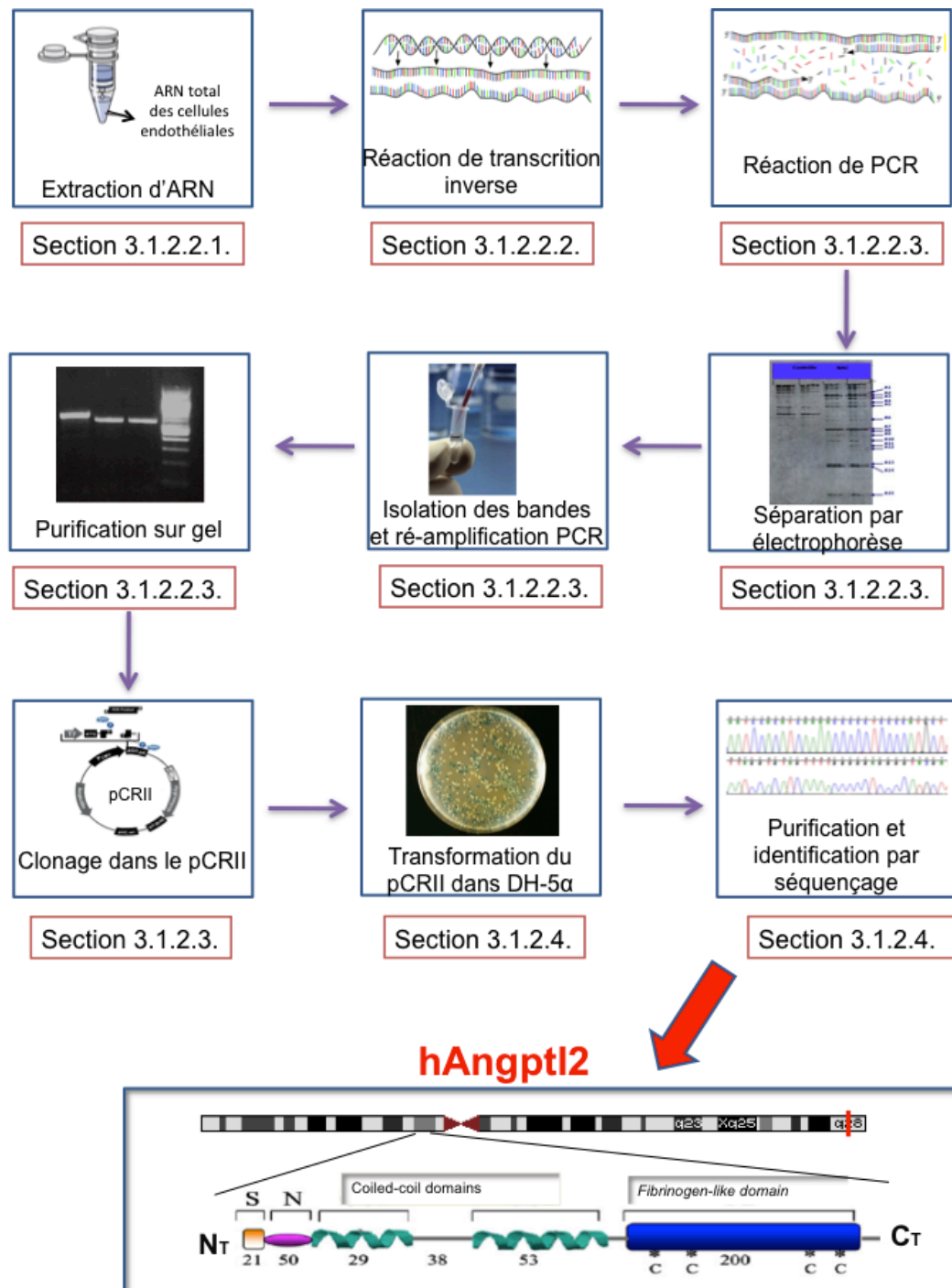
La sénescence des hIMAEC est induite par passages successifs et ce jusqu'à la limite du potentiel répliatif des cellules. Le nombre cumulatif de PDL (*population doubling length*), c'est à dire le nombre de divisions cellulaires du passage initial (passage 1) au passage final (cellules sénescentes) est d'environ 25 pour les hIMAEC. Par comparaison, ce chiffre est considérablement plus grand pour des fibroblastes (PDL cumulatif de 40-

60), un modèle cellulaire très utilisé pour étudier la sénescence (von Zglinicki *et al.*, 2005).

### 3.1.2.2. Technique de *Differential Display*

La technique de *Differential Display* consiste à comparer le profil d'expression génique de différentes populations cellulaires à partir de leur ADN complémentaire. Elle permet de détecter tous les transcrits, même ceux qui sont exprimés à un niveau faible grâce à une étape d'amplification par PCR. Les différentes étapes de cette technique sont schématisées sur la Figure 10.

Les ARN messagers des échantillons à comparer sont extraits et transcrits inverse avec des amorces oligo(T) qui permettent de cibler spécifiquement les ARN messagers poly(A). Les ADNc obtenus à la suite de cette réaction sont amplifiés de façon aléatoire par PCR en utilisant des combinaisons variées d'amorces arbitraires et un nucléotide radioactif (déoxyadénosine 5-triphosphate, [ $\alpha^{33}\text{P}$ ]-dATP). Les produits obtenus sont séparés sur un gel dénaturant d'acrylamide et visualisés par autoradiographie. La différence dans l'expression génique se traduit par l'apparition ou la disparition d'une bande dans un échantillon. Une fois repérées, les bandes sont découpées du gel, hydratées et les ADNc sont ré-amplifiés par une autre réaction de PCR à l'aide des mêmes paires d'amorces que celles utilisées dans le premier PCR. Les produits de cette deuxième amplification sont purifiés et sous-clonés dans un vecteur d'expression afin d'être identifiés par séquençage.



**Figure 10** Représentation schématique des différentes étapes de la technique de *Differential Display* menant à l'identification de l'Angptl2 dans les CE de patients coronariens.

### 3.1.2.2.1. Extraction de l'ARN total

Les cellules hIMAEC d'un même patient ont été cultivées dans des flacons de 75 cm<sup>2</sup>, parallèlement en présence et en absence de l'antioxydant NAC (10µM), jusqu'à sénescence. Puis, les cellules ont été lavées deux fois au tampon phosphate salin (PBS) et les ARN totaux ont été extraits selon les instructions du kit RNeasy Mini kit (Qiagen). L'éluat (50-60 µl) obtenu correspond à l'ARN total extrait et a été quantifié par spectrométrie NANO-Drop (*Thermo Scientific Nanodrop, ND1000*), aliquoté et conservé à -80°C.

### 3.1.2.2.2. Réaction de transcription inverse

Cette réaction sert à synthétiser une librairie de brins complémentaires à partir de la matrice ARN, c'est-à-dire de créer un brin d'ADNc à l'ARN à l'aide de l'enzyme ARN polymérase ADN-dépendant (la reverse transcriptase *Moloney Murine Leukemia Virus*, MMLV). Pour chaque réaction, 2 µg d'ARN total isolé sont mélangés avec 0,1 µM d'oligo(T), 1 µl du mélange déoxyribonucléotide triphosphate (dNTP, 10 mM) et le tout est dilué dans un volume final de 13 µl avec de l'eau *RNase/DNase free*. Ce mélange est dénaturé pendant 15 min à 65°C et mis directement sur la glace pour 5 min. Ensuite, 4 µl du tampon de la réaction *first strand 5X*, 2 µl de dithiothreitol (DTT) et 1 µl de l'enzyme Reverse Transcriptase MMLV sont rajoutés à l'ARN dénaturé. Comme contrôle négatif, une réaction sans l'ajout de l'enzyme MMLV est réalisée pour chaque échantillon. La réaction de transcription inverse se déroule selon le protocole suivant : 10 min à 25°C, 60 min à 42°C et 5 min à 99°C. L'ADN obtenu (concentration ajustée à 100 ng/µl) est utilisé immédiatement, ou gardé de façon stable à -20°C.



### 3.1.2.2.3. Réaction de PCR-DD (Polymerase Chain Reaction - Differential Display)

Cette technique comporte deux étapes majeures : l'amplification de l'ADNc obtenu par PCR et la séparation des produits obtenus par électrophorèse.

#### *a) Réaction d'amplification en chaîne (PCR)*

Contrairement à la technique de PCR conventionnelle qui emploie des amorces spécifiques qui s'hybrident à l'ADN cible, la technique de *Differential Display* utilise des amorces arbitraires et non spécifiques qui permettent d'isoler une collection de gènes potentiellement exprimés de façon différentielle. La compagnie *Clontech* suggère dans son protocole (*Delta Differential Display kit user Manual*) 10 possibilités d'amorces arbitraires "sens" (nommées *primers P*, P1-P10) et 9 possibilités d'amorces "antisens" riches en thymidine (nommées *primers T*, T1-T9) (Tableau III), générant 90 possibilités de combinaisons d'amorces. De plus, chaque amorce *P* ou *T* peut être utilisée seule ou avec une autre amorce appartenant à son groupe (sens ou antisens) dans le but d'augmenter le nombre des combinaisons d'amorces possibles (55 combinaisons additionnelles). Il faut souligner que la combinaison des amorces *P* et *T* (ou bien *T* seules) génère des produits PCR dérivés de l'extrémité 3' de l'ARNm, alors que la combinaison des amorces *P* favorise l'amplification des régions plus internes dans l'ARNm. Lors de notre expérience, nous avons utilisé les combinaisons suivantes : P4/T3, P3/T8, P8/T8, P3/T3, P3/T4, P8/T3, P4/T4 et P2/T8. Ces combinaisons ont en effet la complémentarité de bases la plus présente dans le génome humain.

**Tableau III** Séquence des amorces suggérées par la compagnie *Clontech*

La séquence des amorces P (5'-3')	La séquence des amorces T (5'-3')
P1 : ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA	T1 : CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAA
P2 : ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATA	T2 : CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAC
P3 : ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG	T3 : CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAG
P4 : ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG	T4 : CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCA
P5 : ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG	T5 : CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCC
P6 : ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG	T6 : CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTCG
P7 : ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG	T7 : CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGA
P8 : ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG	T8 : CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGC
P9 : ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG	T9 : CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTGG
P10 : ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC	

Pour chaque échantillon, l'ADNc obtenu par transcription inverse est dilué (1/5, 1/10, 1/20 et 1/30) et amplifié dans quatre réactions PCR différentes afin de s'assurer de la linéarité de la réponse. De plus, la réaction obtenue avec le contrôle négatif (réaction de transcription inverse sans l'ajout de l'enzyme MMLV) est aussi amplifiée par PCR. L'enzyme Taq polymérase régulière possède l'inconvénient d'amplifier l'ADN avec une fidélité relativement faible. Il est donc possible d'introduire une erreur à chaque 3000 paires de base amplifiées et cette possibilité de mutation augmente de façon arithmétique après chaque cycle. Pour éviter ce phénomène, l'ADN est amplifié avec une enzyme polymérase possédant une grande fidélité (*Platinum Taq DNA Polymerase high fidelity*, Invitrogen).

La réaction PCR est réalisée sur 1 µl d'ADNc ou 1 µl du contrôle négatif, sur lequel sont rajoutés 2 µl du tampon d'enzyme Taq Platinum 10X, 0,8 µl de MgSO<sub>4</sub> (50 mM), 0,2 µl de dNTP (5 mM), 1 µl de l'amorce #1 (P ou T selon la combinaison choisie, à 20 µM), 1 µl de l'amorce #2 (P ou T selon la combinaison choisie, à 20 µM), 0,25 µl de

Taq Platinum, 0,25 µl de [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dATP dans un volume final de 20 µl. L'amplification de produit PCR est réalisée dans un thermocycleur Perkin Elmer 9700, avec un cycle de 5 min à 94°C, 5 min à 40°C et 5 min à 68°C, suivi par deux cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 40°C et 5 min à 68°C. L'amplification se déroule sur vingt-trois cycles de 20 sec à 94°C, 30 sec à 60°C et 2 min à 68°C et un cycle d'élongation finale de 7 min à 68°C. À la fin de la réaction de PCR, les produits radioactifs sont soumis à une électrophorèse sur gel ou bien conservés à -20°C.

### ***b) Séparation des produits de PCR par électrophorèse***

Pour analyser l'ADNc sur gel d'acrylamide, 2,5 µl de produit PCR sont mélangés à un volume égal du tampon de chargement (*Loading buffer*) contenant 95 % de formamide, 0,25 % de bleu de bromophénol et 0,25 % de Xylène Cyanol. Les échantillons sont dénaturés 2 min à 94°C et refroidis sur la glace pendant 5 min.

Les produits de PCR obtenus avec cette technique peuvent avoir des tailles variant entre 100 pb à 2 kb. Pour obtenir une meilleure résolution et une bonne performance, une séparation sur un gel dénaturant d'acrylamide, et non d'agarose, est recommandée. Le gel d'acrylamide possède plusieurs avantages : l'acrylamide 1) est capable de discriminer de plus petites différences dans la taille des fragments, 2) possède une grande capacité, il est possible de séparer jusqu'à 25 µg d'ADN dans un seul puits du gel et 3) permet de purifier l'ADN de toute contamination pouvant interférer avec l'activité des enzymes de clonage. De plus, l'utilisation des conditions dénaturantes (8 M d'urée) et la haute température de chauffage empêchent l'ADNc simple brin (surtout les régions riches en GC) de former des structures secondaires au cours de la migration, conférant une meilleure séparation.

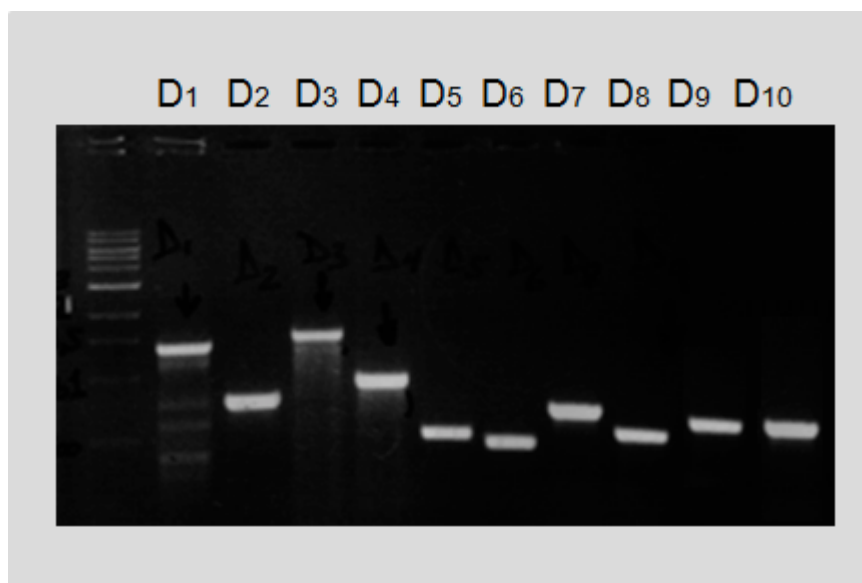
L'électrophorèse est effectuée dans un appareil *Genomyx LR DNA programmable high resolution DNA sequencer* (modèle GX100) équipé d'un grand gel de format 61x33 cm et de 200 µm d'épaisseur. L'acrylamide utilisé est la forme Ultrapure (Ambion) à une concentration de 6% d'acrylamide (w/v) dans une solution bis : acrylamide (19:1) et 8 M d'urée, le tout dans un tampon TBE 1X (Tris-borate-EDTA) contenant 90 mM de

Tris-base, 90 mM d'acide borique et 2 mM d'EDTA (pH 8,0). Dans un volume de 100 ml d'acrylamide 6%, sont ajoutés 800 µl de la solution 10 % d'ammonium persulfate et 80 µl de TEMED. La polymérisation de l'acrylamide se fait en 45 min. Cinq µl de chaque échantillon préparé précédemment sont déposés dans chaque puits du gel et sont soumis à une migration pendant 4 h (à 50 °C, 100 W et 2700 V) dans un tampon de migration TBE (1 X dans la chambre inférieure et 0.5 X dans la chambre supérieure). Dans un gel dénaturant de polyacrylamide (6%), le bleu de bromophénol migre à la hauteur de 50 pb et le Xylène Cyanol migre à 200 pb. Après 4 h de migration, la ligne bleue qui correspond au bromophénol sort du gel alors que celle du Xylène Cyanol s'est rendue à la moitié du gel. Ensuite, le gel est séché dans le système pendant 35 min à 50°C, lavé avec un excès d'eau pour enlever l'urée et ce cycle de séchage et de lavage est répété trois fois. Finalement, le gel est exposé à un film Bio-Max (Kodak) et est enfermé dans une boîte noire toute la nuit à température de la pièce. Après la révélation du film et l'analyse des résultats obtenus, le film d'autoradiographie est parfaitement superposé sur le gel. Sous la lumière d'une plaque lumineuse, les bandes radioactives sont repérées, hydratées avec 0,5 µl d'eau stérile et récupérées au moyen d'une lame de scalpel au fond d'un tube collecteur stérile. Pour s'assurer que les bandes d'intérêt ont bien été récupérées, le gel est ensuite réexposé sur un nouveau film et l'absence du signal est vérifiée par autoradiographie.

### ***c) Ré-amplification des bandes d'intérêt par PCR***

Nous nous sommes intéressés aux bandes dont l'expression a disparu suite au traitement chronique des hMAEC avec le NAC: 10 bandes (D1-D10) ont été choisies (voir Figure 17, section Résultats 3.1.3). En théorie, chaque bande correspond à un seul gène, mais il peut arriver que les bandes se chevauchent, surtout si leurs poids moléculaires sont très proches. La seule façon d'isoler les différents produits trouvés dans une bande d'acrylamide est de les sous-cloner. Pour cela, les bandes d'acrylamide sont réamplifiées une seconde fois par une réaction PCR dans un volume final de 40 µl. Les conditions d'amplification sont identiques à celles précédemment décrites, à ceci près que l'ADN est « engagé » dans l'acrylamide et que son volume dans la réaction d'amplification est remplacé par de l'eau stérile.

Les fragments amplifiés par PCR (40  $\mu$ l) sont repris dans un tampon (*loading buffer*) (15  $\mu$ l) composé de 60 % de glycérol, 60 mM d'EDTA (pH 8,0), 60 mM de Tris-base (pH 8,0) et 0,05 d'Orange G. La totalité du volume est ensuite analysée par électrophorèse en gel d'agarose de 1 % préparé dans un tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1 X (40 mM de Tris-base, 1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA et 0.1% d'acide acétique glacial) et contenant 1  $\mu$ g/ml de bromure d'éthidium. Les poids moléculaires des différents produits sont estimés par un marqueur de taille connue qui est déposé sur le gel en même temps que les échantillons de PCR. La migration s'opère à un voltage constant de 100 V pendant 35 min ou jusqu'à la sortie de la couleur orange du gel. Les produits amplifiés sont visualisés sous UV grâce à la fluorescence du bromure d'éthidium qui s'interpose entre les paires de bases dans l'ADN. L'exploitation des données obtenues (Figure 11) est réalisée avec le logiciel *Quantity One* sur un appareil *GelDoc* (BioRad). Bien entendu, comme les UV peuvent créer des mutations inutiles dans l'ADN, le temps d'exposition aux UV doit être le plus court possible.

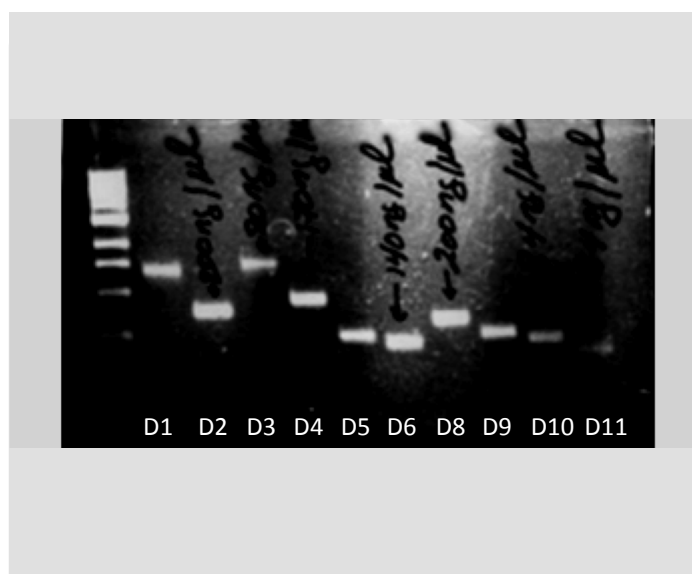


**Figure 11** Les produits obtenus par la réaction de PCR ont été séparés sur gel d'agarose de 1%.

Chaque bande présentée (D1-D10) correspond à une bande isolée du grand gel d'acrylamide. Ces bandes, dont l'expression a disparu suite au traitement chronique des hIMAEC avec le NAC, sont seulement présentes dans les CE sénescents.

Les bandes d'agarose sont ensuite extraites du gel d'agarose, coupées sous la lumière UV et purifiées à l'aide d'une colonne de purification *QIAquick PCR purification kit* (Qiagen) selon le protocole proposé par le fournisseur. Brièvement, la bande d'agarose est pesée (en mg) et y sont rajoutés 3 X le volume en tampon QG du kit. Pour faire dissoudre l'agarose, le mélange est incubé 15 min à 50°C et fréquemment inversé. Sur ce mélange, 1 X volume d'isopropanol est rajouté afin de précipiter l'ADN. L'échantillon est passé sur la colonne du kit (*QIAquick column*) et le filtrat est jeté. La colonne est ensuite lavée avec 500 µl du même tampon QG et incubée 15 min à température pièce avec 750 µl du tampon PE du kit (supplémenté avec 4 X volume d'éthanol). Le filtrat est jeté et la colonne est séchée en centrifugeant 3 min à la vitesse maximale. Par la suite, la colonne est éluée avec 70 µl du tampon d'éluion. La quantité

d'ADN (en ng) qui se trouve dans 1/20 du volume (3,5  $\mu$ l) du produit de purification est estimée sur un gel d'agarose (1%) en fonction de son intensité de fluorescence par rapport au marqueur de masses et tailles connues (Figure 12).



**Figure 12** Estimation sur un gel d'agarose (1%) de la concentration d'ADN obtenue suite à l'étape de purification.

### 3.1.2.3. Ligation de l'ADN dans le vecteur pCRII

La ligation est la création de liaisons entre les extrémités de l'ADN et les extrémités d'un vecteur d'expression linéarisé, dans le but d'insérer un ADN à l'intérieur de ce vecteur et de permettre son expression dans des bactéries.

Le vecteur de clonage et d'expression que nous avons utilisé est le vecteur pCRII. Ce vecteur contient, en aval du promoteur à inductibilité maintenue (SP6), un *polylinker* contenant des sites d'insertions. Il contient aussi un gène de résistance à la néomycine et un autre à la kanamycine (une carte de restriction du vecteur est schématisée dans la Figure 13). L'ajout de l'un de ces antibiotiques dans le milieu de culture bactérien permet de sélectionner les bactéries transformées. De plus, le vecteur contient un opéron

lactose "Lac Z" qui code pour l'enzyme  $\beta$ -galactosidase et qui convertit le X-Gal (galactose) en substrat de couleur bleue. Le clonage de l'insert au milieu du gène LacZ empêche son expression, la colonie reste donc blanche. Ceci représente une étape additionnelle de sélection des colonies contenant l'insert d'intérêt.

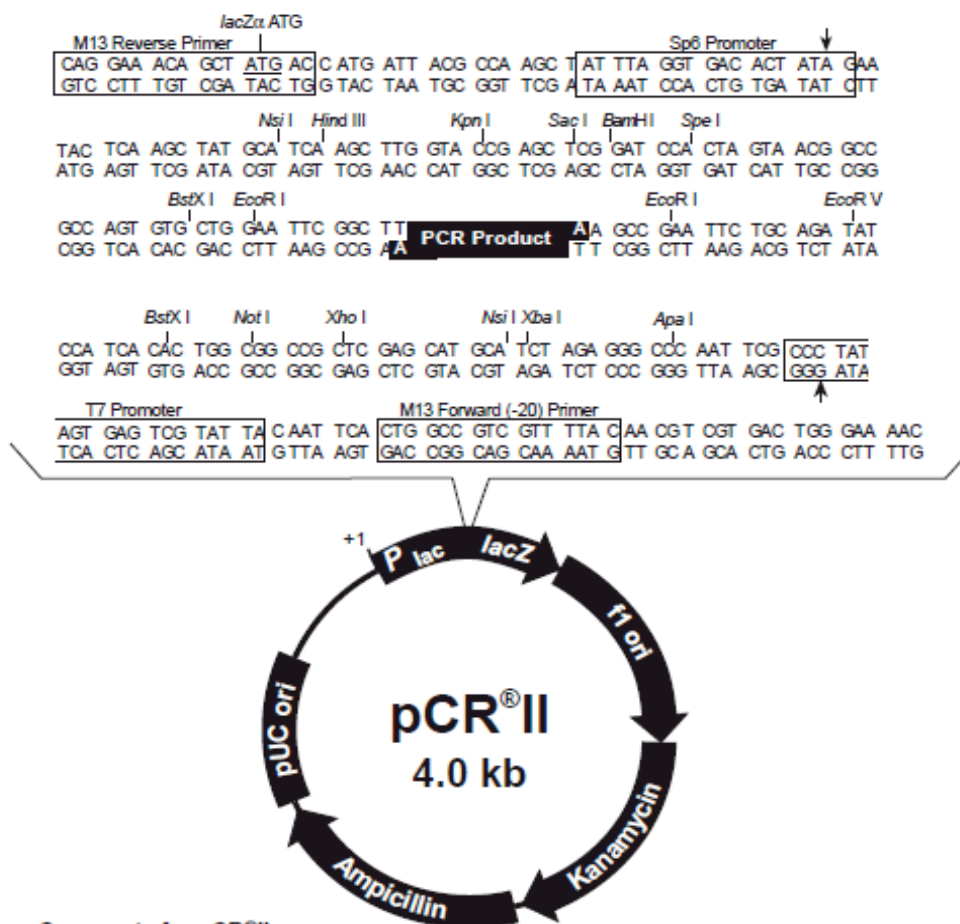
Pour favoriser la réassociation entre l'insert et le vecteur, il est crucial de respecter un rapport de quantité moléculaire entre les deux produits, en d'autres mots, la quantité d'ADN à lier (l'insert) doit être en excès par rapport aux molécules de vecteur linéarisé. Cependant, un large excès d'insert peut diminuer l'efficacité de la ligation. Pour cela, une estimation des quantités optimales à utiliser est nécessaire et possible grâce à la formule suivante :

$$M_{ng} \text{ PCR} = [(T_{pb} \text{ PCR}) \times (M_{ng} \text{ Vect})] / T_{pb} \text{ Vect}$$

où  $M_{ng} \text{ PCR}$  est la masse en ng du produit PCR estimée précédemment,  $T_{pb} \text{ PCR}$  la taille en paires de bases du produit PCR,  $M_{ng} \text{ Vect}$  la quantité en ng du vecteur nécessaire pour la réaction et  $T_{pb} \text{ Vect}$  la taille en paires de bases du vecteur linéaire.

Un rapport de 1 à 5 est un bon départ pour effectuer la réaction de ligation.





Comments for pCR®II  
3971 nucleotides

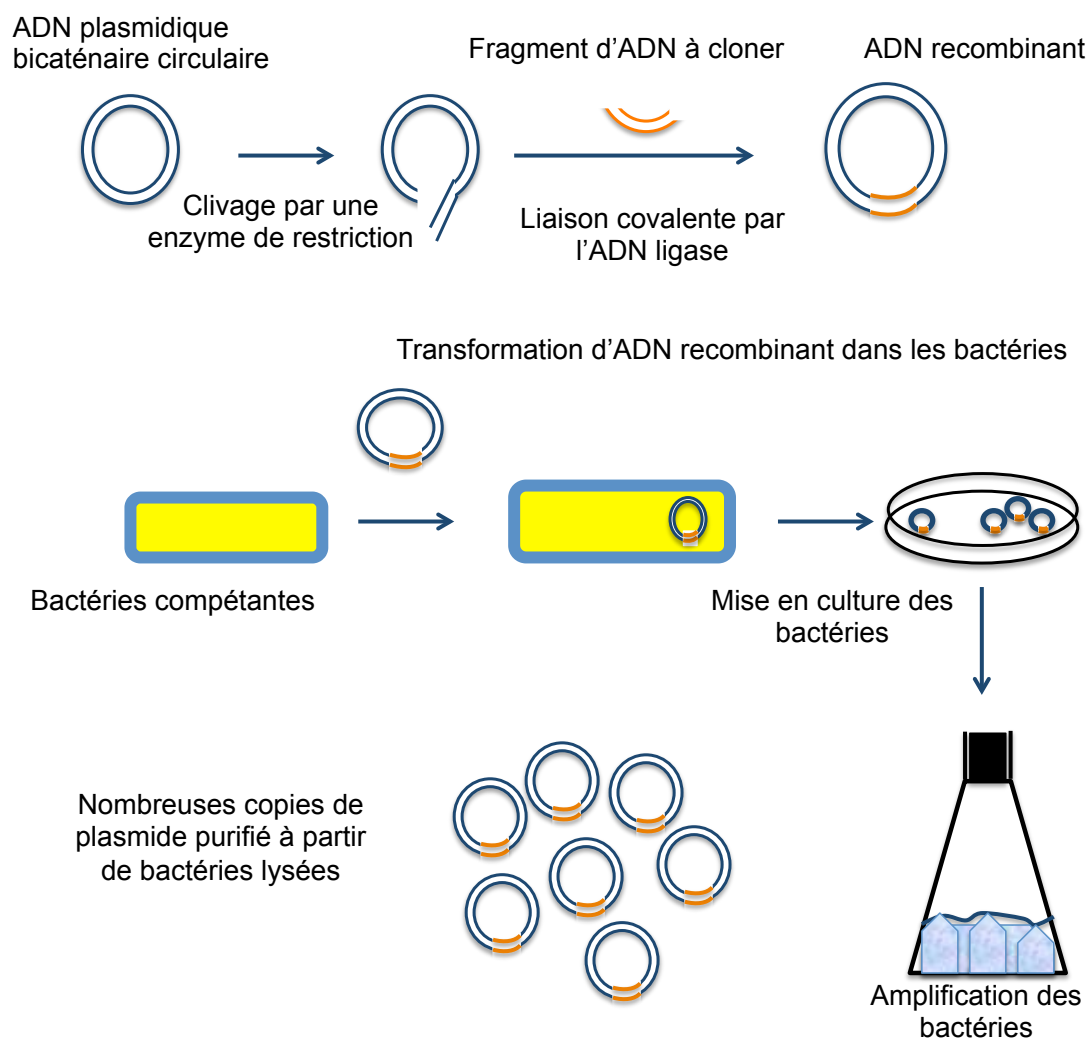
LacZ $\alpha$  gene: bases 1-587  
M13 Reverse priming site: bases 205-221  
Sp6 promoter: bases 239-256  
Multiple Cloning Site: bases 269-381  
T7 promoter: bases 404-423  
M13 (-20) Forward priming site: bases 431-446  
f1 origin: bases 588-1025  
Kanamycin resistance ORF: bases 1359-2153  
Ampicillin resistance ORF: bases 2171-3031  
pUC origin: bases 3176-3849

**Figure 13** Carte de restriction du vecteur pCRII.

La carte représente les sites de coupure qui se trouvent à l'intérieur du gène codant pour la protéine LacZ et les gènes qui codent pour la résistance aux antibiotiques ampicilline et kanamycine.

(Tiré du site internet [http://ymbc.ym.edu.tw/est/pcr\\_ii\\_map.pdf](http://ymbc.ym.edu.tw/est/pcr_ii_map.pdf)).

Dans notre expérience, l'ADN purifié a été inséré dans le vecteur linéaire pCRII entre le site *EcoRI* et le site du *polylinker*. Pour ce faire, 1  $\mu\text{l}$  du produit PCR est combiné à 2  $\mu\text{l}$  du vecteur pCRII, 1  $\mu\text{l}$  de l'ADN ligase du phage T4, 1  $\mu\text{l}$  de son tampon spécifique et le volume de la réaction est ramené à 10  $\mu\text{l}$  avec de l'eau stérile. La réaction de ligation se déroule toute la nuit à 14°C. À la fin de cette étape de ligation, le produit obtenu est un ADN circulaire qui pénètre facilement à l'intérieur des bactéries compétentes et qui contient l'insert d'intérêt (Figure 14).



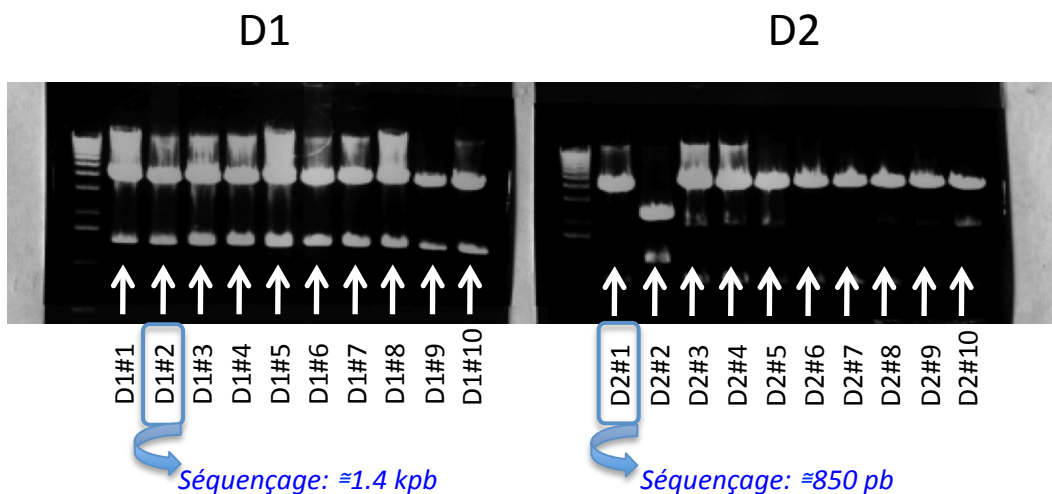
**Figure 14** Présentation schématique des étapes de clonage et de la transformation bactérienne.

### 3.1.2.4. Transformation du pCR II dans les bactéries

Pour amplifier le vecteur d'expression, nous avons utilisé comme système hôte, une souche de bactéries *Escherichia coli* dépourvues des enzymes de restriction, les bactéries compétentes DH-5 $\alpha$ . La transformation du vecteur plasmidique dans ces bactéries est réalisée par choc thermique. Puis, les bactéries sont mises en culture pour former des colonies. Chaque colonie correspond à un ensemble de bactéries identiques provenant de la même bactérie à l'origine. L'ADN amplifié de cette façon est isolé et identifié par séquençage.

Pour ce faire, 50  $\mu$ l de bactéries DH-5 $\alpha$  sont mises 15 min sur la glace, y sont rajoutés 2  $\mu$ l du produit de ligation et le mélange est incubé 30 min sur glace. Cette étape a pour but d'absorber l'ADN exogène sur la paroi de la bactérie grâce à la présence des récepteurs qui lient l'ADN. Ce dernier s'incorpore dans la bactérie suite à un choc thermique, en incubant le mélange (bactérie + ADN) 45 sec à 42°C, suivi par deux minutes sur la glace. Deux cent cinquante  $\mu$ l du milieu *Super Optimal Broth C* (SOC) (20 g/l de Bacto-tryptone, 5 g/l de Bacto-yeast extract et 0,5 g/l de NaCl, pH 7,0) sont rajoutés au mélange et le tube est incubé pendant 1 h à 37°C sous agitation douce. Deux Pétris contenant du milieu de culture bactérien *Lysogeny broth* (LB)/Agar complété en antibiotique (10 g/l de Bacto-tryptone, 5 g/l de Bacto-yeast extract et 10 g/l de NaCl, 15 g/l d'agar, 100 $\mu$ g/ml d'ampicilline, pH 7,0) sont recouvertes d'une solution de X-Gal (20 mg/ml). Par la suite, 20 et 80 % du volume de la suspension bactérienne (après avoir été centrifugée) sont étalés sur les surfaces de ces Pétris. Après une nuit de culture, au moins 10 colonies blanches par condition (10 colonies dérivées de chaque produit PCR) sont sélectionnées pour une prochaine étape d'amplification. Les colonies choisies sont récoltées avec un cure-dent stérile et ré-amplifiées dans du milieu LB supplémenté en ampicilline (15 ml/colonie) toute la nuit à 37°C sous une agitation rigoureuse. Le milieu de culture est centrifugé 30 min à 3000 tours/minute et l'ADN plasmidique est extrait des bactéries avec le kit *QIAprep Miniprep* (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur. L'ADN circulaire (le vecteur) est élué dans un volume de 60  $\mu$ l du tampon d'éluion.

Dans le but de sélectionner les vecteurs qui contiennent l'insert et exclure le cas où le vecteur a été fermé sur lui-même sans insérer l'ADN, nous avons vérifié la présence de l'insert en digérant le vecteur obtenu avec la même enzyme choisie pour créer les sites de ligation (section 3.1.2.3). Dans notre expérience, le vecteur pCRII est linéarisé avec l'enzyme EcoRI qui ne coupe pas à un autre site dans le vecteur. Pour ce faire, une digestion avec EcoRI est effectuée. Cette étape est réalisée en ajoutant 3  $\mu$ l de l'ADN extrait avec le kit à 1  $\mu$ l du tampon d'EcoRI, 1  $\mu$ l de l'albumine de sérum bovin (BSA) (1 mg/ml), 0,75  $\mu$ l de l'enzyme EcoRI et 4,25  $\mu$ l d'eau stérile (pour avoir un volume final de 10  $\mu$ l). La réaction se déroule pendant 2 h à 37°C. Ensuite, 3  $\mu$ l du tampon de chargement sont rajoutés au produit de la digestion (pour un total de 13  $\mu$ l) et chargés sur un gel d'agarose de 1 % en présence d'un marqueur de poids moléculaires (Figure 15).

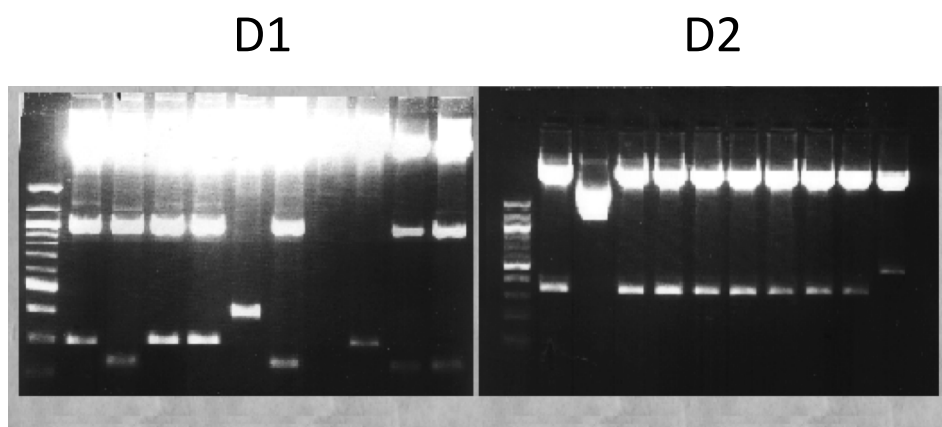


**Figure 15** ADN plasmidiques isolés des colonies et digérés avec l'enzyme EcoRI. Les gels représentent les colonies (dix) isolées à partir de la bande d'acrylamide D1 et D2, à titre d'exemple.

Une bande récupérée suite à la technique de *Differential Display* donne dix inserts qui peuvent ne pas être identiques. La Figure 15 montre un exemple de deux bandes obtenues par *Differential Display* (D1 et D2). Les résultats de la ligation montrent que la bande D1 (~1.4 kb) produit dix inserts avec des poids moléculaires identiques, ce qui augmente la probabilité d'avoir un produit unique dans les dix vecteurs. Au contraire, la bande D2 (~850 pb) donne des inserts de poids moléculaires différents. Nous avons sélectionné quelques bandes (2 à 3 possibilités par bande d'acrylamide) pour les faire séquencer à l'université Laval (service de séquençage). Une fois la séquence nucléotidique obtenue, une recherche par *Blast* a été effectuée en comparant la séquence identifiée à celles qui se trouvent dans la base de données.

Le programme de *Blast* est disponible sur le site du *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Puisqu'il est impossible de séquencer tous les produits obtenus (10 bandes d'acrylamide X 10 inserts par bande = 100 produits) et que le seul critère considéré pour séquencer certains produits était une différence au niveau de leur poids moléculaire (ce qui ne suffit pas pour donner de l'intérêt à un produit plus qu'à un autre), il a aussi été nécessaire de valider que les produits de même poids moléculaire étaient identiques. Pour cela, tous les vecteurs (10 par bande d'acrylamide) ont été digérés avec des enzymes de restriction spécifiques selon le séquençage obtenu. La recherche des enzymes qui digèrent spécifiquement l'insert obtenu est effectuée à l'aide du logiciel *Clone Manager*. L'analyse de la séquence obtenue pour la bande D1 montre qu'elle peut être coupée par l'enzyme *HindIII* à deux sites en générant des produits à 4131 + 628 pb ou à 4485 + 274 pb. La bande D2, elle, peut être coupée avec l'enzyme *BamHI* en donnant les produits suivants : 4365 + 324 pb ou 4217 + 472 pb. La Figure 16 montre les produits de la bande D1 coupés avec l'enzyme de restriction *HindIII* et les produits de la bande D2 coupés avec *BamHI*. Il est clair que la bande D1 révèle des produits différents (le produit du puit # 7 ne se coupe pas avec l'enzyme *BamHI*, il est donc à séquencer), alors que la bande D2 révèle les produits attendus. Tous les vecteurs qui digèrent différemment avec les enzymes de restriction ont été séquencés.



**Figure 16** ADN plasmidiques isolés des colonies et digérés avec les enzymes de restriction spécifiques.

Les ADN des dix colonies de la bande D1 ont été digérés avec l'enzyme HindIII alors que ceux de la bande D2 ont été digérés avec BamHI. Les produits de la digestion ont migré sur un gel d'agarose de 1 %.

Une fois l'analyse par le programme *Blast* effectuée sur tous les produits obtenus, nous avons identifié une vingtaine de protéines dont l'expression est réprimée avec le traitement au NAC. Une liste de tous les gènes identifiés par *Differential Display-PCR* est résumée dans le Tableau VI (section Résultats 3.1.3.); l'Angptl2 est l'une de ces protéines.

### 3.1.2.5. Quantification de l'expression génique par PCR en temps réel (QPCR)

La technique de PCR est utilisée pour détecter le niveau d'ARN ou d'ADN dans un échantillon. Théoriquement, la quantité de l'amplicon est doublée après chaque cycle de PCR, mais en pratique cette relation n'est pas linéaire et elle est limitée par plusieurs paramètres tels que l'efficacité de l'enzyme qui diminue avec le changement de la température, la disponibilité des matériaux dans la réaction et la compétition entre la renaturation des amplicons et l'hybridation des amorces. Le développement de la technique PCR en temps réel (QPCR) a éliminé les variations liées à la réaction de PCR conventionnelle (semi-quantitative), car la technique de QPCR permet de suivre la progression de la réaction à chaque cycle et de faire la quantification dans la phase linéaire où le taux d'amplification est reproductible. Pour cette réaction, il faut utiliser un émetteur fluorescent (*SYBR Green*) qui se fixe aux molécules d'ADN double brin et c'est l'augmentation du signal d'émission qui indique la progression du processus d'amplification de l'ADN.

#### 3.1.2.5.1. Production du brin d'ADN complémentaire

Nous avons quantifié le niveau d'expression du gène de l'Angptl2 dans le but de confirmer sa répression observée par *Differential Display* dans les hIMAEC traitées avec le NAC. Pour ce faire, il est nécessaire de mettre au point les conditions d'amplification du point de vue de la spécificité et concentration des amorces, de la linéarité de la réaction et de la température optimale de la réaction d'amplification. Nous avons choisi les amorces (Tableau IV) à l'aide du programme *Clone Manager* en respectant les critères de sélection: les amorces doivent se situer dans deux exons différents séparés par un intron de grande taille. La spécificité des amorces a été vérifiée par le programme *Blast* et confirmée par la présence d'un simple produit dans la réaction d'amplification ainsi que par séquençage. La linéarité de la réaction a été confirmée à l'aide d'une courbe standard de concentrations croissantes d'ADNc (de 0.1

à 50 ng) et de différentes concentrations des amorces. Une efficacité située entre 95 et 110 % est nécessaire lorsqu'on utilise une concentration optimale d'amorces.

**Tableau IV** Séquence des amorces utilisées en QPCR

Gènes	La séquence des amorces sens	La séquence des amorces antisens
hAngptl2	TGAAGCCGGAGAACACCAAC	CAGCCAGTATTCGCCGTCAA
GAPDH	TGAAGGTCGGAGTCAACGGA	CATTGATGACAAGCTTCCCG

La copie d'ADNc de l'ARN est obtenue par la réaction de transcription inverse décrite précédemment en utilisant 500 ng d'ARN total. Pour effectuer la réaction d'amplification par QPCR, 10 ng de chaque échantillon d'ADNc (à l'exception du gène GAPDH qui est utilisé à 1 ng) sont dilués dans 10 µl d'eau, mélangés avec 2 µl des amorces sens et antisens (concentration déterminée par la courbe standard), 12,5 µl de *SYBR Green* PCR master mix et 0,5 µl de ROX pour un volume total de 25 µl. Chaque échantillon est amplifié en duplicata. Comme contrôle négatif, pour chaque paire d'amorces, une réaction avec de l'eau est effectuée. Les réactions de différents échantillons sont amplifiées sur une plaque à 96 puits, dans l'appareil de MxPro 3005P selon le protocole suivant : 10 min à 95°C, 40 cycles de : 30 sec à 95°C, 1 min à 60°C (la température optimale a été choisie par la courbe standard) et 1 min à 72°C et un cycle additionnel (la courbe de dissociation) de 1 min à 95°C, 30 sec à 55°C et 30 sec à 95°C. Ce dernier cycle sert à valider la présence d'un produit unique à la fin de la réaction d'amplification.

Pour l'analyse des résultats, le GAPDH est utilisé pour contrôler la quantité d'ADNc amplifiée; ainsi une normalisation par rapport à sa quantité permet d'éviter toute faute engendrée par l'estimation erronée de la concentration d'ARN. Pour chaque expérience (plaque), un échantillon calibrateur a été sélectionné afin de comparer l'expression génique de tous les échantillons par rapport à celui-ci.

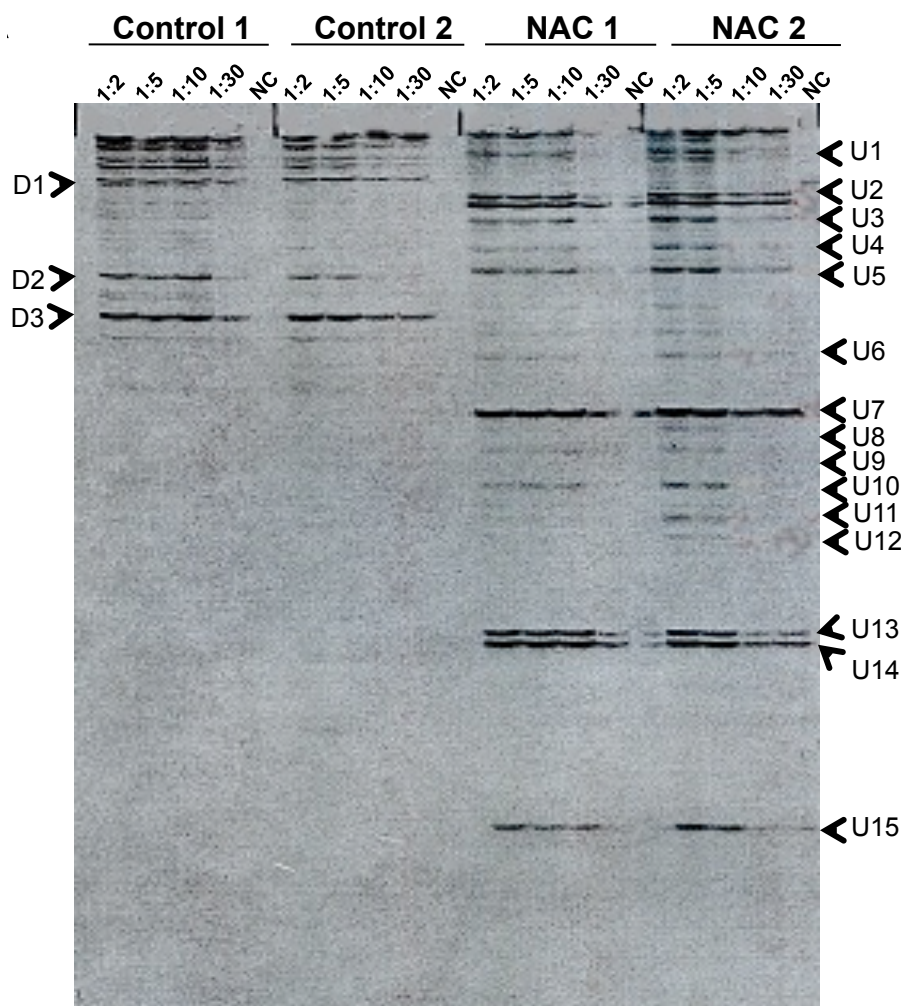


### 3.1.3. Résultats

#### *a) Effet d'un traitement chronique au NAC sur le profil d'expression génique des hIMAEC*

Les deux populations de cellules à comparer étaient 1) des hIMAEC sénescents ayant atteint la limite de leurs capacités répliquatives (cellules contrôles, n=2 donneurs) et 2) les mêmes hIMAEC provenant des mêmes donneurs, traitées avec le NAC et toujours répliquatives, avec un niveau de sénescence minimal (cellules NAC, n=2).

L'analyse par autoradiographie des fragments nucléotidiques amplifiés par PCR et séparés sur un gel dénaturant d'acrylamide, démontre clairement qu'un traitement chronique avec le NAC résulte en un changement fondamental de l'expression de la majorité des gènes présents dans la cellule (Figure 17). Nous nous sommes concentrés sur les gènes réprimés (D1-D11) ou surexprimés (U1-U15) en présence du NAC, afin d'être isolés et identifiés par clonage moléculaire.



**Figure 17** Profil des variations géniques observées par *Differential Display* dans des hMAEC sénescents (Contrôle) ou traitées avec le NAC et non sénescents (NAC).

L'ARNm a été extrait de deux échantillons de hMAEC traitées (NAC 1 et NAC 2) ou pas (Contrôle 1 et Contrôle 2) avec le NAC, converti en cDNA par une réaction de transcription inverse (RT) et chaque cDNA a été amplifié à quatre différentes dilutions (1:2, 1:5, 1:10 et 1:30). La spécificité des produits obtenus a été confirmée avec une réaction de RT en absence du MMLV (Contrôle Négatif, NC). Les produits de PCR ont été séparés selon des critères de taille sur un gel de polyacrylamide dénaturant de 4%. Sur la figure, les flèches représentent des exemples de gènes dont l'expression a été régulée à la hausse (U1-U15) ou à la baisse (D1-D4) suite au traitement avec le NAC.

Notons qu'à cette étape de l'expérience, nous ne pouvons pas indiquer la bande correspondant au gène de l'Angptl2 parce qu'une bande sur le gel d'acrylamide ne correspond pas nécessairement à un seul gène. De plus, l'amplicon obtenu suite à cette étape de la technique de *Differential Display* ne reflète pas la taille réelle du gène en question.

***b) Identification des différents gènes dont l'expression disparaît en présence du NAC***

Nous avons optimisé des techniques de clonage moléculaire qui ont été appliquées sur les 11 fragments nucléotidiques réprimés en présence de NAC (D1-D11) extraits du gel. Le Tableau V regroupe l'identification ainsi que le numéro de locus de chacun des gènes, selon les analyses réalisées avec le programme de comparaison des séquences *Blast* et le site de NCBI disponible sur le site du *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Étant donné que plusieurs gènes peuvent donner naissance à des amplicons de tailles apparemment égales sur le gel d'acrylamide, il est tout à fait possible d'identifier plusieurs produits à partir de la même bande originale d'acrylamide. De ce fait, nous avons identifié 21 gènes réprimés par le NAC (voir Tableau V) à partir des 11 bandes coupées d'acrylamide. Parmi les gènes réprimés en présence du NAC figure l'Angpl2.

**Tableau V** Différents gènes identifiés par *Differential Display* dont l'expression est réprimée par le NAC dans les hMAEC.

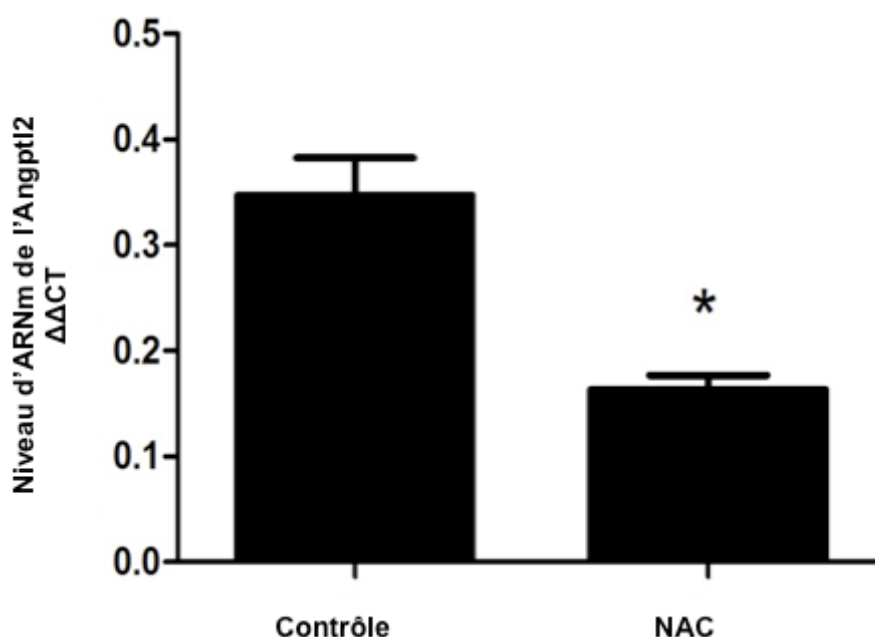
Clone		Définition
Clone D1-2		Homo sapiens calpastatin, mRNA
Clone D1-7 I		Homo sapiens nuclear protein localization 4 (NPL4)
Clone D2-1	Locus BC052965	Homo sapiens nucleoporin 153kDa, mRNA
clone D3	Locus BC000591	Homo sapiens apoptosis antagonizing transcription factor
Clone D3-7	Locus : HSU65785	Human 150 kDa oxygen- protein ORP150
Clone D3-9	Locus : XM_371254	Homo regulated sapiens ubiquitin specific protease 24 USP24
<b>Clone D3-10</b>	<b>Locus : NM_012098</b>	<b>Homo sapiens Angiopoietin-Like-2 (Angptl-2)</b>
Clone D4-2	Locus: AF186382	<b>Homo sapiens vacuolar protein sorting 35</b>
Clone D4-6	Locus : NG_003104	Homo sapiens ZFP91 mRNA for zinc finger protein Ciliary, neurotrophic factor transcription unit (ZFP91-CNTF)
Clone D4-9	Locus : AB191263	Homo sapiens MYH9 mRNA for non-muscle myosin heavy polypeptide 9
Clones D5-1	Locus : AY358503	Homo sapiens clone DNA39987 ANKH (UNQ241) Homo sapiens ankylosis
Clone D6-1	Locus : BT006648	Homo sapiens guanine nucleotide binding protein-like
Clone D6-10	Locus BC015663	Homo sapiens serine (or cysteine) proteinase inhibitor
Clone D8-6	Locus : BC012368	Homo sapiens angiopoietin-like 2,
Clone D8-3	Locus : BC007610	Homo sapiens splicing factor 3b, subunit 2, 145kDa
Clone D8-10	Locus : NM_031420	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein L9 (MRPL9)
Clone D9-7	Locus : BC009507	Homo sapiens interferon, alpha-inducible protein
Clone D10-5	Locus :XM_114430	<b>Homo sapiens hypothetical protein LOC202051</b>
Clone D10-6	Locus : BC011761	<b>Homo sapiens ilvB (bacterial acetolactate synthase)-like</b>
<b>Clone D11-2</b>	<b>Locus : HSM807988</b>	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp451P011
Clone D11-5	Locus : AC073848	Homo sapiens BAC clone RP11-669M16 from 4, complete sequence.

Clone D : Clone identifié à partie de la bande qui disparaît (D pour disparaître) en présence du NAC ; les références des locus génomiques sont présentées selon l'identification actuelle du site du *National Center for Biotechnology Information*.

### c) Validation du résultat obtenu en *Differential Display*

Le changement relatif de l'expression du gène d'Angptl2 observé par *Differential Display* a été validé par la technique de PCR en temps réel (QPCR) sur des CE cultivées chez 17 patients supplémentaires. Cette technique nous a permis de confirmer que le

traitement avec NAC diminue significativement le niveau d'ARNm de l'Angptl2 (une baisse de 50 % , Figure 18). Ces résultats suggèrent que l'Angptl2 est fortement exprimée dans les CE sénescents dans un environnement pro-oxydant, alors qu'un antioxydant tel que le NAC prévient son expression et retarde l'apparition de la sénescence.



**Figure 18** L'expression génique de l'Angptl2 dans les hMAEC est diminuée par un traitement chronique avec le NAC

Un traitement chronique avec l'antioxydant NAC réduit l'expression de l'ARNm de l'Angptl2 dans les hMAEC. L'expression de l'ARNm de l'Angptl2 a été mesurée avec le cDNA extrait des cellules hMAEC sénescents non traitées (Contrôle) *versus* des cellules prolifératives suite au traitement avec le NAC (NAC). L'abondance de l'expression d'ARNm de l'Angptl2 a été rapportée au niveau d'ARNm du gène GAPDH. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  erreur standard à la moyenne (SEM, n = 17 pour chaque groupe), et \*:  $p < 0.05$  *versus* la condition Contrôle.

### 3.1.4. Discussion

Les techniques de *Differential Display* et de clonage moléculaire ont permis l'identification de 21 gènes réprimés dans les CE traitées chroniquement avec le NAC (Tableau V). Nous devons mentionner que le choix de ces gènes a été effectué de façon arbitraire et sans aucun critère de sélection. Les gènes identifiés codent pour des protéines impliquées dans la régulation de plusieurs processus biologiques: nous avons identifié des gènes régulateurs de la transcription (les facteurs de transcription inhibant le processus d'apoptose, le facteur de transcription neurotrophique ciliaire), des constituants de structure (la nucléoporine), des gènes ribosomiaux (la protéine ribosomale L9), des gènes impliqués dans le "trafficking" cellulaire (la calpastatine, la protéine de localisation nucléaire 4, les protéines vacuolaires 35) et le deuxième membre de la famille des angiopoïétines-like, l'Angptl2.

Nous avons précédemment démontré que le NAC ralentit l'entrée en sénescence des CE caractérisées, en début de culture, par un faible niveau de dommages cellulaires (Voghel *et al.*, 2008b). Autrement dit, les cellules qui, en début de culture, ont un bon niveau de défense antioxydante et des télomères longs, bénéficient à long terme d'un traitement au NAC en réduisant la production des ROS et en activant la télomérase, l'enzyme responsable d'allonger la séquence télomérique de l'ADN (Voghel *et al.*, 2008b). Au contraire, le NAC n'a pas empêché l'entrée en sénescence des cellules ni le raccourcissement de leurs télomères si les dommages oxydatifs en début de culture étaient irréversibles (Voghel *et al.*, 2008b). Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier l'expression génique différentielle dans la sous-population de CE qui répondaient positivement au NAC. De façon intéressante, l'antioxydant a profondément modifié le programme transcriptionnel de plusieurs gènes dans les cellules hMAEC (Figure 17 et Tableai V). Ces résultats concordent avec plusieurs analyses faites par puce à ADN (micro-arrays) qui démontrent qu'un traitement au NAC, même pour quelques heures, déclenche une profonde modification de l'expression génique au sein de la CE, modification qui est sans doute responsable de l'apparition ou de la disparition de nouvelles protéines dont la présence/absence modifie la réponse cellulaire (Zafarullah *et al.*, 2003).

Notre étude par *Differential Display* révèle que l'Angptl2 est réprimée par le NAC. Pour valider cette observation, nous avons synthétisé des amorces spécifiques à l'Angptl2 (Tableau IV) et confirmé par QPCR l'effet inhibiteur du NAC sur l'expression du gène à l'Angptl2 (Figure 18). Ces résultats démontrent que l'Angptl2 est deux fois plus exprimée dans les CE sénescents et dans un environnement pro-oxydant. En 2006 (l'année où notre étude a été réalisée), la fonction physiologique de l'Angptl2 était peu connue. Les recherches effectuées sur l'Angptl2 faisaient à l'époque état de sa fonction angiogénique (Kim *et al.*, 1999b; Kubota *et al.*, 2005a; Kubota *et al.*, 2005b), de sa fonction anti-apoptotique dépendante de la voie phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) / Akt (sérine thréonine kinase) et de son implication dans le développement vasculaire (Kubota *et al.*, 2005a), sans toutefois identifier le récepteur responsable de transmettre les signaux. Toutes ces données suggèrent que l'Angptl2 exerce un rôle clé au niveau vasculaire.

En conclusion, cette étude comparative nous a permis d'identifier des dizaines de gènes dans le génome possédant des promoteurs régulés (indirectement) par l'antioxydant NAC. L'Angptl2, fortement exprimée dans les CE sénescents, est réprimée par le NAC. Nous avons validé par QPCR qu'un traitement pharmacologique avec le NAC réduit l'expression de l'Angptl2 dans des CE prolifératives isolées chez des patients coronariens, en comparaison avec les CE sénescents issues d'un même patient. L'ensemble de nos données permet de proposer l'hypothèse selon laquelle l'Angptl2 est un facteur angiogénique induit par l'hypoxie et/ou les radicaux libres dans un contexte d'athérosclérose. Pour valider notre hypothèse, des études *in vitro* ont alors été initiées sur des CE en culture très endommagées, isolées de patients coronariens fumeurs et souffrant de maladie pulmonaire obstructive chronique (voir la section 3.2). De plus, des études *in vivo* ont été réalisées dans un modèle de souris athérosclérotique afin de vérifier l'existence d'une relation entre la synthèse d'Angptl2 et l'athérosclérose (voir section 3.4).

### **3.2. Étude 2 : Premier Article**

**(Résultats publiés)**

**Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated  
from atherosclerotic chronic smokers**



### 3.2.1. Apport original et contribution des coauteurs

Nada Farhat, Nathalie Thorin-Trescases, Guillaume Voghel, Louis Villeneuve, Maya Mamarbachi, Louis P. Perrault, Michel Carrier & Eric Thorin (2008). Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Can J Physiol Pharmacol* 86 (11): 761-169.

Ce manuscrit a été accepté pour publication dans la revue scientifique *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* le 6 novembre 2008.

**Nada Farhat et Nathalie Thorin-Trescases** : les deux auteures ont contribué de façon égale à ce travail et sont mentionnées dans l'ordre alphabétique. Ces auteures ont contribué à : la conception et design expérimental, la cueillette des données, l'analyse des données, l'interprétation des résultats, la préparation des figures, la rédaction du manuscrit et l'approbation de la version finale de manuscrit.

**Guillaume Voghel** : Conception et design expérimental, cueillette des données, analyse des données, interprétation des résultats et approbation de la version finale de manuscrit.

**Louis Villeneuve**: Cueillette des données, analyse des données et approbation de la version finale de manuscrit.

**Maya Mamarbachi**: Cueillette des données, analyse des données et approbation de la version finale de manuscrit.

**Louis P. Perrault**: Fournir les échantillons d'artères mammaires internes de patients nécessaires pour le design expérimental et approbation de la version finale de manuscrit.

**Michel Carrier:** Fournir les échantillons d'artères mammaires internes de patients nécessaires pour le design expérimental et approbation de la version finale de manuscrit.

**Eric Thorin:** Conception et design expérimental, analyse des données, interprétation des résultats, révision et correction du manuscrit et approbation de la version finale de manuscrit.

### **3.2.2. Manuscrit**

## **Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers**

Nada Farhat<sup>1</sup>, Nathalie Thorin-Trescases<sup>1</sup>, Guillaume Voghel, Louis Villeneuve,

Maya Mamarbachi, Louis P. Perrault, Michel Carrier & Eric Thorin<sup>2</sup>

Department of Surgery and Research Center, Institut de Cardiologie de Montréal,  
Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: Institut de Cardiologie de Montréal,  
Centre de recherche, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada. Tel.:  
(514) 376-3330; fax: (514) 376-1355

## Abstract

Age-associated telomere shortening leads to replicative senescence of human endothelial cells (EC). Risk factors for cardiovascular diseases (CVD) accelerate ageing, while there is a concomitant rise in oxidative stress known to promote stress-induced senescence (SIS) *in vitro*. Of all risk factors for CVD, smoking is most associated with the development of inflammation and accelerated atherosclerosis due to a prooxidant-antioxidant imbalance. We tested the hypothesis that SIS predominates in EC isolated from chronic smokers with premature atherosclerosis undergoing coronary artery bypass graft surgery (CABG). We isolated and cultured EC from segments of internal mammary arteries from smoker, former smokers and nonsmoker coronary patients. Senescence of EC was induced by serial passage and quantified by the measurement of telomere length and senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activity. Compared to non smokers, smoker patients were 10 years younger at the time of CABG, evidence of premature atherosclerosis. Cellular senescence was independent of telomere length and directly related to oxidative damage. EC exhibited higher expression levels of markers of oxidative stress (lipid peroxydation level and caveolin-1 mRNA), inflammation (angiopoietin-like 2 mRNA), hypoxia (vascular endothelial growth factor (VEGF)-A mRNA) and cell damage (p53 mRNA). In conclusion, a high oxidative stress environment in EC isolated from atherosclerotic chronic smokers predisposes to SIS rather than replicative senescence.

**Key words:** smoking, atherosclerosis, oxidative stress, caveolin-1, stress-induced senescence, telomere, replicative senescence.

## Introduction

Free radical-dependent cellular damage remains the basis of the theory of ageing (Harman, 1956). Thus, any risk factor for cardiovascular disease (CVD) that magnifies the age-associated rise in free radical production by would accelerate the ageing process. At the cellular level, ageing leads to senescence (Ben-Porath *et al.*, 2005; Ben-Porath *et al.*, 2004a). We previously proposed that in cultured endothelial cells (EC) isolated from coronary patients, there was an interplay between the two major pathways of senescence (Voghel *et al.*, 2007) -replicative senescence, due to telomere shortening following cell divisions, and stress-induced senescence (SIS)- which together contributed to the premature senescence of diseased EC. The duration of exposure to risk factor for CVD, rather than the biological age of the donor, predicted the onset of senescence (Voghel *et al.*, 2007). We also reported that in EC from coronary patients, oxidative stress was a major contributor of stress-induced senescence, as a chronic antioxidant treatment could temporally delay the onset of senescence (Voghel *et al.*, 2008a).

Of all of the risk factors, smoking is the one that produces the most free radicals, both acutely and chronically (Nicita-Mauro *et al.*, 2008). Cessation of smoking (Kondo *et al.*, 2004); (Wannamethee *et al.*, 2005) and antioxidant therapy (Heitzer *et al.*, 1996) improve endothelial function in smokers, suggesting a role for increased levels of oxygen-derived free radicals (Barua *et al.*, 2003). In coronary artery disease, cigarette smoking causes injury to the vascular endothelium by direct cytotoxicity, leading to premature endothelial dysfunction (Blann *et al.*, 1993); (Ambrose *et al.*, 2004 ). Premature inflammation, atherosclerosis and cardiovascular death are also reported in smokers (Nicita-Mauro *et al.*, 2008). We therefore hypothesized that *in vivo* chronic exposure to tobacco, which contains mitogenic, carcinogenic and oxidative molecules, predominantly lead, *in vitro*, to SIS of human vascular EC. We found that among patients with severe coronary artery disease, chronic smokers patients underwent coronary artery bypass graft surgery (CABG) 10 years earlier than nonsmokers. In addition, EC isolated from coronary smokers displayed, early in culture, unique markers of oxidative stress and cell damage that in turn, predisposed EC to oxidative stress-dependent senescence, rather than to telomere-dependent senescence.

## Materials and Methods

### Clinical profile of the donors

Segments of human distal internal mammary arteries (IMA) that were discarded during CABG (n=86) were harvested with low electrocautery energy and excised with cold scissors. Collection of the samples was blind. Appropriate standards for human experimentation were followed, the study was reviewed and approved by our institution's ethics review committee and the patients gave informed consent.

According to notes in their clinical file, donors were divided into active smokers (n=26), former smokers (n=40) and nonsmokers (n=20). Information on cigarette consumption (packages smoked per year) was not available, among the patients, 27% (7/26) had chronic obstructive pulmonary disease (COPD). The group of former smokers was heterogeneous since the duration of smoking cessation ranged from 0.1 to 30 years (average of  $13.5 \pm 1.9$  years); among them 22.5% (9/40) suffered from COPD. Only one patient had COPD.

### Culture of EC

Endothelial cells were isolated from human internal mammary arteries, cultured and characterized as previously described elsewhere (Voghel *et al.*, 2007). Cells were incubated in Dubelcco's modified Eagle medium supplemented with 10% foetal bovine serum, 10% calf serum, 1% penicillin-streptomycin, 90  $\mu\text{g/ml}$  sodium heparin salt (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri, MO, USA), 60  $\mu\text{g/ml}$  EC growth supplement (Becton Dickinson, Mississauga, ON, Canada), and 100 U/ml fungizone (Gibco, Burlington, ON, Canada), at 37°C in a 95% air/5% CO<sub>2</sub> incubator. EC were serially passaged until senescence was reached. For some experiments (oxidative stress, intrinsic antioxidant capacities estimation, initial gene expression, initial telomere length) passage 2 was used.

Cells were collected for senescence-associated b-galactosidase staining (SA-b-Gal, (Dimri *et al.*, 1995; Voghel *et al.*, 2007), for DNA (Southern blotting), and RNA (real-time reverse transcript polymerase chain reaction, RT-PCR), for reactive oxygen species

(ROS) measurement; some cells were plated on coverslips for immunostaining. Before replating, cells were counted and the population doubling level (PDL) was calculated.

#### Telomere length measurement

Cells were grown in 75 cm<sup>2</sup> flasks at early (passage 2) and subsequent passages until replicative senescence was reached. DNA extraction was performed with a phenol/chloroform/isoamyl alcohol technique, precipitated using ethanol 95% and dissolved in Tris-HCl (10 mM, pH 8.6). Restriction fragments length (RFL) were quantified using a Southern blot technique (Voghel *et al.*, 2007).

#### **Real-time RT-PCR**

Total RNA (EC at passage 2) was isolated using RNeasy kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) and was reverse-transcribed into first-strand complementary DNA by MMLV reverse transcriptase, using random hexamer primers designed by Primer Express (version 2.0). Real-time PCR was carried out on diluted RT products using the DNA-binding dye SYBR Green I to detect PCR products (Mx3005P system, Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instruction. Serial dilutions (100ng to 1pg) of total RNA isolated from commercially available human aortic EC (Cambrex, Walkersville, MD, USA) were used as standard (Table 1). The mRNA level in each sample was calculated relative to GAPDH. PCR was performed at 95°C for 10 minutes, and then for 40 cycles at 95°C for 30 seconds and 55°C for 1 minute and 72°C for 30 seconds. A final dissociation cycle was done at 95°C for 1 minute, 55°C for 30 seconds and 95°C for 30 seconds.

The following primers designed by primer express (Version 2.0) were used in order to quantify gene expression of caveolin-1, ATM, angiopoietin-like 2 (ANGPTL2), VEGF-A, p53 and GAPDH:

**Table 1.** Sequence of primers (5'→3') used in qRT-PCR.

Primers	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Caveolin-1</i>	GCTGAGCGAGAAGCAAGTGT	TGGTGAAGCTGGCCTTCCAA
<i>ATM</i>	GGCAGCTGATATTCGGAGGA	CATCTTGGTCACGACGATAC
<i>ANGPTL2</i>	<i>GCAATGCGGGTGACTCCTT</i>	<i>TACCAGGACGGAGTCTA</i>
<i>VEGF-A</i>	<i>GAGGGCAGAATCATCACGAA</i>	<i>AGGAGTCCAACATCACCATG</i>
<i>p53</i>	<i>TGAGGTTGGCTCTGACTGTA</i>	<i>TTCTCTTCCTCTGTGCGCCG</i>
<i>GAPDH</i>	<i>TGAAGGTCGGAGTCAACGGA</i>	<i>CATTGATGACAAGCTTCCCG</i>

### Immunofluorescence

Immunostaining was used (EC at passage 2) to assess the expression and sub-cellular localization of 4-hydroxy-nonenal (HNE) (rabbit polyclonal anti-HNE, 1:200, Alpha Diagnostics, San Antonio, Texas, USA), a marker of lipid peroxidation. DNA counterstaining was performed by incubating EC with TOPRO-3 (2 $\mu$ M; Molecular Probe, Burlington, ON, Canada). Negative controls were performed by omitting the primary antibodies during the protocol. Cells were visualized using a confocal microscope (Zeiss LSM 510 confocal microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Semi-quantitative analysis was performed by measuring the average total fluorescence intensity from 4-5 different pictures from the same coverslip (Voghel *et al.*, 2008a). Values are expressed in arbitrary units (a.u.) of fluorescence corrected by the number of cells.

### Intrinsic antioxidant capacities estimation

5-(and -6) – chloromethyl - 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) was used as a non-specific marker of reactive oxygen species. Living EC (passage 2) were loaded with 5 $\mu$ M of CM- H<sub>2</sub>DCFDA (in physiological salt solution) for 30 min at 37°C, washed and let recover for 10-15 min at 37 °C. The fluorescence was then observed at 488 nm under a confocal microscope. Negative control consisted in unstained cells (autofluorescence). Human internal mammary artery EC used in this study displayed an unstable basal level of CM-H<sub>2</sub>DCFDA-fluorescence, a level that significantly increased over time (Figure



4A and B). This is not observed in healthy cells, such as porcine or murine aortic endothelial cells, unless they are exposed to a superoxide dismutase inhibitor (data not shown), suggesting that EC isolated from coronary patients are more prone to produce ROS. Thus, we adapted the protocol that usually only consists in measuring the intensity of ROS-fluorescence: EC were exposed to the laser light (time series at 488 nm) until stabilization of the fluorescent signal. Cells in a different field were then exposed to 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in order to get maximal oxidative activity, and the fluorescent signal was recorded until saturation. Identical parameters were used for experiments with EC from different donors (objective 63x1.4 plan-Apochromat oil, laser Argon 488 nm, 0.1% transmission; dichroic mirror HFT 488 with filter LP505, pinhole size 1.7 Airy unit). The frame size of the images was 512x300 pixels and the scan speed was 2.56  $\mu\text{sec}/\text{pixel}$ . The time needed to reach 50% of saturation in both control and  $\text{H}_2\text{O}_2$  stimulated cells, was calculated with LSM 510 software. The maximal fluorescence intensity in both control and  $\text{H}_2\text{O}_2$  stimulated cells was also measured. The parameters  $\Delta\text{time } 50\%_{(\text{control}-\text{H}_2\text{O}_2)}$  and  $\Delta\text{fluorescence } \text{max}_{(\text{H}_2\text{O}_2\text{-control})}$  reflect the total intrinsic antioxidant capacities of the cells: the shorter  $\Delta\text{time}$  and/or the smaller  $\Delta\text{fluorescence}$ , the lower the resistance against oxidative stimuli, the lower the antioxidant defenses.

### **Statistical analysis of the data**

Continuous data are presented as mean $\pm$ SEM, with n indicating the number of patients. Appropriate univariate analysis (t-test or ANOVA with Fisher's post hoc test) was used (Statview 4.5). A  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Patient characteristics

The clinical parameters were evenly distributed between patients except for the age of the donor: smokers ( $56 \pm 2$  years of age) underwent CABG surgery 10 years before ( $p < 0.05$ ) nonsmokers ( $67 \pm 2$  years of age) or former smokers ( $66 \pm 2$  years of age, Table 2).

### Telomere-dependent replicative senescence

Initial telomere length was similar between groups ( $8.9 \pm 0.4$  kbp,  $9.3 \pm 0.3$  kbp and  $9.0 \pm 0.2$  kbp, in EC from nonsmokers, former smokers and active smokers, respectively). However, the telomere shortening rate (the difference between telomere length measured at senescence and the measured initially, corrected by the cumulative replicative potential,  $\Delta\text{RFL} / \sum\text{PDL}$ ) was significantly reduced in EC from smokers, compared with nonsmokers ( $p = 0.009$ ) or former smokers ( $p = 0.0204$ ) (Fig. 1A). We previously reported that the onset of replicative senescence could be predicted by initial telomere length (Voghel *et al.*, 2007). Accordingly, although short initial RFL predicted the development of early senescence in cultured EC isolated from nonsmokers ( $p = 0.04$ ) (Fig. 1B) or from former smokers ( $p = 0.0042$ , data not shown), initial RFL measured in EC from smokers (Fig. 1C) did not correlate with the propensity to develop senescence ( $p = 0.47$ ). Altogether, these results are suggestive of a minor role for replicative senescence in EC from smokers.

### Senescence profile

Serial passage induced senescence in EC, whether or not the donor was smoking. Senescence, however, appeared slightly later in EC from smokers than from nonsmokers (Fig. 2): the time needed to reach 50% of senescence was 17 days longer in EC from smokers ( $p = 0.03$ ). PDL reached at 50% of senescence was also higher in smokers ( $p = 0.03$ ) (Fig. 2), suggesting a slightly higher replicative potential. The senescence profile of EC from former smokers was intermediate (Fig. 2), suggesting some normalization towards a nonsmoker phenotype.

### **Initial EC biomarkers of oxidative stress**

Oxidative stress and free radical production were evaluated early in culture – that is, at passage 2 (cumulative PDL =  $4.5 \pm 1.4$ ; SA- $\beta$ -Gal positive cells =  $5.1 \pm 0.8\%$ ,  $n=46$ ) - to reflect the *in vivo* situation rather than the effect of cell culture.

Initial levels of HNE, a marker of lipid peroxidation, were significantly higher in EC from smokers than from nonsmokers or former smokers (Fig. 3).

In EC from coronary patients, whether smokers or nonsmokers, the level of CM-H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence increased over time (Figure 4A and B), most likely because of strong generation of ROS by the cells and concomitant oxidation of the dye. In healthy porcine EC, the level of CM-H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence is approximately 10 500-fold lower than in human internal mammary artery EC (unpublished data). Furthermore, in healthy EC, the signal remains stable over time (data not shown). EC from smokers and nonsmokers behaved differently when exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added at a sublethal concentration. In EC from smokers, CM-H<sub>2</sub>DCFDA signal rose faster than the signal observed in the absence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulus. In contrast, EC from nonsmokers or former smokers developed a slow and weak signal in response to the laser light in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, demonstrating the endogenous ability of the cell to scavenge oxidative stress. Taken together, these data suggest that there is a significant lower antioxidant capacity in EC from smokers compared to nonsmokers.

### **Genomic EC markers of smoking**

Gene expression levels were quantified at passage 2, as described above. The initial gene expression of caveolin-1, a protein known to promote oxidative SIS (Galbiati *et al.*, 2001; Voghel *et al.*, 2008a; Voghel *et al.*, 2007), was 8 fold higher ( $p=0.03$ ) in EC from smokers (Table 3). In addition, caveolin-1 expression positively correlated with the oxidative stress marker HNE ( $p=0.001$ ,  $r=0.850$ ,  $n=10$ ; data not shown). On the other hand, initial ATM expression, a protein known to function as transducer of double-strand DNA break and telomere dysfunction (Pandita, 2002); (Herbig *et al.*, 2004), was 2-fold lower in EC from smokers ( $p=0.02$ ) or former smokers ( $p<0.05$ ). Similar data were observed at the ATM protein level (data not shown). Initial angiopoietin-like 2 (ANGPTL2) mRNA levels, a potential marker of inflammation (Sun *et al.*, 2007), were 4 times higher ( $p=0.0406$ ) in EC from smokers compared to nonsmokers (Table 3).

Similarly, initial gene levels of the angiogenic factor VEGF-A were 3 times higher ( $p=0.0005$ ) in EC from smokers (Table 3). Damage was evidenced by a 2-fold increase in gene expression of the tumour suppressor gene p53 ( $p=0.049$ ) and protein p53 (data not shown), a downstream target in EC from smokers. Cessation of smoking was associated with a reduction of caveolin-1, ANGPTL2, p53 and VEGF-A mRNA levels, but not ATM mRNA levels (Table 3).

## Discussion

The major finding of the present study is that SIS predominates in EC isolated from active smokers undergoing CABG surgery. Smoking is associated with an increased oxidative stress and a reduced antioxidant defence capacity of the cells. These results concord with the premature atherosclerosis that developed in these patients, a 10-year prematurity in coronary disease that strikingly matches the reduced life expectancy of active smokers (Doll *et al.*, 2005);(Nicita-Mauro *et al.*, 2008).

Cellular senescence, estimated by senescence-associated  $\beta$ -galactosidase, was slightly delayed in EC from smokers compared to non-smokers (Fig. 2). This small delay is likely related to the younger age of the smokers. This increase in replicative potential could be attributed to a better integrity of the mitotic clock of the cells. Although EC eventually entered senescence in both groups, the main pathway of senescence differed dramatically between groups. In smokers, replicative senescence seems minimal since i) telomere shortening was smaller (Fig. 1A), ii) ATM gene expression was lower in EC from smokers, suggesting lower molecular and telomeric instability (Table 3), and iii) initial telomere length was not correlated with the propensity to develop senescence (Fig. 1B). On the other hand, i) the massive oxidative stress and damage as evidenced by an increased level of lipid peroxidation (Fig. 3), ii) the lack of antioxidant defence mechanisms (Fig. 4) and iii) an increased caveolin-1 and p53 gene/protein expression (Table 3) in EC isolated from smokers are all factors that drive senescence through SIS. This contrasts with the work of Valdes *et al.* (Valdes *et al.*, 2005), in which telomere shortening, measured in white blood cells, was greater in smoking women. The difference in cell types is most likely responsible for this discrepancy. It is possible that an increased inflammatory phenotype promotes leukocytes mobilization, high turnover rate and thus excessive telomere attrition, but this remains speculative. We also observed no difference in nuclear or cytosolic human telomerase activity between EC from smokers or nonsmokers (data not shown), suggesting that telomere shortening is not compensated in EC from smokers by higher telomerase activity. Cessation of smoking was associated with a decrease in oxidative stress marker HNE (Fig. 3); an improvement in intrinsic antioxidant properties (Fig. 4), a decrease in caveolin-1, p53,

VEGF-A and ANGPTL2 gene expression (Table 3); and a higher telomere shortening rate (Fig. 1). Altogether, these data strongly suggest that EC from chronic smokers are predisposed to SIS, but not to telomere-dependent senescence pathways. The fact that cigarette smoke induces cellular senescence has been previously reported in alveolar epithelial cells (Tsuji *et al.*, 2006) and in fibroblasts (Nyunoya *et al.*, 2006), but SIS has not been clearly demonstrated.

The fluorescent probe CM-H<sub>2</sub>DCFDA is broadly used to nonspecifically estimate the sources of oxidative stress. While our approach to quantify the intrinsic antioxidant capacities does not provide a descriptive assessment of sources of antioxidant defences, it globally estimates the capacities of EC to react against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulus. This lack of antioxidant defence is in line with our finding that caveolin-1 gene expression was significantly increased in EC from smokers and positively correlated with HNE levels. The level of caveolin-1 is strictly regulated to maintain cellular integrity, leading to cellular transformation if depleted and to a phenotype of premature senescence if overexpressed (Cho *et al.*, 2005); (Galbiati *et al.*, 2001). Our data, therefore, strongly support the concept of the presence of high oxidative stress in EC from smokers. The fact that smoking is associated with increased oxidative stress has been previously reported in other sources (Nicita-Mauro *et al.*, 2008): in serum and plasma from smokers, high levels of malondialdehydes (Sharma *et al.*, 2002) and F<sub>2</sub>-isoprostane (Dietrich *et al.*, 2002) were observed. Oxidative-DNA damage products were measured in urinary samples (Chen *et al.*, 2004a) and lung tissues (Asami *et al.*, 1997) from smokers. Altogether, these data indicate that chronic exposure to tobacco induces potent chronic oxidative stress that could lead to EC damage, SIS and the premature atherosclerosis observed in our population of smoking patients.

Compared to coronary arteries, IMA rarely develop macroscopic atherosclerotic plaques. Although not exposed to the same mechanical stress imposed to the coronary circulation, they are nevertheless exposed to similar levels of atherogenic agents (Puga, 1995). It has been reported that in IMA tissue from smokers, antioxidant capacities were significantly lower than in tissues from non-smokers, and that the severity of coronary atherosclerotic lesions was inversely correlated to the IMA levels of vitamin E (Mezzetti *et al.*, 1995). On the other hand, it has been reported that vascular smooth muscle cells

(VSMC) from IMA, compared to VSMC from coronary arteries have enhanced intrinsic antioxidant enzymes capacities (Mahadevan *et al.*, 2006). To the best of our knowledge, there is no data concerning intrinsic prooxidant/antioxidant capacities in EC isolated from IMA.

Endothelial cells from smokers display higher initial VEGF-A gene expression (Table 3). Nicotine has been shown to increase VEGF expression (Conklin *et al.*, 2002). Hypoxia is also a strong inducer of both VEGF and VEGF receptor genes, and VEGF is a trophic factor required for EC survival (Kasahara *et al.*, 2001). Combined with the younger age of the donors, these abnormally high levels of VEGF could also contribute to the higher replicative potential of EC from smokers observed in culture. In addition, we observed higher initial ANGPTL2 gene expression in EC from smokers (Table 3). If we consider in the smoker subgroup the impact of COPD, a state of chronic inflammation, in the smoker subgroup, ANGPTL2 mRNA levels were even higher in COPD than in those without ( $11.68 \pm 5.44$  versus  $2.29 \pm 0.97$ ,  $p < 0.05$ ; data not shown). ANGPTL2 is a novel growth factor (Morisada *et al.*, 2006b) that could be involved in the development of the abnormal vasculature in diabetes and in endothelial inflammation (Sun *et al.*, 2007). ANGPTL2 gene expression was positively correlated with VEGF-A gene expression and replicative potential (data not shown). Thus, both VEGF and ANGPTL2 could promote cell growth in response to the chronic inflammatory stress associated with smoking. Finally, EC isolated from smokers expressed both higher mRNA and protein (data not shown) levels of p53. The tumour suppressor p53 is involved in multiple cellular functions including senescence (Ben-Porath *et al.*, 2005), and is an index of cell damage since its function is to restrict stress-exposed cells before damages to DNA become irreversible. There is therefore a striking combination of expression of prosurvival and damage biomarkers in EC isolated from smokers. This suggests that in EC isolated from active smokers, p53-driven senescence can occur before reaching the Hayflick limit (that is, independently of telomere shortening), and that oxidative stress triggers senescence upstream of DNA damage.

We need to consider some potential limitations of our study. The patients used in this study were atherosclerotic and hypertensive, obese and/or diabetic; the combination of these multiple risk factors for cardiovascular disease makes the analysis of the effect of

smoking on senescence complex. We found, however, clear differences between atherosclerotic smokers and atherosclerotic nonsmokers, namely, younger age, lower EC antioxidant capacities, and telomere-independent senescence in the former group. The second possible limitation is the lack of information on the patient' daily cigarette consumption. This may not be critical, however, since it has been reported that alteration of endothelial vasoregulatory activity is independent of the number of cigarettes smoked (Barua *et al.*, 2002). This activity was similar in subjects who smoked one pack of cigarettes per week, in those who smoked one pack per day, or in those who smoked less.

In conclusion, EC from severely atherosclerotic smokers display evidences of long-term *in vivo* exposure to oxidative stress and inflammation that likely hastened the need for CABG by a decade. The severe cellular damages induced by chronic smoking drives EC towards a senescence pathway that is telomere-independent and mainly triggered by oxidative stress.



## **Acknowledgements**

This work has been supported in part by the Foundation of the Montreal Heart Institute, the Heart and Stroke Foundation of Quebec, and the Canadian Institute for Health Research (MOP 14496). Nada Farhat holds the Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships - Doctoral Award in association with the Canadian Institute for Health Research. Guillaume Voghel is supported by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec. The authors acknowledge the technical and ethical support provided by the “Réseau d’échange de tissus et d’échantillons biologiques” funded by the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

## References

- Ambrose, J., & Barua, R. (2004 ). The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.* , 43(10), 1731-1737.
- Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., et al. (1997). Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*, 18(9), 1763-1766.
- Barua, R., Ambrose, J., Eales-Reynolds, L., DeVo, M., Zerva, J., & DC., S. (2002). Heavy and light cigarette smokers have similar dysfunction of endothelial vasoregulatory activity: an in vivo and in vitro correlation. *J Am Coll Cardiol.*, 39(11), 1758-1763.
- Barua, R., Ambrose, J., Srivastava, S., De Voe, M., LJ., E.-R., & (2003). Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation*, 107(18), 2342-2347.
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. (2004). When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest.*, 113(1), 8-13.
- Ben-Porath, I., & Weinberg, R. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(5), 961-976.
- Blann, A., & McCollum, C. (1993). Adverse influence of cigarette smoking on the endothelium. *Thromb Haemost*, 70(4), 707-711.
- Chen, H., Wu, C., Hong, C., & Chang, C. (2004). Urinary excretion of 3,N4-etheno-2'-deoxycytidine in humans as a biomarker of oxidative stress: association with cigarette smoking. *Chem Res Toxicol*, 17(7), 896-903.
- Cho, K. A., & Park, S. C. (2005). Caveolin-1 as a prime modulator of aging: a new modality for phenotypic restoration? *Mech Ageing Dev*, 126(1), 105-110.
- Conklin, B. S., Zhao, W., Zhong, D. S., & Chen, C. (2002). Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *Am J Pathol*, 160(2), 413-418.

- Dietrich, M., Block, G., Hudes, M., Morrow, J., Norku, E., Traber, M., et al. (2002). Antioxidant supplementation decreases lipid peroxidation biomarker F(2)-isoprostanes in plasma of smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *11*(1), 7-13.
- Dimri, G., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(20), 9363-9367.
- Doll, R., Peto, R., Boreham, J., & Sutherland, I. (2005). Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. *Br J Cancer*, *92*(3), 426-429.
- Galbiati, F., Volonté, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P., Zhu, L., et al. (2001). Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*, *12*(8), 2229-2244.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, *11*(3), 298-300.
- Heitzer, T., Just, H., & Münzel, T. (1996). Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation*, *94*(1), 6-9.
- Herbig, U., Jobling, W., Chen, B., Chen, D., & Sedivy, J. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell Biol*, *14*(4), 501-513.
- Kasahara, Y., Tuder, R., Cool, C., Lynch, D., Flores, S., & Voelkel, N. (2001). Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, *163*(3 Pt 1), 737-744.
- Kondo, T., Hayashi, M., Takeshita, K., Numaguchi, Y., Kobayashi, K., Iino, S., et al. (2004). Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *24*(8), 1442-1447.
- Mahadevan, V., Campbell, M., McKeown, P., & Bayraktutan, U. (2006). Internal mammary artery smooth muscle cells resist migration and possess high antioxidant capacity. *Cardiovasc Res*, *72*(1), 60-68.

- Mezzetti, A., Lapenna, D., Pierdomenico, S., Calafiore, A., Costantini, F., Riario-Sforza, G., et al. (1995). Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis*, *112*(1), 91-99.
- Morisada, T., Kubota, Y., Urano, T., Suda, T., & Oike, Y. (2006). Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis. *Endothelium*, *13*(2), 71-79.
- Nicita-Mauro, V., Lo Balbo, C., Mento, A., Nicita-Mauro, C., Maltese, G., & Basile, G. (2008). Smoking, aging and the centenarians. *Exp Gerontol*, *43*(2), 95-101.
- Nyunoya, T., Monick, M., Klingelutz, A., Yarovinsky, T., Cagley, J., & Hunninghake, G. (2006). Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *35*(6), 681-688.
- Pandita, T. (2002). ATM function and telomere stability. *Oncogene*, *21*(4), 611-618.
- Puga, J. (1995). The use of the internal mammary artery for revascularization of the left anterior descending coronary artery. *Eur Heart J*, *16 Suppl E*(21-5).
- Sharma, S., Dwivedi, S., Prabhu, K., Singh, G., Kumar, N., & Lal, M. (2002). Coronary risk variables in young asymptomatic smokers. *Indian J Med Res*, *122*, 205-210.
- Sun, H., Zheng, J., Chen, S., Zeng, C., Liu, Z., & li, L. (2007). Enhanced expression of ANGPTL2 in the microvascular lesions of diabetic glomerulopathy. *Nephron Exp Nephrol*, *105*(4), e117-123.
- Tsuji, T., Aoshiba, K., & Nagai, A. (2006). Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*, *174*(8), 886-893.
- Valdes, A., Andrew, T., Gardner, J., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L., et al. (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet*, *366*(9486), 662-664.
- Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Mamarbachi, A., Villeneuve, L., Fortier, A., et al. (2008). Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev*, *129*(5), 261-270.
- Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Nguyen, A., Villeneuve, L., Mamarbachi, A. M., et al. (2007). Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev*, *128*(11-12), 662-671.

Wannamethee, S., Lowe, G., Shaper, A., Rumley, A., Lennon, L., & Whincup, P. (2005). Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J*, 26(17), 1765-1773.

**Table 2.** Clinical profile of patients undergoing coronary artery bypass graft surgery.

	<b>Smokers (n=26)</b>	<b>Former-smokers (n=40)</b>	<b>Non-smokers (n=20)</b>
Sex (Male/Female)	22/4	30/10	15/5
Age (years) [range]	56.2±2.4 * [25-79]	66.1±1.6 [47-84]	66.5±2.1 [50-80]
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.0±0.9	28.7±0.9	28.8±1.1
Glucose level (mM)	6.5±0.3	6.5±0.2	6.7±0.4
LEVF (%)	50.0±2.4	51.8±2.1	52.6±2.7
History of disease (years) [range]	8.2±2.6 [0.1-47]	7.0±1.2 [0.1-29]	6.3±1.9 [0.1-23]
Dyslipidemia (%)	92 (23/25)	85 (34/40)	89.5 (17/19)
Hypertension (%)	58 (14/24)	75 (30/40)	75 (15/20)
Diabetes (%)	24 (6/25)	30 (12/40)	45 (9/20)
Family history CAD (%)	94 (16/17)	85 (17/20)	63.6 (7/11)
Renal failure (%)	8 (2/25)	17.5 (7/40)	5 (1/20)
COPD (%)	27 (7/26)	23 (9/40)	5 (1/20)

Patients were treated with similar medications including aspirin, angiotensin- converting enzyme inhibitors, b-blockers, calcium channels blockers, statins and nitrates.

\*; p<0.05 *versus* non-smokers (ANOVA).

BMI: body mass index; LEVF: left ejection ventricular fraction; CAD: coronary artery disease; COPD: chronic obstructive pulmonary disease.

**Table 3:** Initial gene expression in EC isolated from patients.

mRNA	Non-smokers	Former-smokers	Smokers
<b>Caveolin-1</b>	0.446±0.091 (8)	0.691±0.131 (19)	3.666±1.436 (14) *
<b>ATM</b>	1.295±0.393 (6)	0.692±0.098 (18) *	0.689±0.089 (14) *
<b>ANGPTL2</b>	1.354±0.461 (12)	1.550±0.306 (25)	5.053±1.944 (17) *
<b>VEGF-A</b>	2.555±0.452 (12)	3.160±0.646 (25)	7.321±1.083 (17) *
<b>p53</b>	1.224±0.092 (5)	1.368±0.143 (15)	2.414±0.533 (12) *

\*:  $p < 0.05$  versus non-smokers (ANOVA).

**Figure 1:** Lower telomere shortening in EC from smokers.

(A) Telomere length (RFL, bp) was measured by Southern blot, initially (passage 2) and when cells reached senescence. Telomere shortening was then calculated ( $\Delta$ RFL) and corrected by the number of cell divisions performed ( $\Sigma$ PDL) in EC from non-smokers (n=16), former smokers (n=30) and smokers (n=21). \*: p<0.05 compared to non-smokers. (B) Correlation between the marker of propensity to develop senescence (Time to reach 50% of senescent EC, days) and initial telomere length (bp), in EC from non-smokers (r= 0.526, p=0.0361, n=15) and in EC from smokers (C) (r= 0.164, p=0.4680, n=21).

**Figure 2:** Passage-induced senescence in EC from smokers.

Time course of senescence, quantified by senescence associated b-galactosidase and induced by serial passage in culture, in EC isolated from non-smokers (open squares, n=16), former smokers (open triangles, n=34) and smokers (closed squares, n=25). From the profiles of senescence, the time ( $\Sigma$ Days) and the number of cell divisions ( $\Sigma$ PDL) reached when 50% of the cells are senescent, were calculated. \*: p<0.05 compared to non-smokers.

**Figure 3:** Increase in lipid peroxidation in EC isolated from smokers.

Total levels of 4-hydroxy-nonenal (HNE) were estimated by immunofluorescence staining (red) at passage 2. DNA counterstaining (blue) was performed with TOPRO-3. Examples of immunostaining of EC isolated from a non-smoker (A) and a smoker (B) patient. (C) Average initial values of total HNE corrected by the number of cells, in EC from non-smokers (n=8), former smokers (n=9) and smokers (n=5). \*: p<0.05 compared to non-smokers.

**Figure 4:** Lower intrinsic antioxidant capacities in living EC from smokers.

EC were loaded with the non-specific fluorescent dye CM-H<sub>2</sub>DCFDA, at passage 2 (C). EC were stimulated with the laser light in the absence and presence of 100 $\mu$ M of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> until the fluorescent signal stabilized. The time needed to reach 50% of saturation in both control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulated cells, was measured and the maximal fluorescence



intensity in both control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulated cells was recorded.  $\Delta\text{time } 50\%_{(\text{control-H}_2\text{O}_2)}$  and  $\Delta\text{fluorescence max }_{(\text{H}_2\text{O}_2\text{-control})}$  were calculated: the shorter  $\Delta\text{time}$  and the smaller  $\Delta\text{fluorescence}$ , the lower the antioxidant capacities of the cells. Example of saturation profile in EC from a non-smoker (A) and a smoker (B) patient. Average  $\Delta\text{time } 50\%$  (D) and  $\Delta\text{fluorescence}$  (E) in EC from non-smokers (n=6), former smokers (n=9) and smokers (n=4). \*: p<0.05 compared to non-smokers.

Figure 1

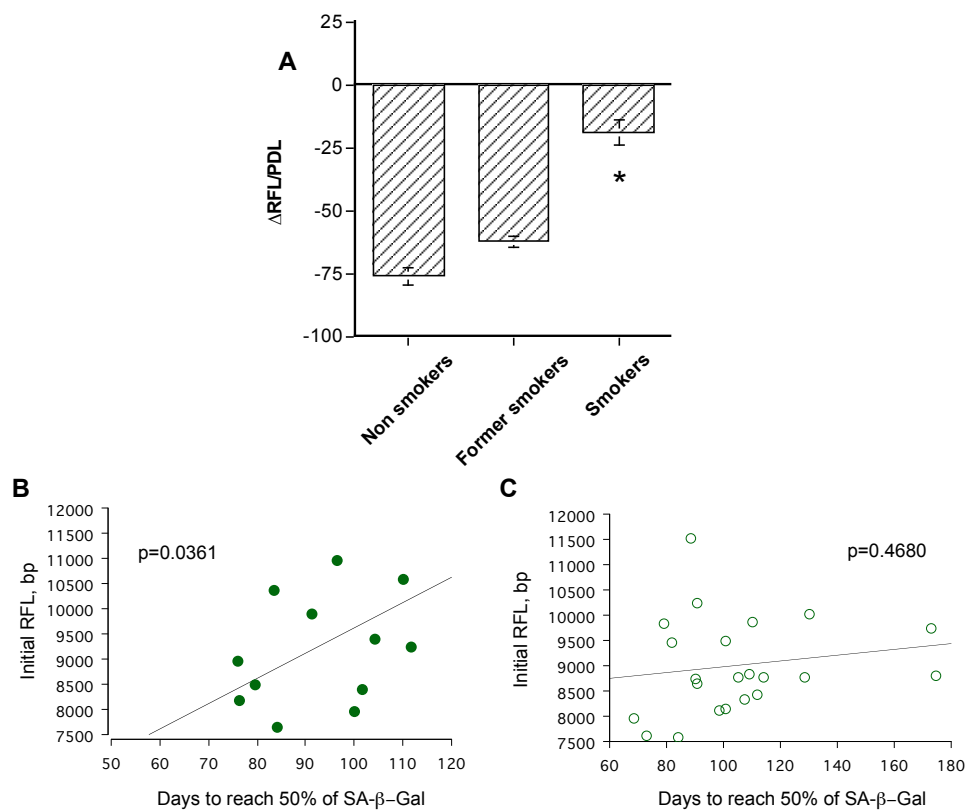
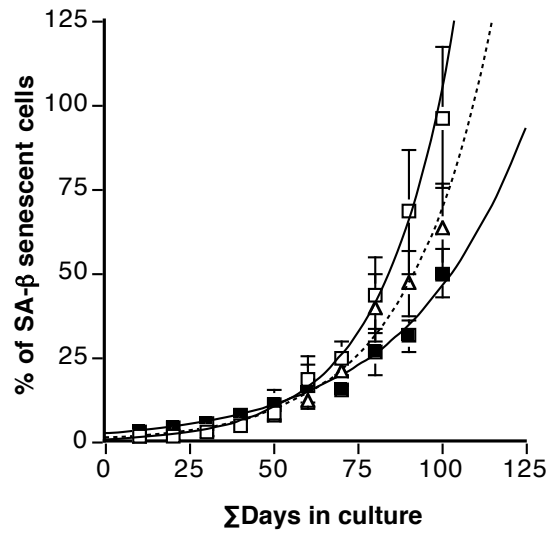
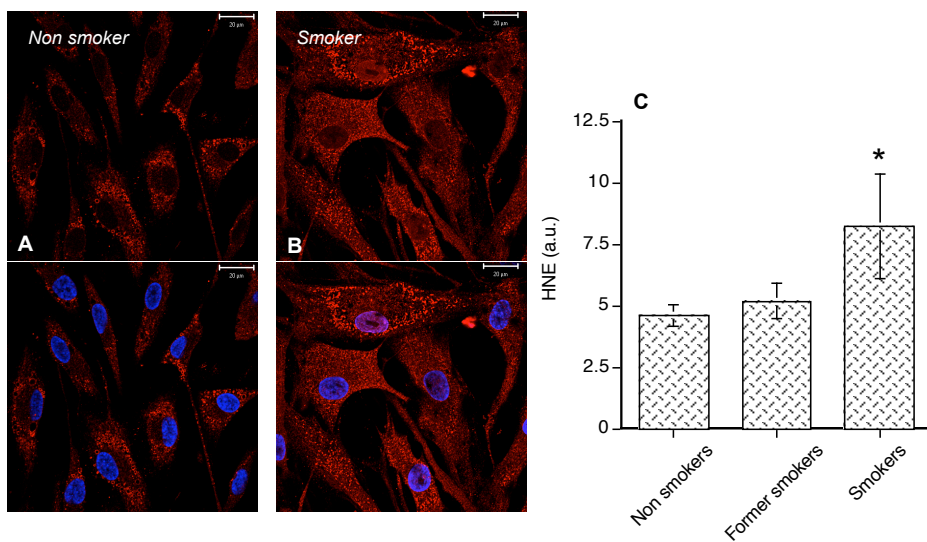


Figure 2



50% of senescent cells:	Σ Days	ΣPDL
□ Non smokers	87±4	10±1
△ Former smokers	103±5 *	12±1
■ Smokers	104±5 *	13±1 *

Figure 3



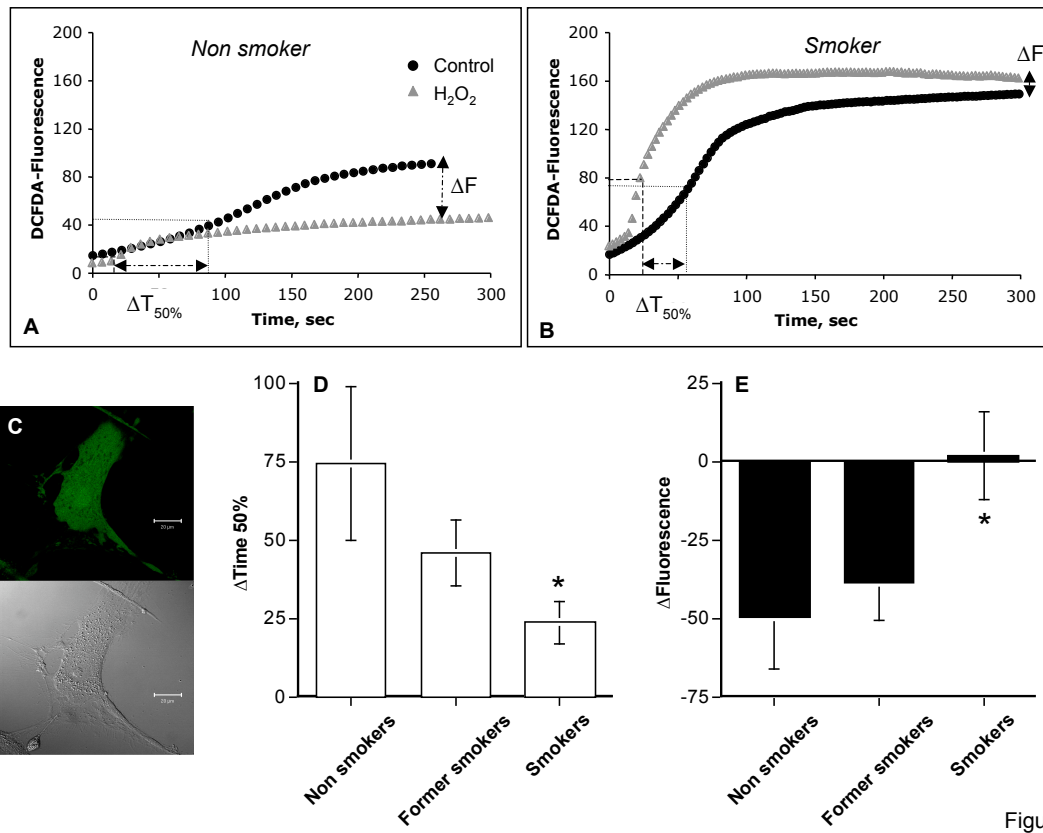


Figure 4

### **3.3. Étude 3 (article méthodologique)**

**Préparation et purification de l'Angptl2 recombinante**

**(Angptl2-GST)**

### 3.3.1. Introduction

L'Angptl2 est une protéine de 57 kDa libérée dans la circulation grâce à la présence d'un signal d'exportation dans le domaine hydrophobe en N-terminal (Kim *et al.*, 1999b). La structure de l'Angptl2 prédit la présence de deux sites consensus potentiels pour la N-glycosylation, une modification post-transcriptionnelle indispensable à l'activité des protéines sécrétées ainsi que des protéines membranaires (Kim *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 2006a).

La protéine recombinante Angptl2 n'est pas disponible commercialement, du moins pas sous sa forme glycosylée. De même, le récepteur de l'Angptl2 n'est pas encore connu, bien que récemment, une étude intéressante pourrait avoir identifié un récepteur potentiel pour les Angptl1, 2, 5 et 7 (Zheng *et al.*, 2012b). Aucun inhibiteur ou antagoniste n'est encore disponible afin de pouvoir étudier la signalisation intracellulaire de l'Angptl2. Notre étude avait pour but de décrire notre technique de production, d'amplification et de purification de la protéine recombinante d'Angptl2-GST et, dans un second temps, de valider la fonctionnalité de la protéine purifiée sur des HUVEC en culture, en se basant sur les propriétés connues de l'Angptl2 (pro-angiogéniques et chimio-attractantes). Les données concernant l'amplification et la purification de la protéine recombinante de l'angptl2-GST sont rassemblées dans un article méthodologique qui a été soumis dans le journal "Protein expression and purification".

### 3.3.2. Matériel et méthodes

Dans cette partie, une description très détaillée des méthodes employées sera faite, de façon à pouvoir réutiliser fidèlement ces techniques. Ces méthodes pourtant complexes ne sont jamais décrites dans leur intégralité dans les articles publiés, pour des raisons d'espace.

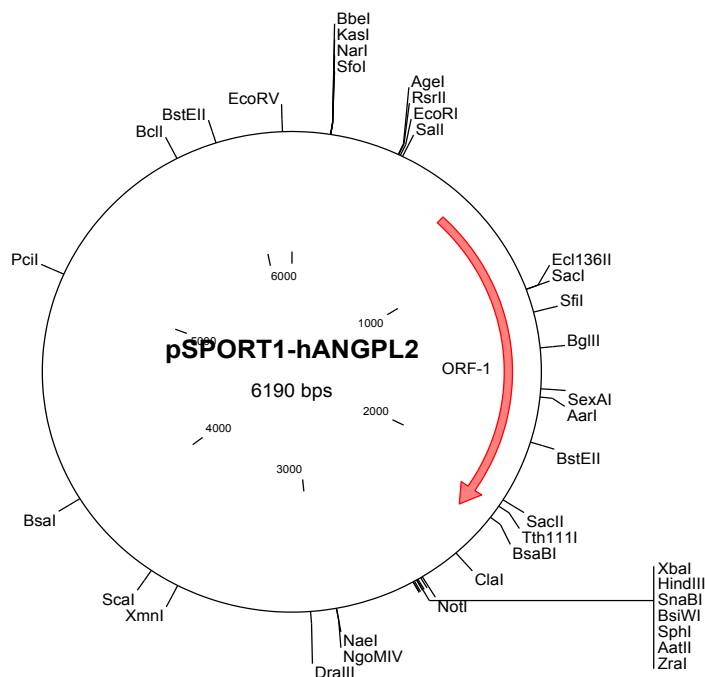
#### 3.3.2.1. Construction du plasmide recombinant pcDNA-Angptl2-GST (Glutathione S-Transferase)

Le but de cette construction est (1) de cloner l'ADNc du GST en phase avec l'ADNc de l'Angptl2 sans avoir un codon stop qui sépare les deux ADNc et (2) d'insérer l'ADNc

résultant dans un vecteur d'expression (le pcDNA3.1) afin de l'exprimer dans un système eucaryote (les cellules HEK 293). De plus, comme la protéine Angptl2 est sécrétée par la cellule, il est impératif de cloner le peptide signal du côté C terminal de la protéine recombinante.

Dans le vecteur pcDNA3.1, l'Angptl2 est placée sous la dépendance d'un promoteur puissant, soit le promoteur du gène immédiatement précoce du cytomégalo virus humain (le promoteur de cytomegalovirus, CMV). Ce promoteur a l'avantage de produire beaucoup de protéine et ce à long terme. De plus, le vecteur pcDNA3.1 contient un marqueur génétique bactérien, l'aph (aminoglycoside phosphotransférase) qui confère une résistance à l'antibiotique aminoglycoside, la généticine (le G418), qui tue les cellules mammifères en bloquant la synthèse protéique.

L'ADNc de l'Angptl2 a été reçu dans un vecteur pSPORT1 (Openbiosystems, clone ID LIFESEQ2268890). Une représentation cartographique de ce vecteur est donnée dans la Figure 19.



**Figure 19** Cartographie du vecteur SPORT1-hAngptl2 selon la compagnie Openbiosystems.



La construction du pcDNA3.1-Angptl2-GST s'est faite en trois étapes :

*Étape 1. Sous clonage du côté 3' du gène d'Angptl2 sans le codon stop dans le vecteur pcDNA3.1*

Dans un premier temps, une réaction PCR a été réalisée à partir du plasmide pSPORT1-Angptl2 dans le but d'isoler l'Angptl2 sans le codon stop et de modifier la séquence de ses extrémités en rajoutant des sites de restriction (Figure 20). Plus précisément, des amorces spécifiques sens/antisens ont été dessinées comme suit :

a) une amorce sens composée de la séquence en amont du site BstE2 à l'extrémité 3' du gène d'Angptl2 et qui comporte deux sites de restriction spécifiques aux enzymes EcoRI et AgeI, respectivement :

5' CTATGAATTC ACCGGT CTGCGAACCAAGGCAACTA

EcoRI      AgeI

b) une amorce antisens composée de la séquence 3' du gène d'Angptl2 sans le codon stop avec deux sites de restriction, EcoNI (en phase avec le C terminal du gène d'Angptl2) et XhoI :

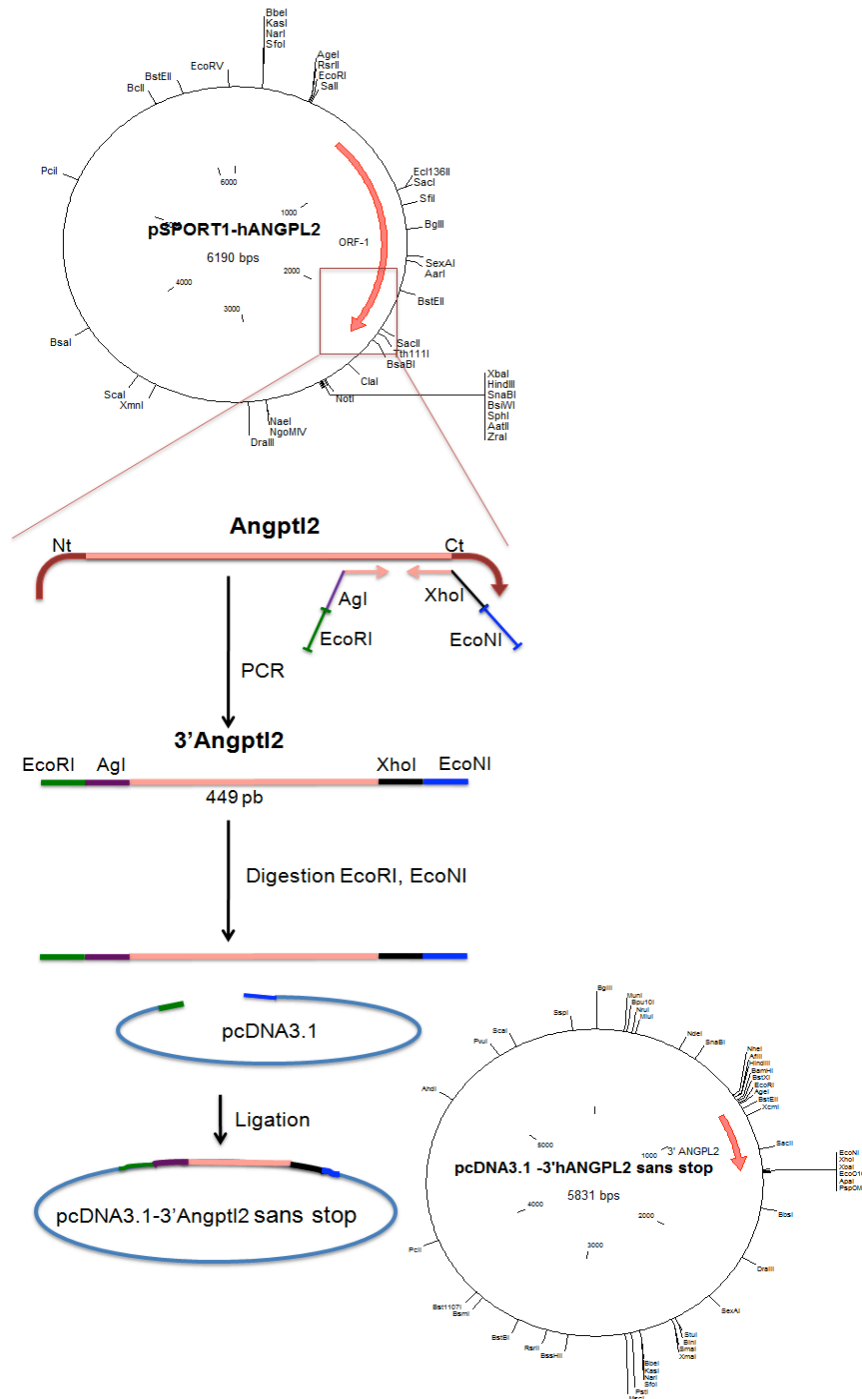
5' CGTCTCGAG CCTAGTATAGG GGAGTGGAAGGTGTTGGGGTTCGG

XhoI      EcoNI

L'isolation du côté 3' du gène spécifique à l'Angptl2 est réalisée par PCR à l'aide de l'enzyme polymérase thermostable, l'élongase (*Elongase Enzyme Mix*, Invitogen) selon le protocole suggéré par le fabricant. Brièvement, 1 µl de l'ADN plasmidique est utilisé auquel sont rajoutés dans un tube stérile, 1 µl de 10 mM dNTP, 1 µl de l'amorce sens (à 10 µM), 1 µl de l'amorce antisens (à 10 µM), 8 µl du tampon A [à 5X qui contient 300 mM de Tris-SO<sub>4</sub> (pH 9.1 à 25°C), 90 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 5 mM de MgSO<sub>4</sub>], 2 µl du tampon B [à 5X qui contient 300 mM de Tris-SO<sub>4</sub> (pH 9.1 à 25°C), 90 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 10 mM de MgSO<sub>4</sub>] et le volume de la réaction est complété à 50 µl avec de l'eau *DNase Free*. L'ADN plasmidique est dénaturé à 94°C pendant 30 sec et amplifié par 30 cycles comme suit : 30 sec à 94°C (dénaturation) suivis par 30 sec à 55°C (ou bien selon la température d'*annealing* des amorces) et finalement 45-60 sec à 68°C (étape d'extension). Le produit de PCR généré, de 449 pb, est déposé sur un gel

d'agarose (2 %) et purifié de tous les autres matériaux par une extraction du gel (*Kit Gel Extraction*, Qiagen, section 3.1.2.2.3).

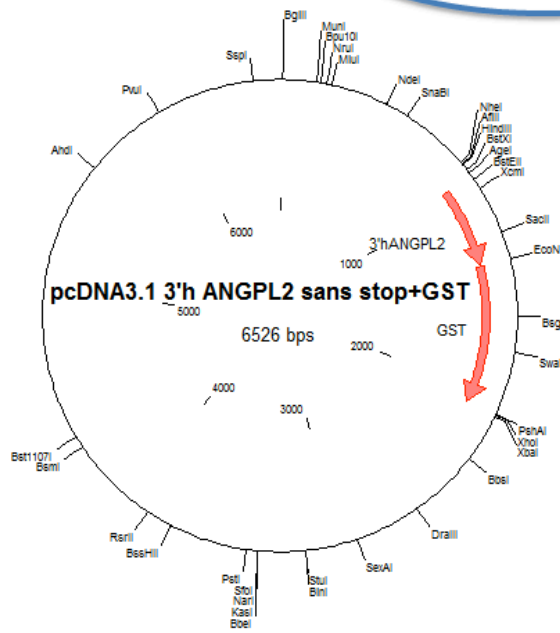
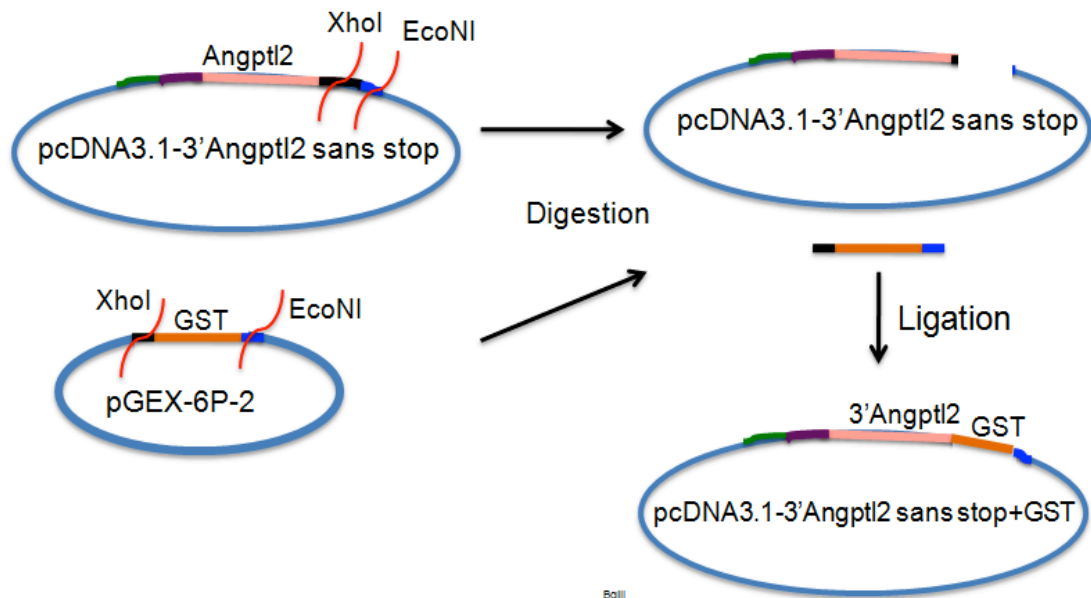
Afin de cloner le 3'Angptl2 dans le vecteur pcDNA3.1 (Openbiosystems), il est nécessaire de générer des extrémités compatibles entre l'ADNc et le vecteur. Pour ce faire, le vecteur et l'ADNc sont coupés avec EcoRI suivi par EcoNI. Le protocole de la réaction de digestion est expliqué à la section 3.1.2.2.3. Il faut souligner qu'une désactivation de la première enzyme (pendant 20 min à 70°C) est nécessaire avant de procéder à la deuxième digestion. De plus, chaque enzyme de restriction possède son propre tampon (force ionique, chélateur et pH), et ceci exige une élimination du premier tampon par un filtre de microcon 30 (Millipore) suite à une dilution avec de l'eau. Les produits obtenus après les deux digestions sont purifiés sur un gel d'agarose. Pour finir, une réaction de ligation (section 3.1.2.3 pour le protocole de ligation) permet la réunion de deux produits, donnant ainsi le vecteur pcDNA3.1-3'Angptl2. Celui-ci est ensuite transfecté dans des bactéries compétentes DH5- $\alpha$ , amplifié et extrait des bactéries à l'aide du kit de MiniPrep. La présence de l'insert est détectée suite à une digestion enzymatique avec les enzymes EcoRI/EcoNI et le produit de la digestion est vérifié sur un gel d'agarose puis validé par séquençage.



**Figure 20** Représentation schématique de l'étape 1 : Sous clonage du côté 3' du gène d'Angptl2 sans le codon stop dans le vecteur pcDNA3.1

*Étape 2. Introduction de l'ADNc de la GST à partir du vecteur pGEX-6P2 (Amersham) en phase avec le 3'Angptl2.*

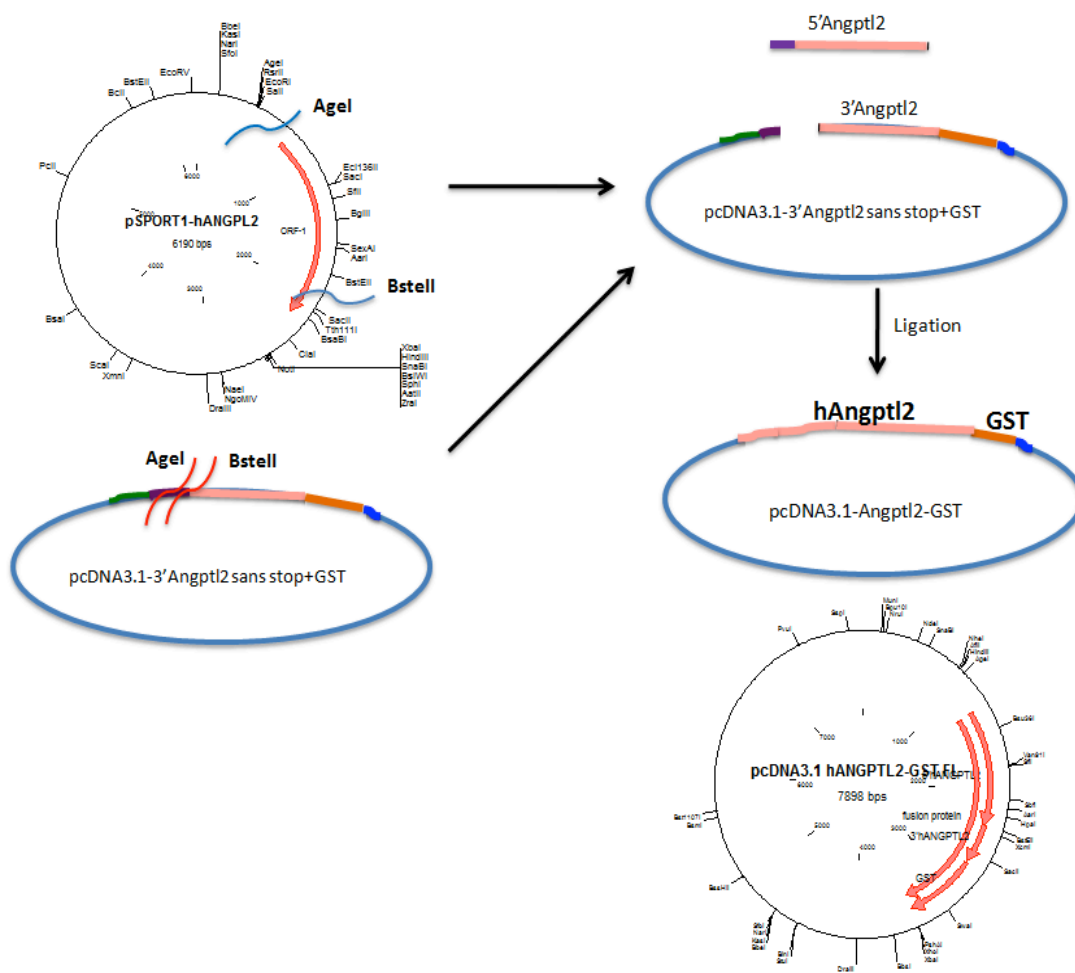
Une restriction enzymatique par XhoI suivie par EcoNI permet la sortie de l'ADNc de la GST à partir du vecteur pGEX-6P-2 (Amersham, le protocole de la digestion enzymatique est décrit à la section 3.1.2.3). La purification de l'insert est réalisée sur un gel d'agarose de 2 %. Comme décrit auparavant, le vecteur et l'insert doivent avoir des extrémités compatibles afin de réaliser l'insertion; ainsi le vecteur pcDNA3.1-3'Angptl2 est coupé avec les mêmes enzymes et débarrassé du tampon avec le filtre de microcon. Une dernière étape d'introduction de l'ADNc de la GST en phase avec le 3'Angptl2 est effectuée par une simple réaction de ligation (Figure 21). Le produit ainsi formé est le pcDNA3.1-3'Angptl2 + GST. Le produit est ensuite transformé dans des bactéries compétentes, amplifié, purifié, digéré, vérifié sur gel et par séquençage, comme décrit pour le clone de l'étape 1.



**Figure 21** Représentation schématique de l'étape 2 : Introduction de l'ADNc de la GST à partir du vecteur pGEX-6P2 en phase avec le 3' Angptl2.

*Étape 3. : Rajout du côté 5' de l'Angptl2.*

Le côté 5' du gène de l'Angptl2 est sorti du clone original SPORT1 après digestion avec les enzymes AgeI et BstEII (Figure 22) et l'insert ainsi produit est lié avec le pcDNA3.1-3'Angptl2, la construction de l'étape 2. Ceci est ensuite transformé dans des bactéries compétentes, amplifié, purifié, digéré et vérifié sur gel. Le clone final pcDNA3.1-3'Angptl2-GST est confirmé par séquençage.



**Figure 22** Représentation schématique de l'étape 3 : Rajout du côté 5' de l'Angptl2.

### 3.3.2.2. Purification de la protéine recombinante par FPLC

La protéine de fusion Angptl2-GST doit être amplifiée dans des cellules HEK 293 puis purifiée par la technique de purification sur colonne d'affinité (chromatographie liquide rapide des protéines, FPLC) qui sépare des molécules selon leurs affinités pour un ligand.

Le passage de l'échantillon contenant la protéine Angptl2-GST à travers la colonne GSTrap HP (Amersham), formée de billes de Sépharose couplées de façon covalente au glutathione, permet la rétention de la partie GST de la protéine par le glutathione en formant ainsi un complexe stable (Figure 23).



**Figure 23** Schéma représentatif de la rétention d'une protéine recombinante aux billes de glutathione.

#### 3.3.2.2.1. Obtention d'un clone stable

Dans un premier temps, nous avons établi les conditions expérimentales permettant la surexpression de la protéine hAngptl2 avec l'étiquette GST, et un protocole très efficace de purification a été mis au point. Il est indispensable de fabriquer la protéine dans des cellules eucaryotes afin que la protéine conserve toutes les modifications post-transcriptionnelles nécessaires à son activité physiologique (Kim *et al.*, 1999b). Pour ce faire, des cellules HEK 293 ont été utilisées puisqu'elles prolifèrent relativement vite et qu'elles expriment de grandes quantités de protéines recombinantes.

La culture de la lignée HEK 293 est peu exigeante: il s'agit d'une souche de cellules tumorales qui s'utilise à des passages élevés. Ces cellules ont été obtenues, à l'origine,

de la compagnie Invitrogen et stockées dans l'azote liquide dans le laboratoire. Pour les maintenir en culture, ces cellules sont cultivées dans un milieu DMEM contenant 10 % de sérum fœtal bovin (FBS) et 1 % de pénicilline/streptomycine. Ces cellules peuvent être facilement décollées de la surface de culture, par simple tapotement des flacons.

Des cellules HEK 293 ont donc été transfectées avec le vecteur pGEX6P2 codant la protéine recombinante Angptl2-GST et contenant un gène de résistance à la généticine en utilisant le kit de *lipofectamine 2000* (Qiagen). La transfection des HEK 293 s'effectue dans une plaque à 6 puits à une confluence de ~ 80 %. Dans un tube collecteur, 4 µg de plasmide pGEX6P2 sont mélangés doucement avec 250 µl du milieu opti-MEM (Invitrogen). Dans un autre tube collecteur, 10 µl de l'agent lipofectamine 2000 sont aussi mélangés avec 250 µl du même milieu opti-MEM. Cinq minutes plus tard, les deux solutions sont combinées, incubées pendant 20 min à température de la pièce, diluées dans 1,5 ml du DMEM et déposées goutte à goutte sur les HEK 293. Vingt-quatre heures après la transfection, ce milieu de culture est remplacé par du DMEM frais (DMEM, 10 % FBS, 1 % pénicilline/Streptomycine) en présence de l'antibiotique de sélection, c'est à dire le G418 (Généticine).

Dans le but de choisir la concentration appropriée de l'antibiotique G418 qui permet de tuer toutes cellules non transfectées dans un intervalle de 5 jours, une courbe de sélection dose/réponse au G418 a été réalisée. Les cellules HEK 293 sont mises en culture dans le DMEM (10 % de FBS) supplémenté avec différentes doses d'antibiotique (1, 10, 100, 200, 400, 700 ng/ml, 1, 2, 3, 4 et 5 µg/ml) et laissées en culture pendant une semaine. La concentration de 1 µg/ml a été choisie pour établir le clone stable.

Une fois le clone stable établi, la présence de la protéine Angptl2-GST intacte, sécrétée dans le milieu de culture des cellules HEK 293 est validée par Western blot. Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et laissées 48 h dans du DMEM sans sérum. Le milieu de culture est récupéré, centrifugé à une vitesse de 13000 tours/min pendant 30 min à 4°C et 1 ml du surnageant est concentré. Pour ce faire, un filtre muni d'une membrane de dialyse avec des pores (*centrifugal filter*, Millipore) qui laissent passer le milieu de culture et les particules de poids moléculaire inférieur à 10 kDa (*Cutoff* de 10



kDa) est utilisé. Avant l'utilisation du filtre, il est nécessaire de bloquer les sites non spécifiques de la membrane de dialyse avec de la BSA (qui se trouve dans le FBS). Pour ce faire, 500 µl du DMEM contenant 10 % de FBS sont filtrés pendant 30 min à une vitesse basse (5000 tours/min). Ensuite, la protéine recombinante qui se trouve dans le 1ml du milieu de culture, est concentrée 50 fois par ce filtre et analysée sur gel d'acrylamide 12.5 % (voir protocole de Western blot décrit à la section 3.3.2.3.) en utilisant l'anticorps spécifique à l'Angptl2 (chèvre anti-Angptl2, R&D) à une dilution de 1:200 dans du lait 5 %.

Suite à l'obtention des cellules transfectées de façon stable, des échantillons de HEK 293 cultivées dans des flacons de 175 cm<sup>2</sup> sont congelés pour maintenir le clone dans le laboratoire : les HEK 293 sont lavées deux fois au PBS et décollées pendant 5 min avec 1 ml de la trypsine, à 37°C. La trypsine est désactivée avec 10 ml du DMEM enrichi de 10% FBS. Après une centrifugation de 10 min à 1100 tours/min, le culot est resuspendu dans 1 ml d'un milieu contenant 10% DMSO : 90% DMEM et supplémenté avec 10 % FBS. Ce culot de cellules est incubé 18 h à -80°C et est ensuite conservé dans l'azote liquide.

#### **3.3.2.2.2. Purification par FPLC**

Le milieu de culture des cellules HEK 293 est récolté tous les deux à trois jours, centrifugé 2 h à 40000 rpm (à 4°C) afin d'éliminer les cellules mortes, et chargé dans le système de purification FPLC. La colonne GSTrap de 1 ml a une capacité à retenir 10 mg de la protéine-GST. Pour garantir une bonne durée de vie de la colonne, il faut (1) éviter de faire passer l'échantillon avec un fort débit (il faut toujours vérifier la pression dans le système), (2) éviter d'exposer les billes de Sépharose à l'air et il ne faut donc pas faire rentrer une bulle d'air dans la colonne et (3) éviter la croissance bactérienne en incubant la colonne le moins longtemps possible (au plus 1 mois) avec le milieu de culture et en entreposant la colonne en présence de 20 % d'éthanol.

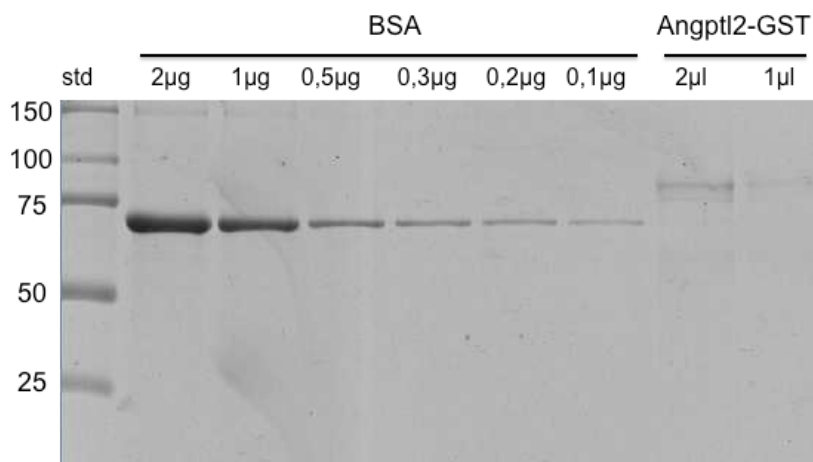
Pour chaque expérience, 2 litres du milieu de culture sont passés dans la colonne à un faible débit (0,2 ml/min) pour augmenter l'efficacité de liaison. La colonne est ensuite

lavée avec 10 ml du tampon TBSE (tampon saline Tris avec EDTA) (50 mM de Tris-base, 150 mM de NaCl, 1 mM d'EDTA, 200 mg de NaN<sub>3</sub>, pH 7,45 à 4°C) afin d'enlever toute liaison non spécifique et éluée avec 10 ml du tampon d'éluion (10 mM de glutathion réduit dans TBSE, pH 8,0 à 4°C) en gardant toujours un faible débit de 0,2 ml/min. L'éluat est ensuite collecté dans 20 fractions (volume de 0,5 ml).

Pour vérifier la présence de l'Angptl2-GST et s'assurer de sa pureté, 10 µl de chaque fraction sont déposés sur un gel d'acrylamide 12,5 % et détectés par une coloration non spécifique au bleu de Coomassie (voir section Résultats, Figure 26 A). Ensuite, la spécificité de la protéine obtenue est validée dans 1 µl de chaque fraction par Western blot, en utilisant l'anticorps spécifique anti-Angptl2 (voir section Résultats, Figure 26 B).

Une fois identifiées, les fractions contenant l'Angptl2-GST sont combinées, concentrées par le filtre de *centrifugal filter* (comme décrit précédemment) et dialysées (dans des sacs de dialyse de *Cutoff* de 10 kDa) 4 fois contre 1000 X le volume de TBSE à 4°C afin d'abaisser la concentration du glutathion de 10 mM à 0,01 mM.

La concentration de la protéine Angptl2-GST est ensuite estimée sur un gel d'acrylamide en utilisant une courbe standard de BSA (0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1 et 2 µg) (Figure 24).



**Figure 24** Quantification de la concentration d'Angptl2-GST purifiée.

Après chaque expérience, il est possible de régénérer la colonne GSTrap. Pour ce faire, la colonne doit être lavée avec 10 X son volume d'eau distillée et filtrée (avec un débit de 0,5 ml/min), puis lavée avec 5 X le volume de la solution filtrée de Guanidine hydrochloride (6 M) et enfin, lavée une dernière fois avec 10 X volume d'eau afin d'enlever le restant de solvant. Dans le cas de l'entreposage de la colonne, un passage de 5 X le volume d'éthanol 20 % filtré est nécessaire.

### **3.3.2.3. Quantification des protéines par la technique d'immunobuvardage de type Western**

Cette technique a été utilisée pour vérifier la spécificité de la protéine Angptl2-GST purifiée par FPLC.

#### **3.3.2.3.1. La préparation de l'extrait protéique**

Pour préparer le lysat protéique, les cellules cultivées dans des boîtes de Pétri de 100 cm<sup>2</sup>, sont lavées deux fois au PBS et homogénéisées sur la glace avec 500 µl de tampon de lyse composé de 50 mM de Tris-HCl pH 7,5 à 5°C, 20 mM de β-glycerophosphate, 20 mM de NaF, 5 mM d'EDTA, 10 mM d'EGTA, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM de benzamidine, 0,5 mM de phenylmethylsulphonyl fluoride, 10 µg/ml de leupeptine, 5 mM de dithiothreitol, 1 µM de microcystine et 1 % (v/v) du Triton X-100. L'homogénat cellulaire est centrifugé 15 min à 10000 X g et à 4°C. Le surnageant constitue la fraction de protéines cellulaires totales. La quantification de la concentration protéique dans les échantillons est réalisée à l'aide du dosage de type Bradford en utilisant la γ-globuline comme standard.

#### **3.3.2.3.2. Technique d'immunobuvardage de type Western**

Deux microlitres de la protéine recombinante purifiée par FPLC sont dénaturés avec le tampon de Laemmli [1X : 50 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 0,5 M de β-Mercaptoethanol, 2,5 % de SDS, 0,4 M de glucose, 1 mM d'EDTA et 0,05 % de bleu de bromophénol] et en les chauffant 5 min à 80°C. Ensuite, les protéines sont déposées sur un gel dénaturant

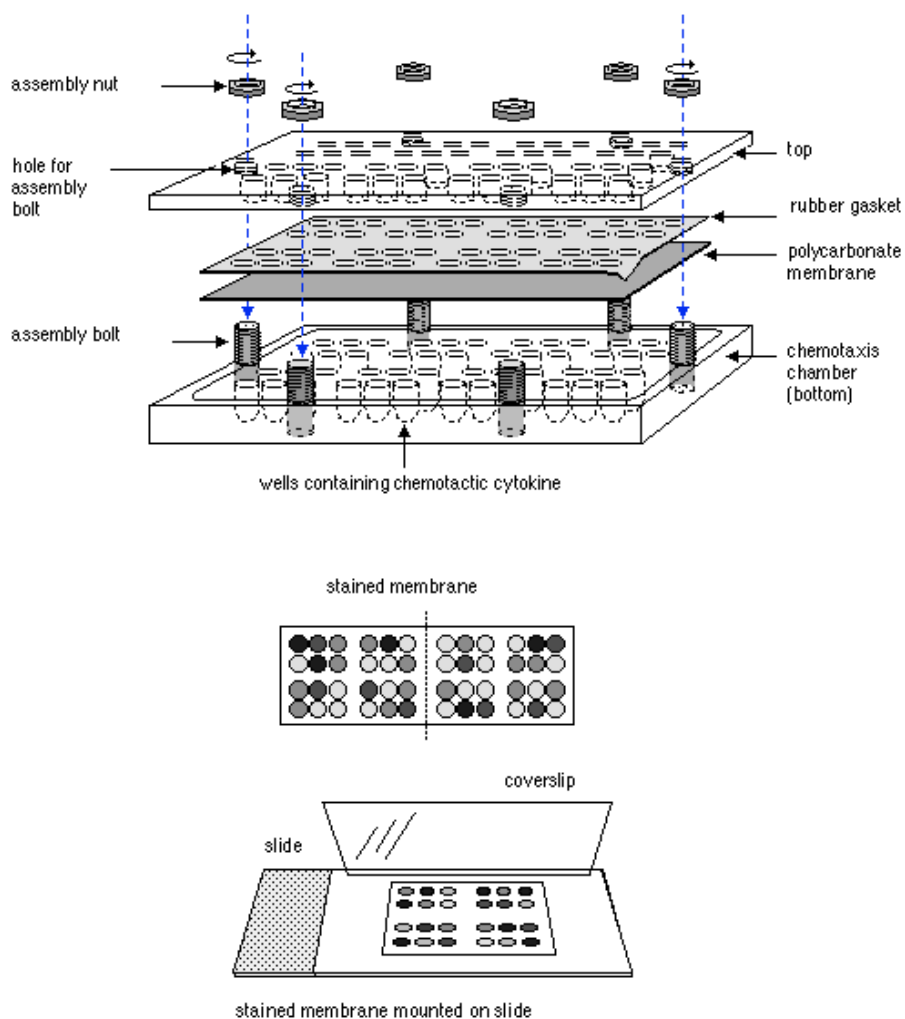
de 12,5 % d'acrylamide SDS-PAGE. La migration se déroule sous un courant de 200 volts, pendant une heure, dans un tampon de migration (25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 0,1 % de SDS). Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (*Trans-Blot*, BioRad) à 100 volts, pendant 90 min et à 4°C, dans le tampon de transfert (25 mM de Tris base, 192 mM de glycine et 5 % de méthanol). La membrane est par la suite bloquée 2 h à température de la pièce avec du lait 5 % dans le TBST (25 mM de Tris-HCl pH 7,5, 150 mM de NaCl et 0.05 % (v/v) de Tween 20). Pour détecter l'Angptl2 (endogène ou la protéine recombinante Angptl2-GST), la membrane doit impérativement être incubée 3 h à température de la pièce avec l'anticorps primaire spécifique pour l'Angptl2 (chèvre anti-Angptl2 (R&D) à une dilution de 1:200 dans du lait 5 % (w/v). Après trois lavages avec le TBST de 10 min, la membrane est re-incubée avec un anticorps secondaire conjugué à l'enzyme peroxydase (*horseradish peroxidase-conjugated*, Jackson Laboratories) dilué à 1:10000 dans du lait 5 % (w/v) à température de la pièce pendant 2 h. Finalement, trois lavages additionnels (de 10 min chaque) sont effectués avec du TBST et les bandes sont révélées par chemiluminescence (PerkinElmer) sur des films Biomax BML (Kodak). La quantité de protéines est normalisée avec le GAPDH (l'anticorps primaire anti-GAPDH est utilisé à une dilution de 1:10<sup>6</sup> dans du lait, Ambion). La quantification des résultats est faite avec le logiciel *Quantity One*.

#### **3.3.2.4. Migration des cellules endothéliales**

Afin de valider le rôle chimio-attractant de l'Angptl2-GST, nous avons testé sa capacité à induire la migration des HUVEC à l'aide d'une microchambre (Bernatchez *et al.*, 2003). Cette expérience utilise une plaque à 48 puits (Figure 25) avec deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable de polycarbonate d'une porosité de 0,8 µm (Neuro Probe Inc). Les cellules déposées dans la chambre supérieure adhèrent à la surface de la membrane. Les agents chimio-attracteurs (VEGF ou Angptl2) sont déposés dans la chambre inférieure de la plaque. La migration dure 1 h dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO<sub>2</sub> (dans l'incubateur de cellules). Les cellules qui ne migrent pas restent collées sur la surface supérieure de la membrane, elles sont

éliminées doucement à l'aide d'un coton-tige. Celles qui ont migré se retrouvent du côté inférieur de la membrane. La membrane est recueillie et les cellules sont fixées, colorées et comptées (voir ci-bas).

Dans notre expérience, l'Angptl2 (1 nM) ou le VEGF (25 nM) ont été utilisés comme agents chimio-attracteurs dans le compartiment inférieur de la plaque, dans un volume de 50  $\mu$ l de milieu de culture sans sérum. Les cellules endothéliales (HUVEC) sont mises en suspension avec la trypsine et diluées dans le milieu de culture sans sérum à une concentration de  $10^6$  cellules / ml. Vingt  $\mu$ l de cette suspension sont déposés dans le compartiment supérieur de la plaque. Une fois migrées pendant 1 h à 37 °C, les cellules sont fixées et colorées en utilisant le kit *Diff-Quick staining kit* (Fisher Scientific). La membrane est séchée toute la nuit à température de la pièce, puis montée sur une lame de microscope où est déposée une goutte d'huile. La quantification du nombre de cellules ayant migré est faite dans cinq champs différents de la lame, sous microscope (objectif 40 X). Chaque condition est répétée en duplicata et une migration sans aucun agent chimio-attracteur représente la condition contrôle de l'expérience.



**Figure 25** Schéma de la microchambre utilisée

(Tirée du site internet :

<http://media.wiley.com/CurrentProtocols/IM/im0612/im0612-fig-0001-1-full.gif>)

### 3.3.2.5. Formation des tubules dans le Matrigel

Nous avons validé par cette approche le rôle pro-angiogénique de l'Angptl2-GST recombinante:  $2 \times 10^5$  de cellules (HUVEC) sont déposés par puits (plaque à 24 puits) tapissé de Matrigel. Après 24 heures, le milieu est remplacé par un milieu frais contenant de l'Angptl2 (1 nM) ou du VEGF (25 nM). Vingt-quatre heures plus tard, la formation des tubules est photographiée à l'aide d'une caméra *via* le logiciel *BTV Pro*.

La quantification des tubules formés est faite dans cinq champs représentatifs, par condition.

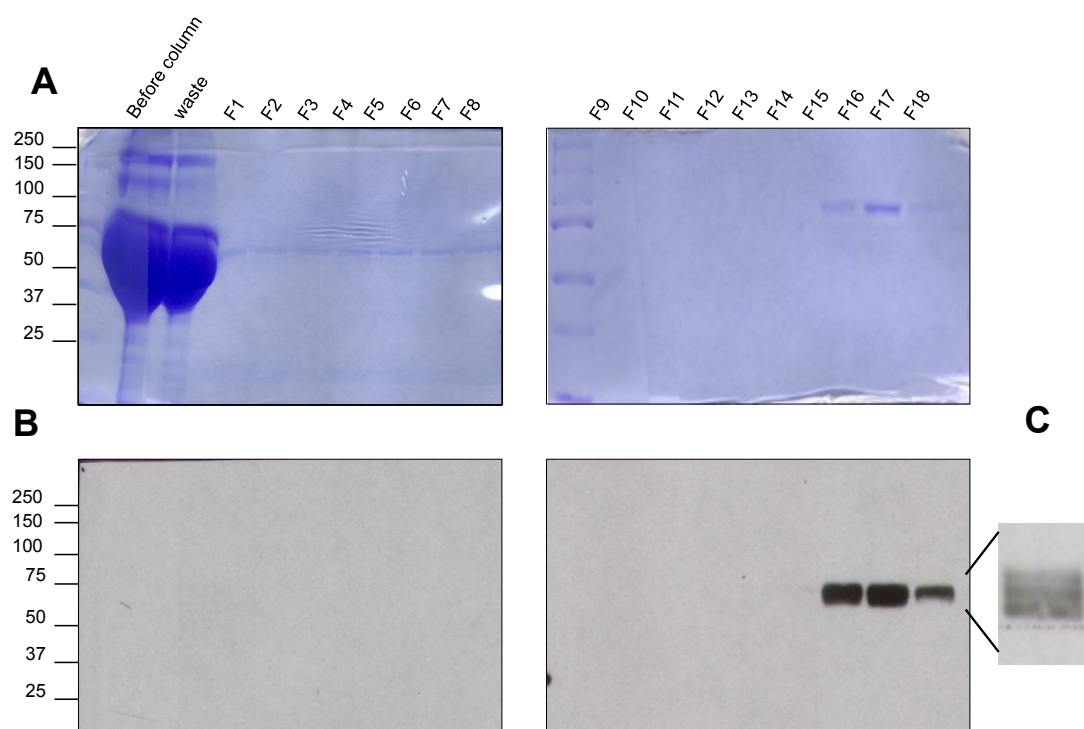
### 3.3.3. Résultats

#### *Expression et purification de la protéine recombinante Angptl2-GST*

Les cellules HEK 293 ont été transfectées de façon stable avec le cDNA codant la protéine chimérique d'Angptl2-GST. Une fois sécrétée par les cellules HEK 293, la protéine Angptl2-GST a été purifiée sur une colonne de chromatographie d'affinité (Figure 26).

La protéine recombinante migre à un poids moléculaire de ~90 kDa qui correspond au poids moléculaire calculé de l'Angptl2 (64 kDa) combinée à la GST (28 kDa). L'identité de la protéine a été validée par spectrométrie de masse, réalisée par la plateforme protéomique de l'IRIC (Montréal). La pureté des fractions récupérées par FPLC a été validée sur un gel d'acrylamide et à l'aide du bleu de coomassie, un colorant protéique non spécifique (Figure 26 A) ainsi que par le Sypro Ruby, en mesurant la densité optique de la bande. Les fractions qui contiennent notre protéine d'intérêt (Angptl2-GST) sont pures à > 95% (Figure 26A). De plus, la spécificité de la protéine obtenue à 90 kDa a été confirmée par immunobuvardage de type Western avec un anticorps dirigé spécifiquement contre l'Angptl2. La Figure 26B démontre clairement la présence exclusive d'une seule protéine qui correspond à l'Angptl2 avec l'étiquette GST.

Le rendement de la purification est de l'ordre de 25 µg / litre de milieu de culture de cellules HEK 293 chargé sur la colonne d'affinité. Entre 2 et 2,5 litres de milieu de culture sont passés sur la colonne pour chaque lot de purification d'Angptl2-GST, ce qui correspond à environ six semaines de récupération du milieu de culture, si nous excluons le temps nécessaire pour préparer le clone stable des cellules HEK 293 transfectées (un procédé qui peut excéder deux mois).



**Figure 26** Purification de la protéine recombinante Angptl2-GST

Les fractions obtenues suite à la purification de l'Angptl2-GST par chromatographie d'affinité ont été testées sur un gel de SDS-PAGE pour la qualité/la pureté (A) et la spécificité (B). (A) Coloration du gel SDS-PAGE avec le bleu de Coomassie: le premier puits représente le standard de poids moléculaire (de 25 kDa à 250 kDa), le 2e puits (dans le premier gel) représente les protéines totales qui se trouvent dans l'échantillon avant l'étape de purification, le 3e puits correspond aux protéines qui n'ont pas accroché aux billes de Sépharose. Les puits suivants représentent les fractions obtenues suite à l'élution de la colonne d'affinité (au total, 20 fractions ont été récupérées, F1-F18). La bande du bleu de Coomassie a été coupée et vérifiée par séquençage protéomique par Chromatographie phase liquide/spectrométrie de masse en tandem (LC/MS-MS). (B) Une détection par immunobuvardage de type Western pour les mêmes échantillons étudiés en (A) en utilisant un anticorps spécifiquement dirigé contre la forme humaine de l'Angptl2. (C) La glycoprotéine purifiée démontre trois bandes sur le gel de SDS-PAGE.



### ***L'Angptl2-GST purifiée par FPLC est glycosylée***

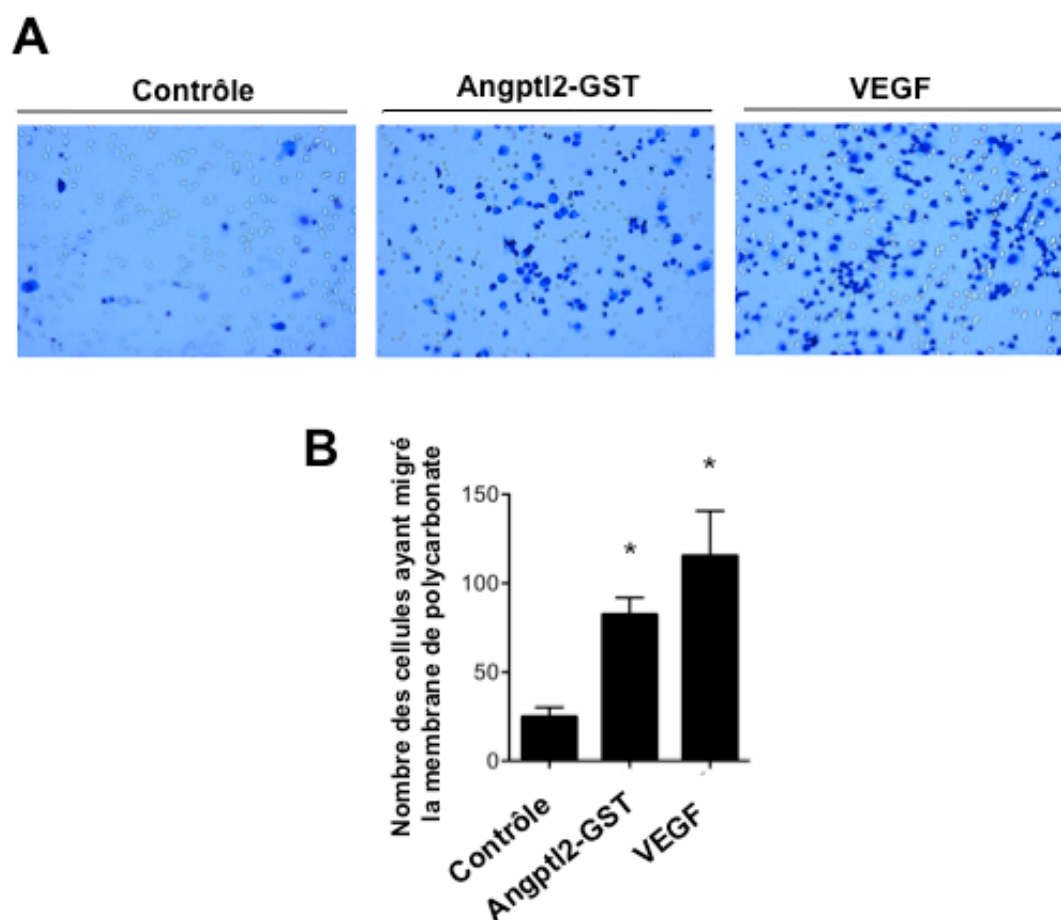
La forme purifiée de l'Angptl2 présente trois bandes sur le gel de SDS-PAGE (Figure 26C), qui correspondent aux différentes formes glycosylées de l'Angptl2. La présence de ces modifications post-transcriptionnelles donne à l'Angptl2 (57 kDa) un poids moléculaire apparent par électrophorèse de > 64 kDa (Miida *et al.*, 2010). La protéine obtenue suite à la purification par FPLC a été séquencée par spectroscopie de masse (LC-MS/MS) (données non présentées). Afin de confirmer que le changement de la masse est bien dû à la glycosylation de l'Angptl2, la protéine a été déglycosylée à l'aide de l'enzyme N-glycosidase : une fois déglycosylée, l'Angptl2 migre comme une simple bande à 57 kDa (données non montrées). Ces données prouvent que la protéine recombinante purifiée Angptl-GST est une glycoprotéine, similaire à la forme endogène native de l'Angptl2.

### ***Vérification des effets pro-angiogéniques de l'Angptl2-GST recombinante***

Dans le but de vérifier que notre protéine recombinante purifiée est fonctionnelle, nous avons validé sa capacité à induire la migration des CE ainsi que sa propriété angiogénique à former des tubules par les CE.

#### ***a) L'Angptl2-GST est un chemoattracteur pour les cellules endothéliales***

La Figure 27 montre l'Angptl2-GST stimule la migration des HUVEC (de  $25 \pm 5$  à  $82 \pm 10$  cellules/champ,  $p < 0.05$ ), avec un potentiel attracteur comparable à celui du VEGF (de  $25 \pm 5$  à  $115 \pm 26$  cellules/champ,  $p < 0.05$ ). Des résultats similaires ont été obtenus avec des HMAEC (données non présentées).



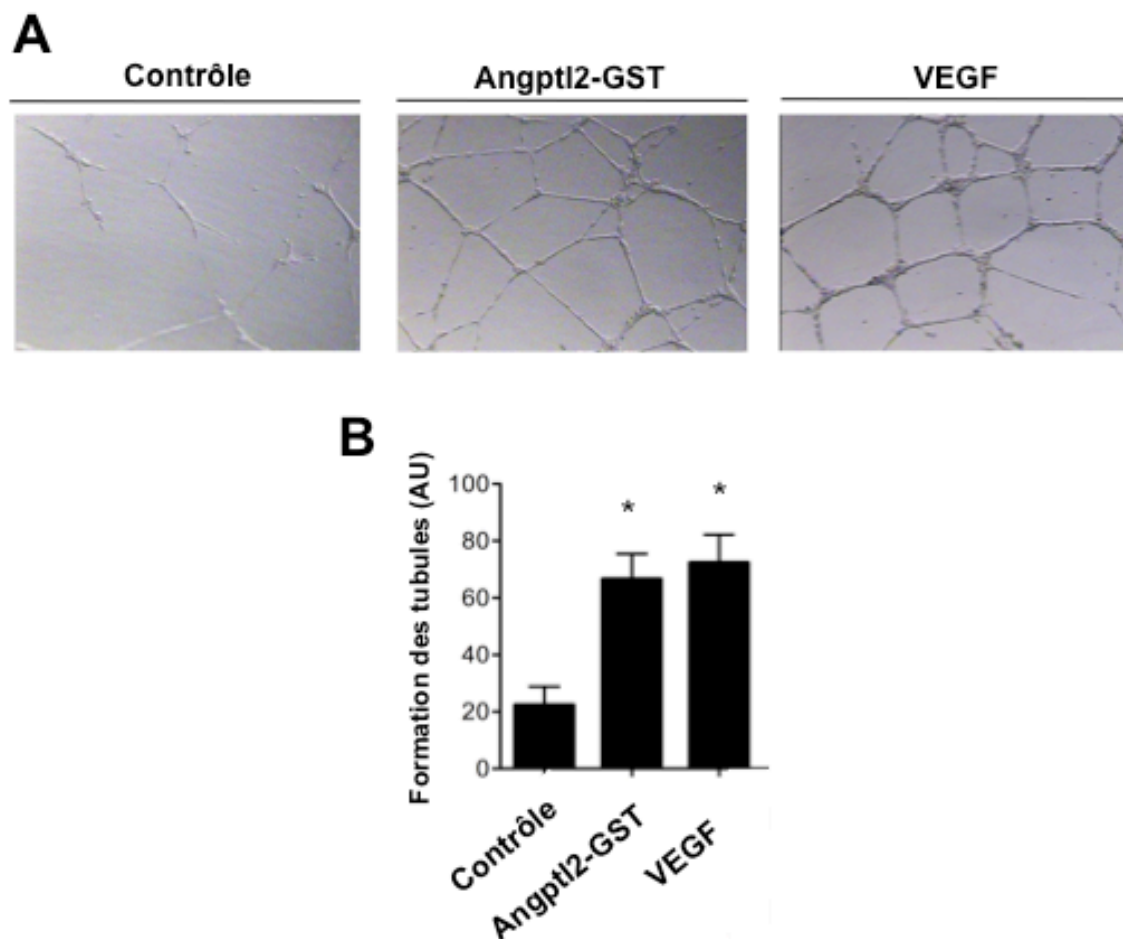
**Figure 27** L'Angptl2-GST induit la migration des CE

(A) Images de cellules par contraste de phase illustrant la migration des HUVEC à travers une membrane semi-perméable de polycarbonate dans les conditions suivantes : milieu de culture vide (Contrôle), supplémenté avec 1 nM d'Angptl2-GST ou 25 nM de VEGF. (B) Représentation graphique du nombre moyen de cellules ayant migré à travers la membrane de polycarbonate pour quatre différentes expériences. Pour chaque expérience, les données sont présentées comme la moyenne ( $\pm$  SEM) du nombre des cellules dans 5 différents champs choisis au hasard et chaque condition a été réalisée en duplicata. \* :  $p < 0,05$  versus Contrôle.

***b) L'Angptl2-GST stimule la formation de tubules***

Après 48 h de stimulation avec l'Angptl2-GST, la formation de tubules entre les HUVEC cultivées sur une surface de Matrigel est augmentée (de  $22 \pm 7$  à  $67 \pm 9$  AU,

$p < 0.05$ ) (Figure 28). Le VEGF induit la formation de tubule de façon similaire à l'Angptl2-GST (de  $22 \pm 7$  à  $72 \pm 10$  AU,  $p < 0.05$ ) (Figure 28).



**Figure 28** L'Angptl2-GST induit la formation des tubules.

(A) La capacité des HUVEC à former un réseau tubulaire a été visualisée par microscopie inversée (grossissement de 400 X). Les HUVEC ont été cultivées sur un gel épais de Matrigel (dans des plaques de 6 puits) pendant 24 h à 37°C. Les HUVEC ont été ensuite stimulées, ou pas (Contrôle), pour 48 h avec 1 nM d'Angptl2-GST ou avec 25 nM de VEGF. (B) Quantification des données illustrées en (A) pour  $n=4$  différentes expériences. Le nombre des points focaux d'adhésion a été compté (dans 5 différents champs choisis au hasard) et la moyenne ( $\pm$  SEM) des points de croisement des tubules par champ est représentée. \* :  $p < 0,05$  versus Contrôle.

Les résultats obtenus suggèrent fortement que l'Angptl2-GST purifiée conserve son activité pro-angiogénique et que cette protéine recombinante glycosylée est fonctionnelle.

### 3.3.4. Discussion

Dans cette partie, nous avons caractérisé la protéine recombinante Angptl2-GST exprimée dans des cellules HEK 293 et purifiée sur une colonne d'affinité. La protéine recombinante Angptl2-GST obtenue possède *in vitro* les propriétés pro-angiogéniques et chimio-attractantes spécifiques à la forme endogène native.

Les études de caractérisation de la fonction biologique *versus* pathologique d'une protéine incluent souvent le gain de fonction de la protéine d'intérêt, or ceci est difficile à réaliser lorsque la protéine en question n'est pas disponible commercialement. Jusqu'à présent, deux compagnies fabriquent une forme recombinante de l'Angptl2, mais malheureusement la forme commerciale disponible n'est pas glycosylée. Ces compagnies ont utilisé des cellules transgéniques dérivées des plantes pour la production d'Angptl2, puisque c'est un procédé peu coûteux qui permet une grande productivité (Ma *et al.*, 2003). Cependant, même si les cellules dérivées de plantes sont capables de glycosyler certaines de leurs protéines endogènes (Ma *et al.*, 2003), elles ne possèdent pas les sucres complexes nécessaires pour assurer les modifications post-transcriptionnelles caractéristiques des glycoprotéines eucaryotes. Pour fabriquer une protéine recombinante fonctionnelle de l'Angptl2, il est donc impératif d'utiliser un système eucaryote. Cependant, l'inconvénient majeur de cette approche est le faible rendement (25 µg/L de milieu de culture). Il est évident que, d'un point de vue purement commercial, ce n'est pas rentable.

Nous avons donc adapté une stratégie de synthèse de l'Angptl2-GST dans les cellules HEK 293, puis nous avons optimisé sa purification avec un système de FPLC dans le but de générer une forme active et fonctionnelle de l'Angptl2-GST. Une fois obtenue, la pureté ainsi que la spécificité de cette glycoprotéine ont été validées sur gel

d'acrylamide. De plus, nous nous sommes assurés de l'identité de la bande obtenue par spectroscopie de masse.

Nous avons ensuite vérifié la fonctionnalité de l'Angptl2-GST obtenue en testant son effet sur des aspects fonctionnels déjà connus dans la littérature. En effet, plusieurs études confirment un rôle pro-angiogénique de l'Angptl2: cette protéine stimule la formation de nouveaux vaisseaux sanguins chez le poisson zèbre (Kubota *et al.*, 2005a), elle est impliquée dans la maturation des vaisseaux sanguins et elle stimule l'artériogénèse chez la souris (Tabata *et al.*, 2009). Les études réalisées sur des cellules en culture démontrent également que l'Angptl2 possède une activité chimio-attractrice sur des monocytes/macrophages (Tabata *et al.*, 2009), elle stimule la formation des structures tubulaires dans les HUVEC (Kim *et al.*, 1999b) et l'expansion des cellules souches hématopoïétiques (Zhang *et al.*, 2006a). En accord avec ces études, la protéine Angptl2-GST que nous avons fabriquée conserve un effet chimio-attractant, de façon comparable au facteur de référence, le VEGF, et elle induit la formation de structures tubulaires dans des HUVEC cultivées sur du Matrigel, une couche semblable à la matrice extracellulaire. Ces données permettent d'affirmer que notre protéine Angptl2-GST est fonctionnelle et qu'elle peut être utilisée afin d'étudier son implication physiologique/pathologique.

En conclusion, nous avons optimisé la production de la protéine recombinante de l'Angptl2-GST par un système de cellules mammifères tel que les cellules HEK 293 qui assurent les modifications post-transcriptionnelles indispensables au maintien des propriétés de l'Angptl2.

### **3.4. Étude 4 (Étude en cours)**

**L'Angptl2 stimule la production d'espèces réactives oxygénées  
et inhibe la voie cytoprotectrice contrôlée par Nrf2 dans les  
cellules endothéliales humaines.**

### 3.4.1. Introduction

Le stress oxydant, étroitement lié aux processus d'inflammation, d'ischémie/hypoxie et de dysfonction endothéliale, est propice au développement des maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose (Zhang, 2008). Produites à un niveau faible, les ROS sont utiles pour le bon fonctionnement cellulaire car elles participent aux mécanismes de transduction du signal et de l'expression génique (Ray *et al.*, 2012); les ROS sont aussi impliquées dans les phénomènes physiologiques tels que l'apoptose, l'adhésion des monocytes aux CE et l'agrégation des plaquettes (Apel *et al.*, 2004; Thannickal *et al.*, 2000). Alors qu'une balance dynamique entre la production de radicaux libres et leur clairance est critique pour maintenir l'homéostasie cellulaire, un déséquilibre dans leur système de régulation est à l'origine de dommages pathologiques souvent irréversibles, comme dans le cas de l'athérosclérose (Vogiatzi *et al.*, 2009). En effet, les ROS, qui diffusent facilement aux tissus avoisinants, attaquent les lipides, les protéines et l'ADN et sont impliquées dans les complications de toutes les étapes de l'athérosclérose (Purushothaman *et al.*, 2007).

La cellule dispose de systèmes antioxydants endogènes afin de contrebalancer les effets des ROS (Thannickal *et al.*, 2000). Parmi d'autres, l'hème oxygénase (HO) est une enzyme endogène cytoprotectrice (Stocker *et al.*, 2006). De très nombreux travaux démontrent une surproduction de HO-1 après une stimulation cellulaire, ce qui représenterait un état d'alerte à court terme, alors que dans les cas d'inflammation et de stress oxydant sévères, une diminution drastique du niveau intracellulaire de HO-1 est observée (Immenschuh *et al.*, 2006; Pellacani *et al.*, 1998). L'activité de cette enzyme est régulée principalement au niveau de la transcription de son gène par l'intermédiaire de certains facteurs de transcription dont le plus connu est le facteur Nrf2 (le facteur relié au NF-E2, *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) (Satoh *et al.*, 2006). En effet, le promoteur du gène HO-1 contient deux motifs cis « *enhancer* » en amont du site d'initiation de la transcription, un élément de réponse au stress (StRE, *stress response element*) et un élément de réponse aux antioxydants (ARE, *antioxidative response element*).

La production du facteur de transcription Nrf2 est une réponse au stress oxydant et à l'inflammation; Nrf2 joue un rôle puissant dans la détoxification cellulaire (Singh *et al.*, 2010). Au repos, Nrf2 est séquestré dans le cytoplasme par liaison à son inhibiteur endogène Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*), une protéine associée au cytosquelette: le complexe Keap1/Nrf2 est un senseur cellulaire (Jaiswal, 2004). Une stimulation pro-oxydante modérée lève cette répression de Nrf2 *via* un mécanisme de dégradation de Keap1, résultant ainsi en une augmentation de la stabilité de la protéine Nrf2 (Jaiswal, 2004). La stabilité de Nrf2 ainsi que son activité transcriptionnelle sont régulées par la protéine stabilisatrice de Nrf2, DJ-1 (Shinkai *et al.*, 2012; van Horsen *et al.*, 2010). DJ-1 est une protéine ubiquitaire et multifonctionnelle qui, en plus d'être une protéine d'échafaudage coactivatrice transcriptionnelle de Nrf2, se lie sur Nrf2 dans le cytosol facilitant ainsi sa migration vers le noyau (Bitar *et al.*, 2012) où elle s'associe aux éléments ARE/StRE et active la transcription d'une batterie de gènes cibles codants pour des protéines cytoprotectrices, dont HO-1 (Singh *et al.*, 2010). En plus du contrôle de la stabilité de Nrf2 par Keap1 et DJ-1, Nrf2 serait aussi régulé par phosphorylation *via* les différentes protéines des voies MAPK (protéine kinase activée par le mitogène, *Mitogen-Activated Protein Kinase*) (McCubrey *et al.*, 2006; Owuor *et al.*, 2002; Pearson *et al.*, 2001).

Les voies MAPK sont un vaste mécanisme de signalisation intracellulaire complexe. De façon simplifiée, il existe trois voies majeures de MAPK : la voie ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase1/2*) la voie JNK (*c-jun N-terminal kinase*) et la voie p38 kinase (Pearson *et al.*, 2001). Ces cascades de kinases sont activées entre autres par des signaux inflammatoires (par exemple TNF- $\alpha$ , IL1 et IL6) et par le stress. Dans nos études précédentes, nous avons montré que l'ARN messager de l'Angptl2 est 6 fois plus exprimé dans les CE isolées chez des patients coronariens atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique, en association avec un niveau élevé de stress oxydant et d'inflammation (Farhat *et al.*, 2008). De plus, l'expression endothéliale de l'Angptl2 est associée à une forte activation de l'Akt (Kubota *et al.*, 2005b), connue dans le processus d'inflammation (Foster *et al.*, 2012). L'expression endothéliale de l'Angptl2 semble donc être directement liée à l'environnement oxydant et inflammatoire des cellules. Cependant, bien que les fonctions inflammatoires de l'Angptl2 soient



relativement bien connues (section 1.4.3.), l'impact de l'Angptl2 dans le processus d'oxydation n'a jamais été étudié. Notre hypothèse est que l'Angptl2 est pro-oxydante, *via* une production de ROS et une répression du facteur de transcription antioxydant Nrf2.

### **3.4.2. Matériel et méthodes**

#### **3.4.2.1. Culture cellulaire**

Toutes les expériences ont été réalisées sur des HUVEC (Lonza) en culture, au troisième passage. Les cellules ont été cultivées dans un milieu supplémenté avec du FBS (1%), des facteurs de croissance spécifiques aux CE et des antibiotiques fournis dans le kit de culture des CE (Lonza). Les cellules ont été incubées pendant 16 h dans un médium sans sérum avant d'être stimulées par l'Angptl2.

#### **3.4.2.2. Production de ROS**

La mesure de la production de ROS dans des HUVEC vivantes a été effectuée en suivant le protocole décrit dans notre Étude 2 (section 3.2.2.) (Farhat *et al.*, 2008) avec quelques modifications. Brièvement, des HUVEC ont été chargées avec 5  $\mu$ M de CM-H<sub>2</sub>DCFDA dans un milieu de culture sans phénol rouge, pendant 30 min à 37°C, puis lavées deux fois et laissées 15 min à 37°C. Pendant cette période, les cellules ont été pré-incubées pendant 30 min (dernières 15 min de l'incubation avec le CM-H<sub>2</sub>DCFDA et pendant les 15 min de repos) avec l'inhibiteur de la voie MAP kinase p38 (SB202190 à une concentration de 10  $\mu$ M). La fluorescence a été observée à 488 nm par microscopie confocale (microscope LSM 710 Zeiss). Les mêmes paramètres de capture d'image ont été utilisés pour toutes les expériences: objectif 63x7.4 plan-Apochromat à l'huile, laser Argon 488 nm, 0.1% de transmission; miroir dichroïque HFT 488 avec un filtre LP505, pinhole de 1.7 Airy units. La fluorescence basale des cellules (avant l'addition de l'Angptl2) a été considérée comme le contrôle négatif. La fluorescence a été mesurée pendant les 30 premières secondes puis 100 nM d'Angptl2 (10  $\mu$ l) ont été

ajoutés sur les HUVEC et les images ont été capturées pendant 7-10 min. A la fin de chaque expérience, 1mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été ajouté afin de déterminer le signal maximal.

#### **3.4.2.3. Extraction d'ARN et réaction RT**

L'extraction d'ARN et la réaction de transcription inverse ont été réalisées en suivant le protocole décrit dans les sections 3.1.2.2.1 et 3.1.2.2.2 de l'étude 2. Brièvement, l'ARN total a été extrait à partir des HUVEC en culture en utilisant le Kit Mini RNeasy (Qiagen) et la contamination d'ADN a été éliminée par une digestion avec de la DNase I (Qiagen), selon les instructions du fabricant. La concentration totale de l'ARN a été quantifiée en utilisant un spectrophotomètre ND-100 NanoDrop. L'ARN total a été ensuite transcrit par une réaction de transcription inverse, selon le protocole du fabricant: 1 µg d'ARN total a été mélangé avec 100 µg de Pd(N)<sub>6</sub> et 1 µl de dNTP (10 mM) dans un volume total de 12 µl. Les échantillons ont été incubés à 65°C pendant 5 min. Puis, 4 µl du tampon 5X First-Standard, 2 µl de DTT (0,1 M), 1 µl de RNase out et 1 µl de l'enzyme M-MLV ont été ajoutés. La réaction a été incubée 60 min à 37°C. La réaction de RT a été arrêtée par chauffage à 70°C pendant 15 min.

#### **3.4.2.4. Quantification de l'expression génique par PCR en temps réel (QPCR)**

La quantification des gènes IL-6, TNF- $\alpha$ , VEGF, HO-1, Nrf2 et GAPDH a été réalisée par la technique de QPCR décrite dans la section 3.1.2.5 de l'étude 2. Brièvement, le mélange réactionnel QPCR (volume de 25 µl) contenait 12,5 µl du «*Platinum SYBR Green QPCR SuperMix-UDG*» (Invitrogen), une concentration finale de 300 nM (2 µl) d'amorces sens et antisens spécifiques à chaque gène amplifié (Tableau VI), 0,5 µl du colorant de référence ROX (Invitrogen) et 1 ng (10 µl) de l'échantillon d'ADNc. Les réactions QPCR ont été effectuées en utilisant une plateforme MxPro3000 (Agilent) avec le profil suivant: première étape d'activation des enzymes (10 min à 95°C), puis 40 cycles de dénaturation (30 secondes à 95°C), hybridation (1 min à 55°C) et extension (1min à 72°C). Les amorces des gènes cibles ont été conçues en utilisant Clone Manager (Tableau VI). L'efficacité de la QPCR en temps réel a été calculée en utilisant une

courbe standard. La présence d'un produit valide a été confirmée par séquençage et par l'apparition d'un seul pic dans la courbe de dissociation. Tous les échantillons ont été réalisés en duplicata et les changements dans l'expression des gènes cibles ont été calculés en utilisant la méthode de  $\Delta\Delta CT$  avec le gène de ménage GAPDH.

**Tableau VI** Séquence des amorces utilisées en QPCR

Gènes	Séquence des amorces sens	Séquence des amorces antisens
<b>IL-6</b>	GACAGCCACTCACCTCTTCA	CACCAGGCAAGTCTCCTCAT
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	CTCTTCTGCCTGCTGCACTT	CTCTCAGCTCCACGCCATTG
<b>VEFG</b>	GAGGGCAGAATCATCACGAA	CATGGTGATGTTGGACTCCT
<b>HO-1</b>	TGCCAGTGCCACCAAGTTCAAG	AGCAGCTCCTGCAACTCCTCAA
<b>Nrf2</b>	TTCAGCCAGCCCAGCACATC	CGTAGCCGAAGAAACCTCATTGTC
<b>GAPDH</b>	TGAAGGTCGGAGTCAACGGA	CATTGATGACAAGCTTCCCG

#### 3.4.2.5. Quantification de l'expression protéique par immunobuvardage de type Western

Des HUVEC ont été cultivées dans des plaques à 6 puits jusqu'à 80-90% de confluence. Pour une stimulation à court terme avec l'Angptl2 (100 nM, pendant 10 min, 1 h ou 4 h), les HUVEC ont été préincubées pendant 16 h dans un milieu sans sérum. Cependant, pour une stimulation de 24 h, les HUVEC ont été préincubées seulement 4 h sans sérum puisque la stimulation avec l'Angptl2 se fait en absence de sérum. Pour chaque temps d'incubation, des HUVEC stimulées avec le tampon de dialyse (correspondant au lot d'Angptl2 utilisé), ou avec du milieu sans sérum, représentaient la condition contrôle. L'extraction des protéines cytosoliques et nucléaires a été réalisée en utilisant le kit d'extraction «*NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents*» (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole suggéré par la compagnie. Notons qu'il est impératif d'ajouter des inhibiteurs spécifiques pour bloquer les phosphatases et les protéases intracellulaires.

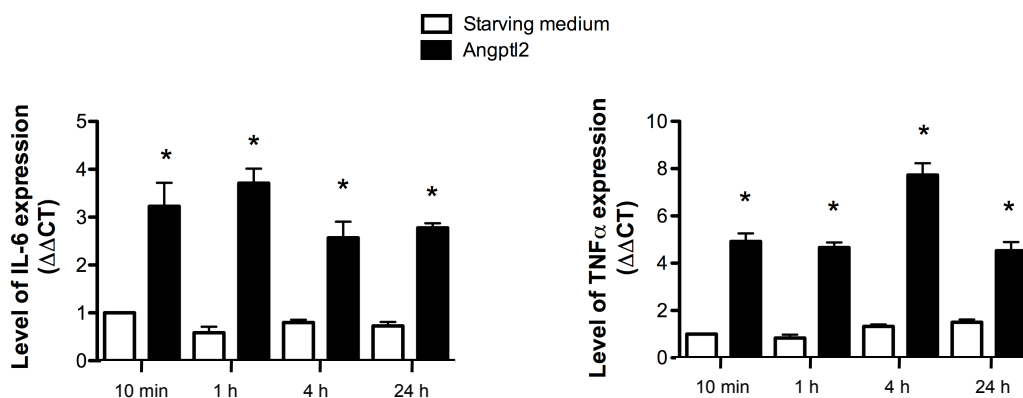
Brièvement, le jour de l'extraction, 100  $\mu$ l du tampon CRE I du kit d'extraction, 1  $\mu$ l du cocktail d'inhibiteurs de protéases (100X, Pierce Biotechnology), 1 mM d'EDTA, 10 mM d'EGTA et 1  $\mu$ M de microcystine ont été ajoutés à chaque puits et transférés dans un tube eppendorf. Le tube a été vigoureusement vortexé 15 sec et incubé pendant 10 min sur la glace. Puis, 5,5  $\mu$ l du tampon CER II du kit d'extraction ont été ajoutés et le mélange a été vortexé 15 sec et incubé 1 min sur la glace. Le tube a été ensuite centrifugé pendant 5 min à 13000 tours/min à 4°C. Le surnageant constitue la fraction cytosolique. Trente  $\mu$ l du tampon NER du kit d'extraction, 0,3  $\mu$ l du cocktail d'inhibiteurs de protéases (10X, Pierce Biotechnology), 1 mM d'EDTA, 10 mM d'EGTA et 1  $\mu$ M de microcystine ont été ajoutés au culot, vortexés pendant 15 sec et incubés sur la glace pendant 10 min. Cette dernière étape de vortex/incubation a été répétée quatre fois. Le tube a ensuite été centrifugé pendant 15 min à 13000 tours/min à 4°C. Le surnageant de cette étape constitue la fraction nucléaire. La quantité de protéines totales dans les deux fractions a été dosée par la technique de Bradford.

Pour chaque échantillon, 35  $\mu$ g et 20  $\mu$ g de protéines cytoplasmiques et nucléaires, respectivement, ont été utilisés lors de la technique d'immunobuvardage de type Western décrite en détails dans la section 3.3.2.3. Les membranes de nitrocellulose ont été incubées pendant 16 h avec les anticorps suivants : anti-Nrf2 de lapin (1:200, SantaCruz); anti-nucléoporine (Nup62) de souris (1:1000, Abcam); anti-Keap1 de chèvre (1:200, SantaCruz); anti-DJ-1 de chèvre (1:200, SantaCruz); anti-phospho-p38 de lapin (1:1000, Cell Signaling); anti-p38 de lapin (1:1000, Cell Signaling); anti-phospho-Hsp27 de lapin (1:1000, Cell Signaling); anti-GAPDH de souris (1:100000, Ambion).

### 3.4.3. Résultats

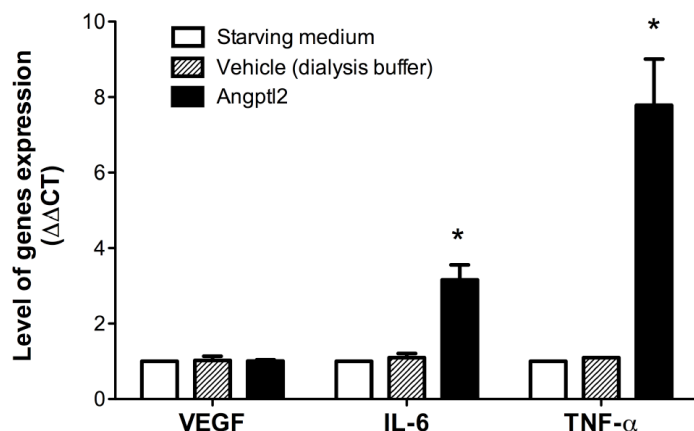
#### *L'Angptl2 est un facteur pro-inflammatoire*

Dans le but de confirmer l'effet pro-inflammatoire de l'Angptl2, des HUVEC ont été stimulées pendant 10 min, 1 h, 4 h ou 24 h avec 100 nM d'Angptl2 et le niveau d'expression des molécules inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL-6 a été évalué par PCR en temps-réel. L'Angptl2 augmente significativement l'expression de ces deux marqueurs d'inflammation, quelque soit le temps de stimulation (Figure 29). Afin de vérifier que ces réponses n'étaient pas indirectement induites par l'intermédiaire du VEGF, nous avons aussi examiné l'expression du gène codant pour le VEGF en présence d'Angptl2 (Figure 30). L'Angptl2 n'affecte pas l'expression du VEGF, suggérant que la réponse inflammatoire engendrée est spécifique à l'Angptl2.



**Figure 29** L'Angptl2 stimule l'expression génique des molécules inflammatoires

L'analyse quantitative par QPCR de l'expression génique de TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 a été effectuée sur des HUVEC en culture stimulées ou pas (milieu sans sérum) avec la protéine recombinante de l'Angptl2 (100 nM) pendant 10 minutes, 1 h, 4 h ou 24 h. Les résultats ont été normalisés à l'expression du gène GAPDH; la moyenne du niveau d'expression génique dans les cellules non stimulées (milieu sans sérum pendant 10 min) a été arbitrairement fixée à 1. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM de n=3 expériences. Chaque expérience a été effectuée en duplicata. \*:  $p < 0.05$  versus le milieu sans sérum (condition pairée pour chaque temps de stimulation).

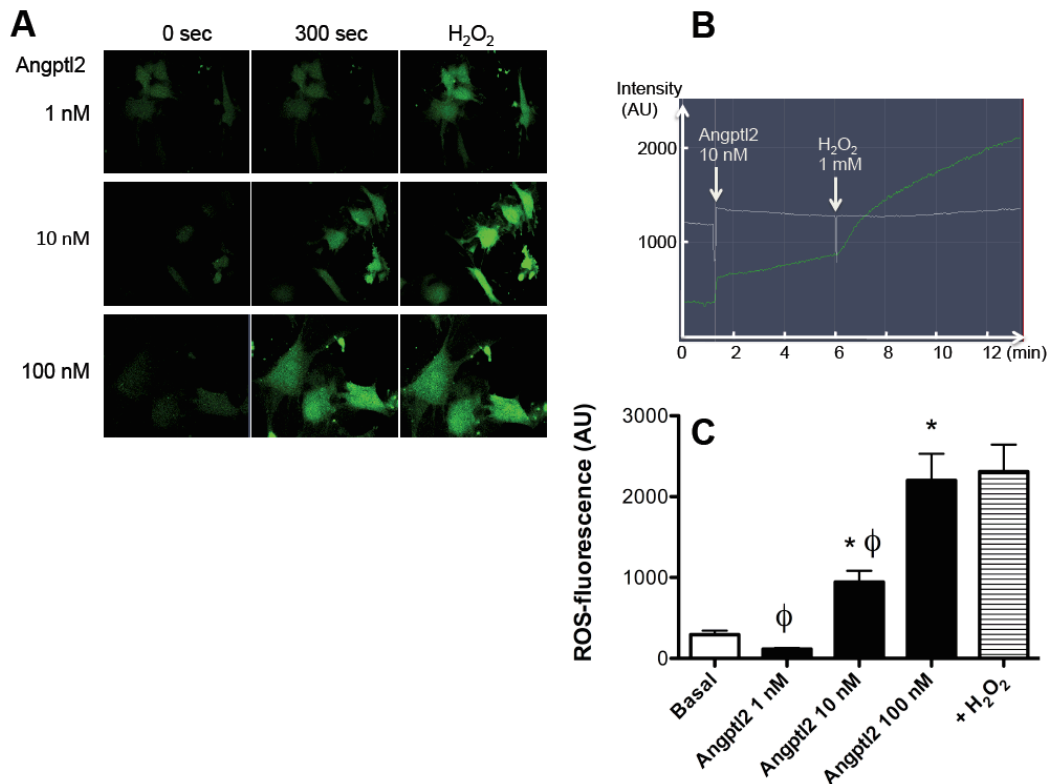


**Figure 30** L'Angptl2 stimule l'expression génique des molécules inflammatoires indépendamment du VEGF.

L'analyse quantitative par QPCR de l'expression génique de VEGF, TNF- $\alpha$  et de l'IL-6 a été effectuée sur des HUVEC en culture stimulées ou pas (milieu sans sérum ou tampon de dialyse de l'Angptl2) avec la protéine recombinante de l'Angptl2 (100 nM) pendant 10 minutes. Les résultats ont été normalisés à l'expression du gène GAPDH; la moyenne du niveau d'expression génique dans les cellules non stimulées (milieu sans sérum) a été arbitrairement fixée à 1. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM de n=3 expériences. Chaque expérience a été effectuée en duplicata. \*:  $p < 0.05$  *versus* le milieu sans sérum.

### ***L'Angptl2 est un facteur pro-oxydant***

L'ajout d'Angptl2 dans des HUVEC marquées au CM-H<sub>2</sub>DCFDA, une sonde fluorescente pour détecter les ROS de façon non spécifique, engendre une production instantanée et durable de ROS en fonction de la concentration d'Angptl2 (Figure 31). La concentration de 100 nM d'Angptl2 induit une production massive de ROS dont les effets sont comparables à ceux obtenus avec 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

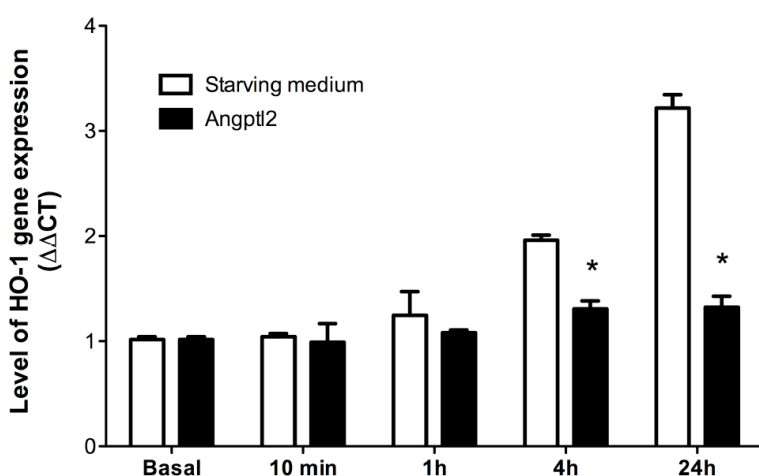


**Figure 31** L'Angptl2 induit une production de ROS dans les HUVEC vivantes.

(A) Images confocales représentant le niveau de fluorescence/ROS dans les HUVEC avant (niveau de base, 0 sec) et après (à 300 sec) l'ajout de la protéine recombinante d'Angptl2 à 1, 10 ou 100 nM. Un signal maximal de ROS a été obtenu en traitant les HUVEC avec 1 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (B) Représentation de la cinétique du signal fluorescent dans des HUVEC vivantes. Dans cet exemple, la production de ROS a été suivie pendant 5 min en présence de 10 nM d'Angptl2, puis pendant une période de 7 min après addition de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM). (C) Effet dose-dépendant de l'Angptl2 sur la production (effet maximal) de ROS. À 100 nM, l'Angptl2 induit une production de ROS comparable à celle induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les données sont des moyennes ± SEM. Chaque expérience a été répétée 2 à 3 fois, et 6 cellules au minimum ont été analysées individuellement par condition. \*: p<0.05 *versus* la condition basale; Φ: p<0.05 *versus* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### *L'Angptl2 inhibe l'expression de HO-1*

Nos résultats confirment les données publiées dans la littérature (Chang *et al.*, 2002): en réponse à une exposition prolongée (4 et 24 h) à un milieu de culture sans sérum, les cellules surexpriment le gène HO-1 (Figure 32). Cette réponse est complètement bloquée par l'addition d'Angptl2, suggérant qu'à long terme l'Angptl2 diminue la résistance au stress dans les CE (Figure 32).



**Figure 32** Une stimulation prolongée des HUVEC avec l'Angptl2 inhibe l'expression de HO-1 induite par la privation de sérum.

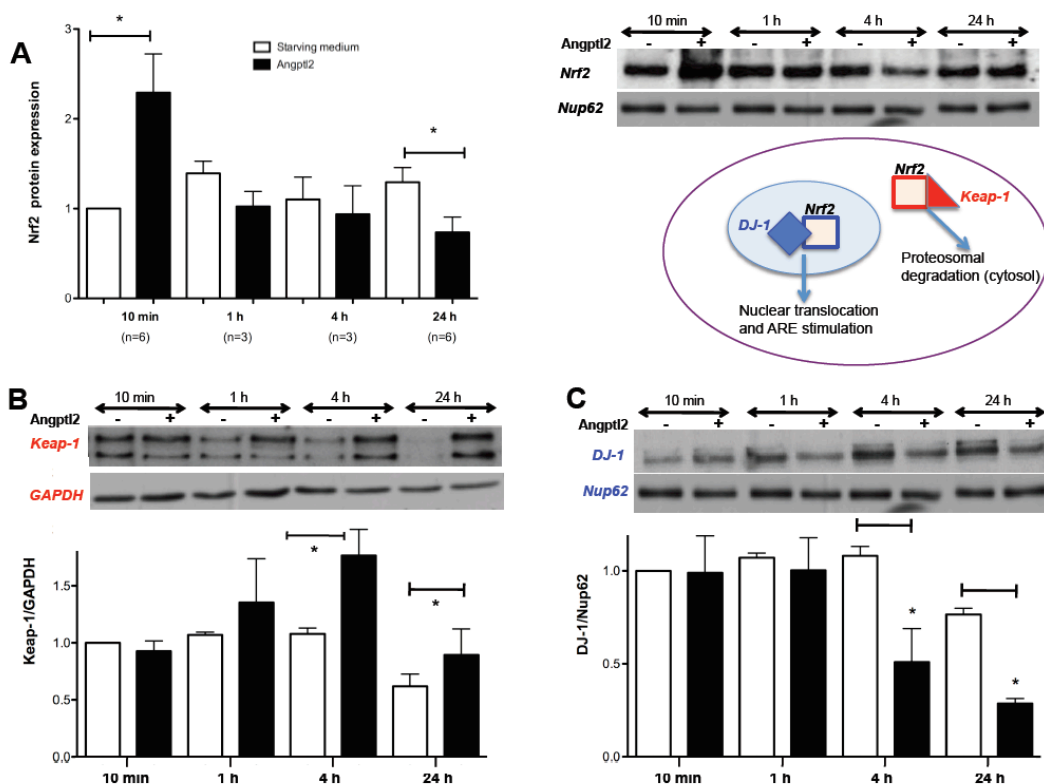
L'expression du gène HO-1 a été analysée par QPCR en temps réel dans des HUVEC stimulées ou pas (milieu sans sérum) avec la protéine recombinante de l'Angptl2 (100 nM) pendant 10 min, 1 h, 4 h et 24 h. Les résultats ont été normalisés avec le GAPDH de chaque échantillon; la condition contrôle (milieu sans sérum, condition basale) a arbitrairement été fixée à 1. Les données sont des moyennes  $\pm$  SEM de  $n=4$ . Chaque expérience a été effectuée en duplicata. \*:  $p < 0.05$  versus le milieu sans sérum.



***L'Angptl2 induit une translocation nucléaire de Nrf2 à court terme, mais une inhibition à long terme***

La protéine Nrf2 contient 605 a.a. et a un poids moléculaire théorique de 66 kDa. Cependant, la présence d'a.a. hautement acides retarde la migration de la protéine sur un gel d'acrylamide dénaturant, donnant ainsi une bande de 98 kDa (Sun *et al.*, 2008). L'exposition des HUVEC avec de l'Angptl2 produit une réponse biphasique sur la translocalisation nucléaire de Nrf2, dépendamment de la durée de stimulation: une accumulation de Nrf2 est observée dans le noyau des HUVEC après une stimulation de 10 min (Figure 33). En revanche, une baisse du niveau nucléaire de Nrf2 est observée suite à une incubation prolongée (24 h) avec l'Angptl2 (Figure 33). Cette inactivation de Nrf2 concorde avec l'inhibition de HO-1 observée après 24 h de stimulation à l'Angptl2 (Figure 32).

Le facteur de transcription Nrf2 est contrôlé au niveau de sa stabilité par Keap1 qui inhibe Nrf2 par ubiquitinylation et par DJ-1 qui stabilise Nrf2 afin de favoriser sa translocalisation nucléaire (Shinkai *et al.*, 2012; van Horssen *et al.*, 2010). Sur des HUVEC stimulées à l'Angptl2, le profil de migration de la protéine Keap1 montre la présence de deux formes: une forme réduite migrant selon le poids moléculaire théorique de 71 kDa et une forme oxydée à mobilité électrophorétique plus lente. Cette dernière est responsable de la dégradation de Nrf2 par le protéasome. La Figure 33B illustre qu'en absence de stimulation, la protéine Keap1 est majoritairement sous sa forme réduite; en revanche lorsque les HUVEC sont traitées pendant 4 ou 24 h avec l'Angptl2, Keap1 est sous sa forme oxydée. Parallèlement, une diminution de la quantité de protéine stabilisatrice DJ-1 est observée suite à une incubation prolongée avec l'Angptl2 (Figure 33C). Nos résultats suggèrent que l'inhibition à long terme de la translocalisation nucléaire de Nrf2 est régulée, du moins en partie, par ses deux adaptateurs Keap1 et DJ-1.



**Figure 33** Une stimulation aigüe des HUVEC avec l'Angptl2 stimule la translocation nucléaire de Nrf2 alors qu'une stimulation prolongée l'inhibe.

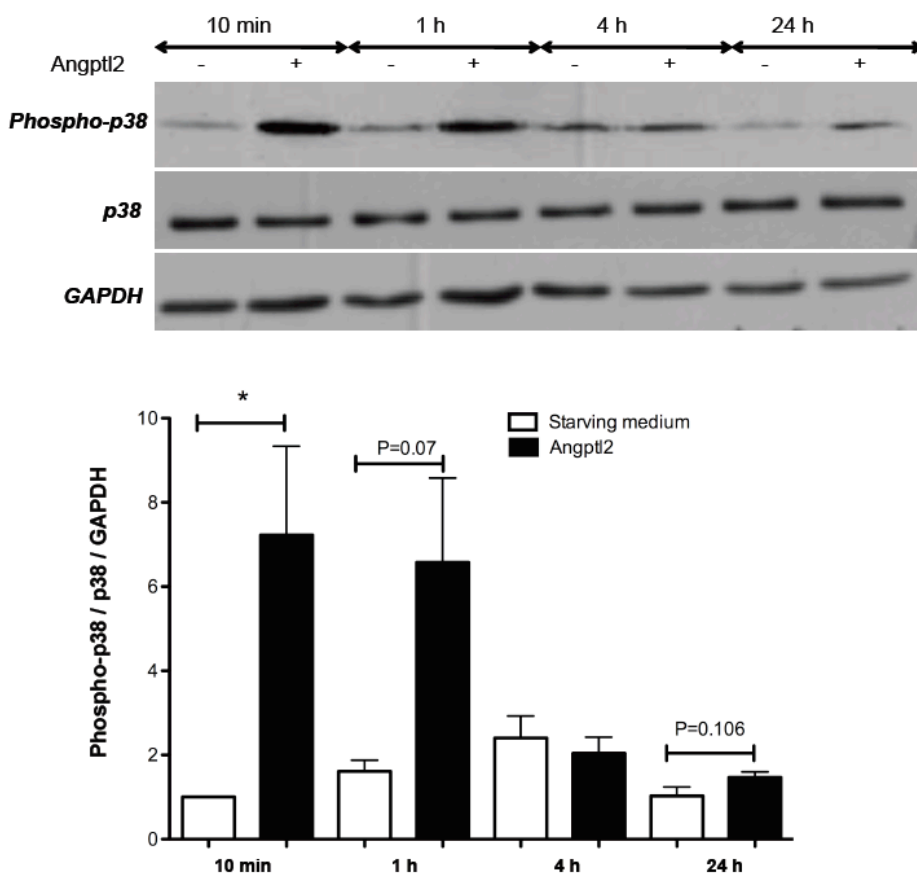
Des HUVEC ont été exposées ou pas (milieu sans sérum) à 100 nM d'Angptl2 pour 10 min, 1 h, 4 h et 24 h puis lysées et les protéines cytosoliques et nucléaires ont été extraites séparément. **(A)** Le niveau de Nrf2 dans les fractions nucléaires a été révélé par immunobuvardage de type Western avec un anticorps spécifique dirigé contre la forme entière de Nrf2. La cinétique de translocalisation de Nrf2 a été normalisée par rapport à l'expression de la nucléopore 62 (Nup62) dans les mêmes échantillons. Le niveau de Nrf2 dans le noyau des HUVEC non stimulées (milieu sans sérum pour 10 min) a été arbitrairement fixé à 1. **(B)** Le ratio cytosolique des deux formes [oxydée (82 kDa)/réduite (71 kDa)] de l'inhibiteur Keap1 a été normalisé par le GAPDH. Le niveau de Keap1 dans le cytosol des HUVEC non stimulées (milieu sans sérum pour 10 min) a été fixé à 1. **(C)** Le niveau d'expression nucléaire du stabilisateur DJ-1 a été normalisé par la Nup62. Le niveau de DJ-1 dans le noyau des HUVEC non stimulées (milieu sans sérum pour 10 min) a été fixé à 1. Les données sont des moyennes $\pm$ SEM de n=3 ou 6 expériences. \*:  $p < 0.05$  versus le milieu sans sérum.

***L'Angptl2 déclenche la voie des kinases induites par le stress, la voie MAP kinase p38***

A l'état basal, p38 est majoritairement présente dans les HUVEC sous sa forme inactive et non phosphorylée; en présence d'Angptl2, pour une durée de 10 min, la phosphorylation de p38 est fortement stimulée (Figure 34). Cette activation persiste après 1h d'exposition à l'Angptl2, mais s'atténue après 4 et 24 h de stimulation (Figure 34).

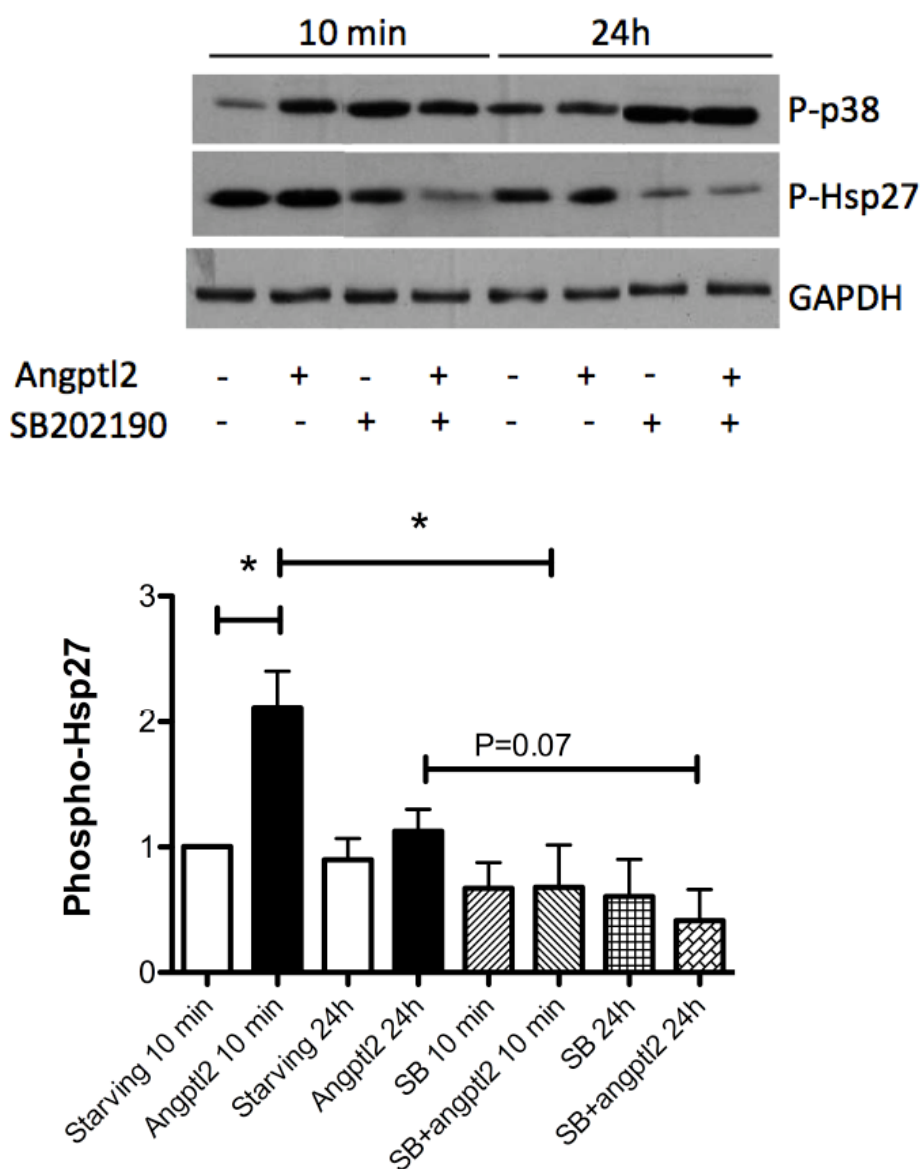
Afin de déterminer si cette activation de p38 est en lien avec la production de ROS et la modulation de Nrf2, nous avons testé l'effet d'un inhibiteur pharmacologique de la voie de p38, le SB202190.

Puisque la protéine Hsp27 est un substrat pour la MAP kinase p38, nous avons tout d'abord validé que le composé SB202190 était efficace pour bloquer son activité, dans notre modèle d'HUVEC en culture. En accord avec les données obtenues pour p38 (Figure 34), 10 min d'exposition à l'Angptl2 stimulent la phosphorylation de Hsp27, mais 24 h tendent seulement à l'activer (Figure 35). SB202190 bloque complètement la phosphorylation de Hsp27 engendrée par l'Angptl2 après 10 min et tend à diminuer celle observée après 24 h d'exposition à l'Angptl2 (Figure 35). Ces données suggèrent que le SB202190 inhibe efficacement la voie de la MAP kinase p38.



**Figure 34** Effet du temps d'exposition des HUVEC à l'Angptl2 sur l'activation de la voie MAP kinase p38.

Un immunobuvardage de type Western de la protéine phospho-p38 MAPK et de la protéine totale p38 MAPK a été effectué sur un lysat de HUVEC stimulées ou pas (milieu sans sérum) pendant 10 min, 1 h, 4 h et 24 h en présence de 100 nM d'Angptl2. Les résultats de la forme phosphorylée ont été normalisés à l'expression de la forme totale de p38 MAPK et au niveau de GAPDH. Le niveau de phospho-p38 MAPK dans les HUVEC non stimulées (milieu sans sérum pour 10 min) a été fixé à 1. Les données sont des moyennes $\pm$ SEM de n=3 (1h et 4h de stimulation) à 6 (10 min et 24h de stimulation) expériences. \*:  $p < 0.05$  *versus* le milieu sans sérum.

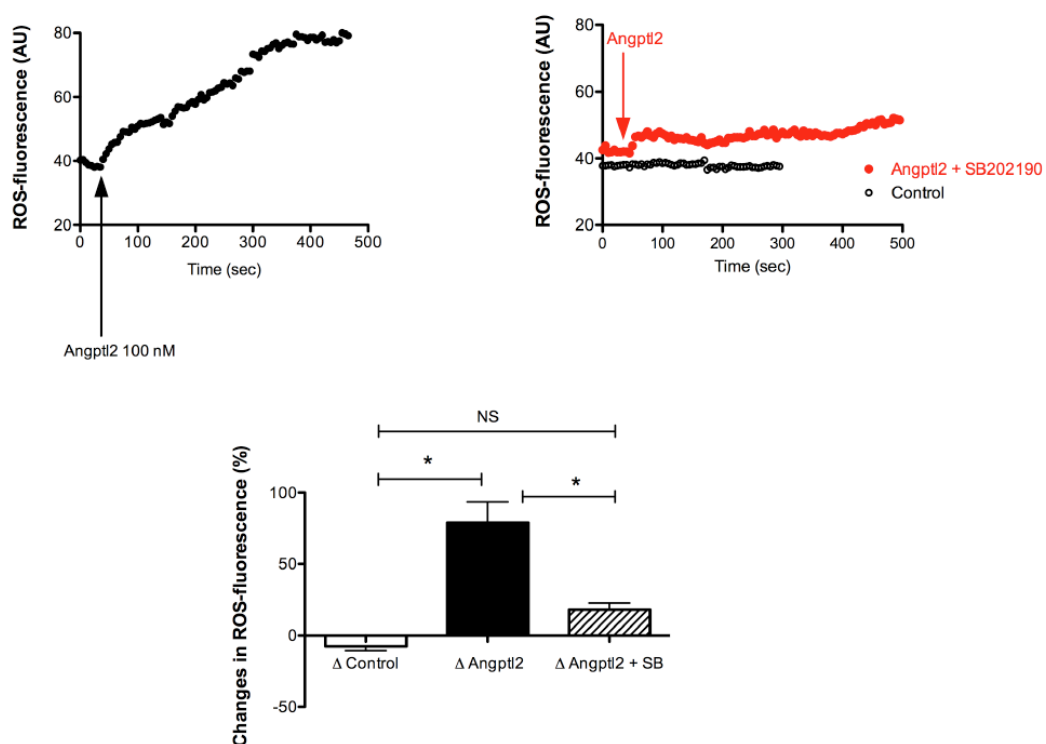


**Figure 35** Effet de l'inhibiteur de la voie MAP kinase p38, SB202190, sur l'activation de Hsp27 induite par l'Angptl2.

Un immunobuvardage de type Western de la protéine phospho-p38 (P-p38) et de la protéine totale phospho-Hsp27 (P-Hsp27) a été effectué sur un lysat de HUVEC stimulées ou pas (milieu sans sérum) pendant 10 min ou 24 h en présence de 100 nM d'Angptl2, seule ou combinée au SB202190. Les résultats de la forme phosphorylée ont été normalisés à l'expression de la forme totale et au niveau de GAPDH. Le niveau de phospho-Hsp27 dans les HUVEC non stimulées (milieu sans sérum pour 10 min) a été fixé à 1. Les données sont des moyennes $\pm$ SEM de n=3 expériences. \*: p < 0.05.

### *La voie MAP kinase p38 joue un rôle dans l'accumulation de ROS induite par l'Angptl2*

L'exposition des HUVEC vivantes avec 100 nM d'Angptl2 augmente de 80% le niveau intracellulaire de ROS ( $\Delta$  Angptl2) comparativement aux HUVEC incubées 5 min avec le véhicule de l'Angptl2 ( $\Delta$  Control) (Figure 36). L'inhibiteur de la voie MAP kinase p38, le SB202190, réduit significativement le signal ROS ( $\Delta$  Angptl2 + SB, Figure 36). Ces résultats suggèrent que l'Angptl2 emprunte, du moins partiellement, la voie de signalisation MAP kinase p38 pour stimuler la formation des ROS dans les HUVEC.



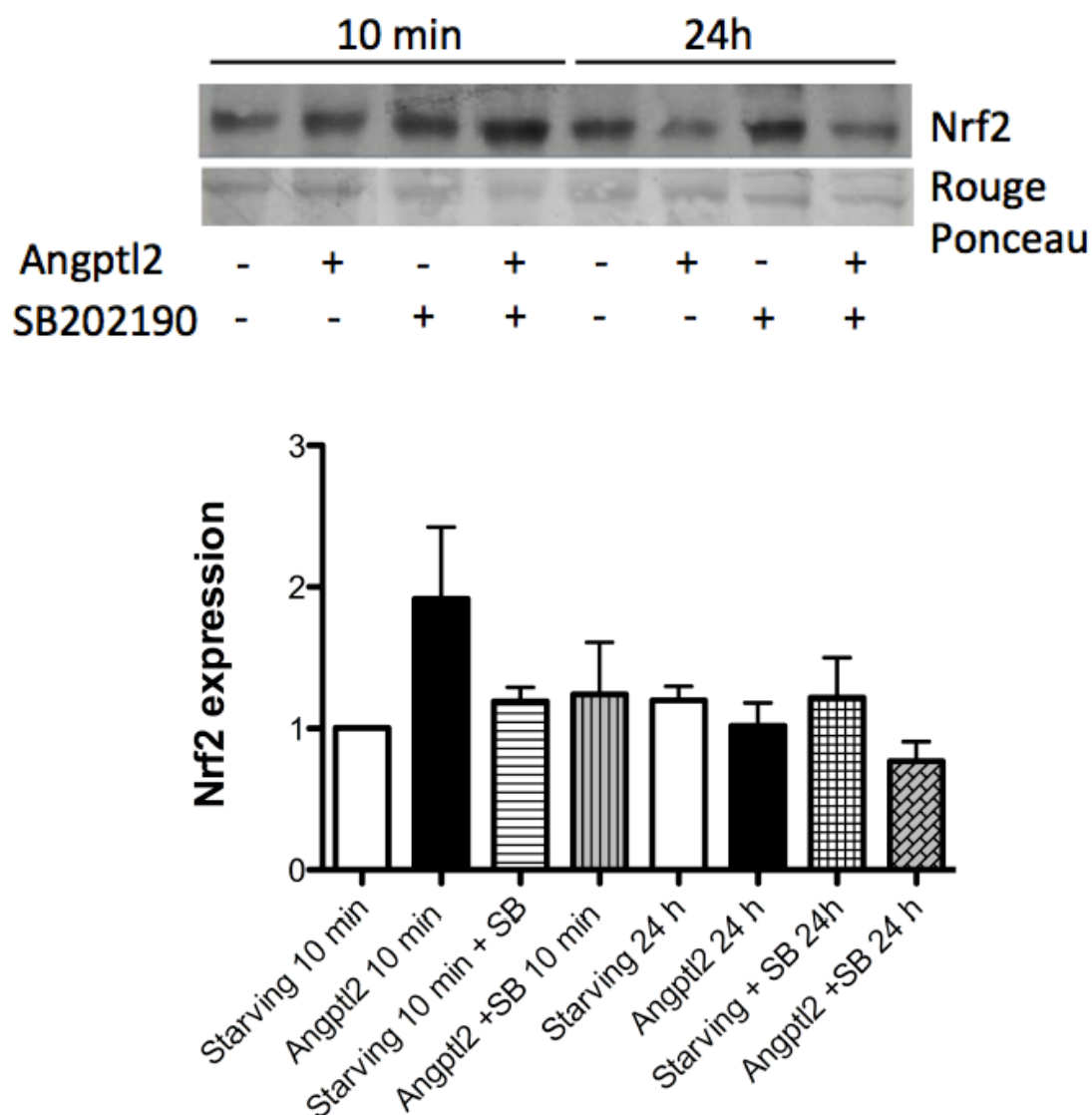
**Figure 36** Un traitement avec l'inhibiteur de la voie MAP kinase p38, le SB201290, réduit la production de ROS par l'Angptl2 dans les HUVEC.

*Panneaux du haut:* Cinétiques de l'induction du signal fluorescent (pendant 500 sec) dans des HUVEC vivantes, préincubées ou pas avec le SB202190 pendant 30 min en présence de 5  $\mu$ M de CM-H<sub>2</sub>DCFDA dans un milieu de culture sans phénol rouge. Après une période de repos (15 min), le signal fluorescent a été enregistré avant et après l'ajout de 100 nM d'Angptl2 (indiqué par la flèche).

*Panneaux du bas:* La différence (en %, représentée par le symbole  $\Delta$ ) entre le niveau basal de fluorescence et après 5 min d'exposition à l'Angptl2 a été quantifiée dans des HUVEC non stimulées ( $\Delta$  Control), stimulées 5 min avec l'Angptl2 ( $\Delta$  Angptl2) ou prétraitées avec l'inhibiteur de la voie MAP kinase p38 et ensuite stimulées 5 min avec l'Angptl2 ( $\Delta$  Angptl2 + SB). Les données sont des moyennes  $\pm$ SEM. Chaque expérience a été répétée 2 à 4 fois, et au moins 4 cellules ont été analysées individuellement par condition. \*:  $p < 0.05$  versus l'Angptl2. NS : statistiquement non significatif.

***La voie MAP kinase p38 semble jouer un rôle dans la régulation de Nrf2 par l'Angptl2***

Le bloqueur de MAP kinase p38 tend à diminuer l'expression nucléaire de Nrf2 induite par 10 min d'Angptl2 (augmentation de Nrf2 non significative,  $n=3$ ) (Figure 37). Les données sont moins claires après 24 h. Ces données préliminaires doivent donc être répétées afin de conclure quel est le rôle de la voie MAP kinase p38 dans la modulation de l'expression de Nrf2 par l'Angptl2, à court terme et de façon chronique.



**Figure 37** Effet de l'inhibition de la voie MAP kinase p38 sur la régulation de Nrf2 par l'Angptl2.

Un immunobuvardage de type Western de la protéine Nrf2 a été effectué sur des fractions nucléaires extraites des HUVEC stimulées ou pas pendant 10 min et 24h en présence ou pas de 100 nM d'Angptl2, seule ou combinée à l'inhibiteur de MAP kinase p38 (SB202190). Les résultats de Nrf2 ont été normalisés au rouge Ponceau; le niveau d'expression de Nrf2 chez des HUVEC non stimulées (milieu sans sérum pendant 10 min) a été fixée à 1. Les données sont des moyennes  $\pm$ SEM. L'expérience a été validée trois fois (n=3).



### 3.4.4. Discussion

En plus de confirmer son effet pro-inflammatoire (Kikuchi *et al.*, 2008; Tabata *et al.*, 2009), nous démontrons pour la première fois, qu'une exposition des CE à l'Angptl2 engendre une production instantanée et soutenue de ROS par la voie MAP kinase p38, du moins en partie. Nous proposons un mécanisme de signalisation intracellulaire qui pourrait mener aux effets pro-oxydants de l'Angptl2 : à court terme, la production de ROS engendrée par l'Angptl2 est accompagnée par une accumulation nucléaire de Nrf2 et une activation de la voie MAP kinase p38 (augmentation du niveau des phospho-p38 et phospho-Hsp27), sans toutefois produire un changement de Keap1, DJ-1 ou même de HO-1. Cependant, suite à une incubation plus prolongée avec l'Angptl2, l'expression nucléaire de Nrf2 diminue et le niveau de HO-1 est lui aussi baissé. Ces changements semblent être contrôlés par Keap1 et DJ-1, contribuant ainsi à maintenir un stress oxydant élevé. En revanche, l'activité de la MAP kinase p38 ne semble pas augmentée après 24h de stimulation avec l'Angptl2 et SB202190 n'a aucun effet convainquant sur Nrf2. En conséquence, le mécanisme intracellulaire derrière l'effet pro-oxydant de l'Angptl2 est complexe et nécessite des études complémentaires.

Dans la littérature, très peu d'études se sont consacrées à la fonction physiologique ou pathologique de l'Angptl2 chez l'Homme. L'Angptl2 semble contribuer à la pathogénèse de maladies chroniques inflammatoires (voir section 1.4.3. pour plus de détails) mais à ce jour, les propriétés pro-oxydantes de l'Angptl2 n'ont jamais été rapportées. Nous sommes les premiers à démontrer que l'Angptl2 stimule une forte et rapide (de l'ordre de quelques secondes) formation de ROS dans les HUVEC. Le lien entre l'Angptl2 et le stress oxydant était déjà suggéré dans nos études antérieures puisque nous avons démontré que 1) l'Angptl2 est sécrétée préférentiellement dans les conditions pro-oxydantes et pro-inflammatoires tel que dans notre modèle de CE sénescents cultivées à partir d'artères mammaires internes de patients coronariens (hIMAEC), 2) le profil d'expression génique des hIMAEC est drastiquement altéré comparativement à celui de cellules saines (Voghel *et al.*, 2007), associé à un faible degré de défense antioxydante endogène (Farhat *et al.*, 2008), et à une sénescence précoce (étude 1), 3) un traitement des hIMAEC avec un agent antioxydant ralentit

l'entrée en sénescence de ces cellules (Voghel *et al.*, 2008b) et baisse l'expression d'Angptl2 (étude 1). Nos données sont en accord avec celles publiées par l'équipe du Dr Oike qui a observé une diminution significative du niveau circulant d'Angptl2 chez des patients diabétiques traités avec le pioglitazone, un inhibiteur des récepteurs PPAR $\gamma$  et un puissant antioxydant (Tabata *et al.*, 2009). Dans l'ensemble, nos résultats démontrent un effet dose-dépendant de l'Angptl2 sur la production de ROS. De plus, un environnement pro-oxydant induit l'expression d'Angptl2, suggérant ainsi la présence d'un cercle vicieux entre l'abondance d'Angptl2 et la production de ROS.

Des études fort intéressantes montrent que chez les souris *knock-out* pour Keap1, Nrf2 s'accumule massivement dans le noyau de différents types cellulaires tels que les CE et les fibroblastes; cependant, des réponses opposées sont observées à long terme (après quelques mois), soit une sensibilité accrue au stress oxydatif et une apoptose cellulaire (Strachan *et al.*, 2005; Velichkova *et al.*, 2005). Ces résultats, confirmés par des études cellulaires (Jaiswal, 2004), ont été les premiers à suggérer que la présence nucléaire de Nrf2 est régulée de façon positive et négative : l'activation aiguë et modérée de Nrf2 (par des stimuli pro-oxydants) induit une sur-activation des gènes possédant l'élément ARE et une réponse anti-oxydante, alors qu'une exposition chronique régule Nrf2 à la baisse résultant en une diminution de l'expression des gènes cytoprotecteurs (Jain *et al.*, 2006; Jaiswal, 2004). Nos données démontrent que l'Angptl2 est un stimulus qui régule Nrf2 selon ce profil biphasique: l'Angptl2 en aiguë active la translocalisation nucléaire de Nrf2 alors qu'une exposition prolongée à l'Angptl2 l'inhibe. Notons que chez les patients atteints de MPOC, l'exposition à la fumée de cigarette module également l'activité de Nrf2 de façon biphasique (Boutten *et al.*, 2010). D'autre part, nous avons démontré que le tabagisme, et la MPOC en particulier, stimulent l'expression d'Angptl2 dans des CE (Farhat *et al.*, 2008). Ces résultats soulèvent une question importante : certaines des effets néfastes de la fumée de cigarette, qui produit un environnement cellulaire pro-oxydant et pro-inflammatoire, passent-ils par l'intermédiaire de l'Angptl2? Des études complémentaires sont nécessaires pour pouvoir répondre à cette question. On pourrait par exemple tester l'effet de l'exposition à la fumée de cigarette dans un modèle de souris *knock-out* pour l'Angptl2.

Nous avons également identifié les protéines adaptatrices Keap1 et DJ-1 comme des partenaires potentiels dans la régulation de Nrf2 par l'Angptl2. En effet, Keap1 est une protéine adaptatrice qui conduit Nrf2 vers sa dégradation par le protéasome (Shinkai *et al.*, 2012). DJ-1, quant à elle, a été identifiée comme une protéine cytoprotectrice face au stress oxydant, elle se lie au Nrf2 pour faciliter sa translocalisation vers le noyau (van Horssen *et al.*, 2010). Nos résultats montrent clairement que l'Angptl2 promeut l'état oxydé de Keap1, ce qui favorise sa liaison à Nrf2 et facilite la dégradation de ce dernier. En parallèle, l'Angptl2 diminue l'expression de la protéine stabilisatrice DJ-1. L'augmentation de Keap1 et la diminution de DJ-1 inhibent l'activation des gènes cibles de Nrf2 et donc l'expression d'enzymes antioxydantes telles que HO-1. En conséquence, cette inhibition prolongée de Nrf2 par l'Angptl2 pourrait contribuer à maintenir un stress oxydant élevé et néfaste aux fonctions cellulaires.

En plus de sa modulation par les protéines adaptatrices, Nrf2 est également contrôlé par phosphorylation. La voie MAPK *via* p38 semblerait participer à la régulation de Nrf2; cependant les données de la littérature (Owuor *et al.*, 2002) sont contradictoires, spécifiques au contexte, rendant la compréhension de ce mécanisme difficile. Malheureusement, nos résultats ne nous permettent pas encore d'affirmer que la voie MAP kinase p38 est responsable de la modulation de Nrf2 par l'Angptl2. Cependant, la diminution de la production de ROS en présence de l'inhibiteur de cette voie (SB202190) et la tendance à l'inhibition de l'activation à court terme de Nrf2 par l'Angptl2 en présence de SB202190 suggèrent que la voie MAP kinase p38 pourrait jouer un rôle dans la propagation de la réponse à l'Angptl2. Le rôle de la MAP kinase p38 dans l'inhibition à long terme de Nrf2 par l'Angptl2 reste à être démontré.

En conclusion, nos résultats démontrent que l'Angptl2 promeut la formation de ROS dans les HUVEC. Cette nouvelle propriété de l'Angptl2 associée à son implication dans les processus d'inflammation renforce l'hypothèse qu'un niveau élevé d'Angptl2 est néfaste pour les cellules et contribue au développement de maladies chroniques.

### **3.5. Étude 5 : Deuxième Article**

**(Résultats publiés)**

**Angiopoietin-like2 promotes atherogenesis in mice**

### 3.5.1. Apport original et contribution des coauteurs

Nada Farhat, Nathalie Thorin-Trescases, Maya Mamarbachi, Louis Villeneuve, Carol Yu, Cécile Martel, Natacha Duquette, Mathieu Gayda, Anil Nigam, Martin Juneau, Bruce G. Allen et Eric Thorin (2013). Angiopoietin-like 2 promotes atherogenesis in mice. *JAHA* (in press).

Ce manuscrit a été accepté pour publication dans la revue scientifique *Journal of American Heart Association* le 10 avril 2013.

**Nada Farhat** : Conception et design expérimental, cueillette des données, analyse des données, interprétation des résultats, préparation des figures, rédaction du manuscrit, revision et correction du manuscrit et approbation de la version finale de manuscrit.

**Nathalie Thorin-Trescases** : Conception et design expérimental, analyse des données, interprétation des résultats, préparation des figures, rédaction du manuscrit, revision et correction du manuscrit et approbation de la version finale de manuscrit.

**Maya Mamarbachi**: Cueillette des données, analyse des données et approbation de la version finale de manuscrit.

**Louis Villeneuve**: Cueillette des données, analyse des données et approbation de la version finale de manuscrit.

**Carol Yu**: Cueillette des données, analyse des données et approbation de la version finale de manuscrit.

**Cécile Martel**: Préparation d'une partie de la protéine recombinante d'Angptl2 et approbation de la version finale de manuscrit.

**Natacha Duquette:** Cueillette des données et approbation de la version finale de manuscrit.

**Mathieu Gayda:** Conception et design expérimental chez l'humain et approbation de la version finale de manuscrit.

**Anil Nigam:** Conception et design expérimental chez l'humain, interprétation des résultats, correction du manuscrit et approbation de la version finale de manuscrit.

**Martin Juneau:** Conception et design expérimental chez l'humain, interprétation des résultats, correction du manuscrit et approbation de la version finale de manuscrit.

**Bruce G. Allen:** Conception et design expérimental, interprétation des résultats, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale de manuscrit.

**Eric Thorin:** Conception et design expérimental, analyse des données, interprétation des résultats, révision et correction du manuscrit, approbation de la version finale de manuscrit.

### 3.5.2. Manuscript

## **Angiopoietin-like 2 promotes atherogenesis in mice**

*Farhat, Angiopoietin-like 2 is pro-atherogenic*

Nada Farhat (MSc)<sup>1</sup>, Nathalie Thorin-Trescases (PhD)\*, Maya Mamarbachi (MSc)\*, Louis Villeneuve (MSc)\*, Carol Yu (MSc)<sup>1</sup>, Cécile Martel (PhD)<sup>1</sup>, Natacha Duquette (MSc)\*, Mathieu Gayda (PhD)<sup>2</sup>, Anil Nigam (MD)<sup>2</sup>, Martin Juneau (MD)<sup>2</sup>, Bruce G. Allen (PhD)<sup>2</sup> and Eric Thorin (PhD)<sup>1,3</sup>

Departments of Pharmacology<sup>1</sup>, Medicine<sup>2</sup>, Surgery<sup>3</sup>, Université de Montréal, Montreal Heart Institute\*, Centre de recherche, Montreal, Quebec, Canada.

Corresponding author:

Dr. Eric Thorin, Montreal Heart Institute, Centre de recherche, 5000, rue Bélanger, Montréal, Québec, H1T 1C8, Canada.

Tel.: +1 (514) 376-3330; fax: +1 (514) 376-1355

Journal Subject Codes: [95], [96], [97], [145] and [147]

## Abstract

*Background* Angiopoietin like-2 (angptl2), a pro-inflammatory protein, is overexpressed in endothelial cells (EC) from patients with coronary artery disease (CAD). Whether angptl2 contributes to atherogenesis is unknown. We tested the hypothesis that angptl2 promotes inflammation and leukocyte adhesion onto EC, thereby accelerating atherogenesis in pre-atherosclerotic dyslipidemic mice.

*Methods and Results* In EC freshly isolated from the aorta, basal expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA was higher in 3-month old (mo) severely dyslipidemic mice (LDLR<sup>-/-</sup>; hApoB<sub>100</sub><sup>+/+</sup>; ATX) than in control healthy wild type (WT) mice (p<0.05) and was increased in both groups by exogenous angptl2 (100 nmol/L). Angptl2 stimulated the adhesion of leukocytes *ex vivo* on the native aortic endothelium of ATX, but not WT mice, in association with a higher expression of ICAM-1 and P-selectin in EC (p<0.05). Antibodies against these endothelial adhesion molecules prevented leukocyte adhesion. Intravenous administration of angptl2 for 1 month in pre-atherosclerotic 3-mo ATX mice increased (p<0.05) total- and LDL-cholesterol levels, strongly induced (p<0.05) the expression of endothelial pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules while accelerating atherosclerotic lesion formation by 10 fold (p<0.05). Plasma and aortic tissue levels of angptl2 increased (p<0.05) with age and were higher in 6- and 12-mo ATX mice than in age-matched WT mice. Angptl2 accumulated to high levels in the atherosclerotic lesion (p<0.05). Finally, angptl2 was greatly expressed (p<0.05) in EC cultured from CAD patients and circulating angptl2 levels were 6-fold higher in CAD patients compared to age-matched healthy volunteers.

*Conclusion* Angptl2 contributes to the pathogenesis of atherosclerosis.

Key words: Adhesion molecules, aging, inflammation, freshly isolated mouse endothelial cells, mouse model of atherosclerosis, CAD.



## Introduction

Angiopoietin-like (angptl) proteins are a new family of angiogenic factors composed of eight members (angptl1 to 8) (Hato *et al.*, 2008; Morisada *et al.*, 2006a; Quagliarini *et al.*, 2012). Of these, angptl3 (Ando *et al.*, 2003; Kathiresan *et al.*, 2008), angptl4 (Adachi *et al.*, 2009) and angptl6 (Oike *et al.*, 2005b; Oike *et al.*, 2009a) regulate lipid and energy metabolism and could therefore contribute to the regulation of the cardiovascular functions as well as influence the progression of cardiovascular diseases, including atherosclerosis (Miida *et al.*, 2010; Oike *et al.*, 2009a). Angptl2 is a circulating glycoprotein with abundant expression in the heart, adipose tissue, lung, kidney and skeletal muscle (Kim *et al.*, 1999b; Tabata *et al.*, 2009). Its expression is stimulated by hypoxia (Oike *et al.*, 2009a; Tabata *et al.*, 2009) and it induces angiogenesis and endothelial cell (EC) migration (Morisada *et al.*, 2006a; Oike *et al.*, 2004a; Tabata *et al.*, 2009). Over-expression of angptl2 is pro-inflammatory in keratinocytes, in adipose tissue and in EC (Hato *et al.*, 2008; Tabata *et al.*, 2009). In both mouse and human, circulating levels of angptl2 correlate with inflammation, adiposity and insulin resistance (Doi *et al.*, 2012; Tabata *et al.*, 2009). We previously reported a 4-fold increase of mRNA levels of angptl2 in EC isolated from arteries of active smokers with severe coronary artery disease (CAD) compared to non-smokers (Farhat *et al.*, 2008), while angptl2 has recently been associated to synovial inflammation in rheumatoid arthritis (Okada *et al.*, 2010), chronic inflammation in dermatomyositis (Ogata *et al.*, 2012), cancer (Aoi *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012) and to abdominal aortic aneurysms (Tazume *et al.*, 2012). In addition, plasma levels of angptl2 are higher in Japanese patients with CAD than in healthy subjects and correlate with the severity of the disease (Oike *et al.*, 2009a; Tabata *et al.*, 2009). Collectively, these data suggest that angptl2 promotes inflammation, but its contribution to the development of chronic endothelial / vascular inflammation leading to atherosclerosis remains to be demonstrated.

The present study was designed to determine the role of angptl2 and by which molecular mechanism it could participate to the pathogenesis of the atherosclerotic process in severely dyslipidemic LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup> (ATX) mice. We report that angptl2

induces a pro-inflammatory response in freshly isolated EC and triggers leukocyte adhesion onto the native endothelium of pre-atherosclerotic young ATX mice, the latter being a necessary primary step of atherogenesis (Libby, 2012), but not in healthy young mice. We demonstrate that angptl2 is abundant in the atherosclerotic plaque that spontaneously develops with age in ATX mice, that EC, but not vascular smooth muscle cells (VSMC), produce angptl2 and that angptl2 binds predominantly to VSMC. Importantly, chronic administration of angptl2 in pre-atherosclerotic young ATX mice increases total- and LDL-cholesterol levels, strongly induces the expression of endothelial pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules, and accelerates the formation of atherosclerotic lesions. Finally, circulating angptl2 levels are much higher in CAD patients compared to healthy subjects. Altogether, our data are the first to suggest that angptl2 causally contributes to the pathogenesis of atherosclerosis.

## Material and Methods

*Animal models* Wild type (WT) C57Bl/6 and knockout/transgenic severely dyslipidemic LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup> (ATX) male mice were fed a normal diet (Bolduc *et al.*, 2011; Gendron *et al.*, 2010). Experiments were performed in agreement with the guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals of Canada and following approbation by the animal care committee of the Montreal Heart Institute. Mice were anaesthetized with 44 mg/kg ketamine and 2.2 mg/kg xylazine and ventilated.

In 3-month old (mo) WT and ATX mice, the aorta and the spleen were used to assess the adhesion of leukocytes onto the native endothelium (Gendron *et al.*, 2010), mRNA expression of adhesion molecules and inflammatory genes and protein expression of adhesion molecules in freshly isolated EC and leukocytes.

*RNA extraction and Real time quantitative PCR* Total RNA was extracted from leukocytes and from freshly isolated EC, scraped with a blade from longitudinally opened segments of the thoracic aorta, using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada). Total RNA was reverse transcribed and the qPCR reactions were performed using a MxPro3000 platform (Agilent, Mississauga, ON, Canada). The primers of target genes (angptl2, TNF- $\alpha$ , IL-6, ICAM-1, P-Selectin, CD18, CD62L, CD162) were designed using Clone Manager software (Table S1, online supplement).

*Leukocyte adhesion to native endothelium* Fresh aorta sections with the endothelium facing up were incubated for 30 min with or without 100 nmol/L of recombinant angptl2 (see online supplement), 10 U/ml of thrombin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), anti-P-selectin (1:50, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, #sc6943), anti-ICAM-1 (1:50, Santa Cruz Biotech, #sc1511), goat-IgG (1:50, Santa Cruz Biotech, #sc2028) or rat-IgG (1:50, Santa Cruz Biotech, #sc2026). Leukocytes were radiolabelled and exposed to the endothelial surface of the aorta sections as described previously (Gendron *et al.*, 2010). The number of adherent leukocytes to the endothelium was expressed per surface area of the segment (adherent cells / mm<sup>2</sup> of endothelium surface area).

*Expression of adhesion molecules on the leukocytes* Protein expressions of CD18 (#553293), CD62L (#553151) and CD162 (#555306) (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) were analyzed by imaging flow cytometry (AMNIS, Markham, ON, Canada). All data were collected with INSPIRE software and analyzed with IDEAS analytical software.

*Chronic infusion of angptl2* Pre-atheroclerotic dyslipidemic 3-mo ATX mice were infused (intravenous) with purified recombinant angptl2 (0.944  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) or TBSE (50 mM Tris-base, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) using osmotic minipumps (Alzet, Cupertino, CA, 0.11  $\mu\text{l}/\text{hr}$ , volume 100  $\mu\text{l}$ ), for 1 month. We targeted a concentration of angptl2 at equilibrium of  $\sim 150$  ng/ml, equivalent to twice the plasma concentration measured in 12-mo atherosclerotic ATX mice (estimated by ELISA (antibodies-online.com), data not shown). Mice were sacrificed after one month of infusion, at 4 months of age; the aorta was dissected to measure atherosclerotic lesions (in unstained aortas, using GIMP 2.6, [www.gimp.org](http://www.gimp.org)), EC were scraped from the aortas to extract mRNA and plasma samples were collected to quantify total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglycerides levels (Clinical Biochemistry Laboratory, Montreal Heart Institute).

*Plasma, aortic and plaque Angptl2 protein levels* were measured in 3-, 6-, 9- and 12-mo WT and ATX mice by Western blot using a goat anti-angptl2 antibody (dilution 1:200, R&D, Minneapolis, MN, #AF2084).

*Immunofluorescence* Fixed tissues (longitudinally open aortic segments or frozen sections) were incubated with goat anti-angptl2 (1:50, R&D) or rat anti-CD31 (1:20, Abcam, Cambridge, MA, # ab7388-50) and with the appropriate secondary antibody (Alexa fluor-555 donkey anti-goat, #A21433, Molecular Probes, Burlington, ON, Canada, or Alexa fluor-647 anti-rat, #712-495-153, Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Fluorescence was visualized by confocal microscopy (Zeiss, Toronto, ON, Canada).

*Cell culture* Experiments were performed in (i) human internal mammary arteries endothelial cells (hIMAEC), (ii) HUVEC (Lonza, Mississauga, ON, Canada) and (iii) VSMC (Lonza). hIMAEC were isolated from discarded segments of IMA from patients undergoing coronary artery bypass graft and were cultured as previously described (Voghel *et al.*, 2007).

*Western blots* To measure the secretion of endogenous angptl2 into the culture medium, hIMAEC, HUVEC or VSMC were cultured in serum free medium for 16 h. The proteins (50 µg of protein from the cell lysate, 20 µl from the concentrated culture medium or 2 µl from the purified recombinant protein) were resolved by electrophoresis, transferred to nitrocellulose, and revealed using a goat anti-angptl2 antibody (dilution 1:200, R&D).

*Fluorescent immunocytochemistry* hIMAEC, HUVEC and VSMC were cultured for 24 h on coverslips, washed, fixed and incubated with an angptl2 specific antibody (1:50, R&D) and then with a Alexa fluor-488 donkey anti-goat secondary antibody. Fluorescence was visualized using a confocal microscope.

*Angptl2-Gaussia luciferase-GST construct* To visualize the binding of angptl2 on the cell surface, cultured EC and VSMC were stimulated with angptl2-luciferase protein secreted by HEK-293 cells transfected with angptl2-luciferase-pcDNA3.1 or with luciferase-pcDNA 3.1 (as a negative control). For live cell imaging, VSMC or EC (HUVEC and hIMAEC) were stimulated 10 min with HEK-293-angptl2-luciferase (100 nmol/L) or HEK-293-luciferase transfected medium. The fraction of angptl2-luc binding to the cell surface was monitored by the activity of luciferase, using Gaussia Luciferase assay kit (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada) using a confocal microscope (Zeiss) before and immediately after addition of the luciferase substrate. A 450 nm laser was used and images (512x512), acquired at 0.5 sec intervals, were collected with a 63x/1.4 plan apochromat Oil DIC objective.

*Plasma angptl2 concentration in human* A sample of blood was drawn from CAD patients (n=11) and healthy volunteers (n=6) (characteristics of subjects in Table 1), all

members of the Prevention center of the Montreal Heart Institute. This study was approved by the Montreal Heart Institute ethics committee (Project#11-1328). All donors signed an informed consent form. Circulating human angptl2 levels were measured using a commercial ELISA kit (Antibodies-online.com, #ABIN41096). CAD patients were treated as follows: 91% (9/11) with statins, 55% (6/11) with antiplatelet agents, 45% (5/11) with  $\beta$  blockers, 36% (4/11) with angiotensin receptor antagonists, 27% (3/11) with ACE inhibitors and 9 % (1/11) with diuretics. Age-matched healthy volunteers received no medication.

Experimental details concerning the cloning, expression, and purification of recombinant angptl2-GST (Fig. S1) plus all protocols used in this study are provided in the online supplement.

*Statistical analysis* Data are presented as mean $\pm$ SEM, with “n” indicating the number of animals (Fig. 1-7) or as dot plot (individual data for human samples, Fig. 8). Gaussian distribution of the data was tested using d'Agostino & Pearson omnibus normality test. Because of the low "n", normality was not assessed using raw data, but using the z score (Y- mean / standard deviation) of each data (Y). All data, except those in Fig. 4A (data for IL-6 expression only) passed the normality test. Therefore, except in Fig. 4A where Mann-Whitney test was used to compare IL-6 expression in WT *versus* ATX mice, data were analyzed using parametric tests: unpaired t-test was used to compare variables in WT *versus* ATX mice (Fig. 4) and in healthy volunteers *versus* CAD patients (Fig. 8); one-way ANOVA with Tukey's post test was used to compare parameters in hIMAEC *versus* HUVEC and VSMC (Fig. 7), in ATX mice treated with different antibodies (Fig. 2C) and in ATX mice at different ages (Fig. 5A); two-way ANOVA with Bonferroni post tests was used to compare variables in WT *versus* ATX mice treated or not with angptl2 (Fig. 1, 2 and 3). ANOVA without repeated measures were tested to compare variables in WT *versus* ATX mice and two-way ANOVA with repeated measures was used to compare Control *versus* +angptl2. Finally, the correlation presented in Fig. 5D was tested with the Pearson test. All statistics were performed using Graph Pad Prism 5.0. A p value < 0.05 was considered statistically significant.

## Experimental Results

***Acute stimulation with exogenous angptl2 promotes inflammation in EC*** The pro-inflammatory effect of angptl2 was evaluated *ex vivo* on EC freshly isolated from aortas of 3-mo WT and ATX mice. Baseline mRNA levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly higher in EC from ATX mice (Fig. 1). Stimulation of EC with recombinant angptl2 (100 nmol/L, 30 min) increased ( $p < 0.05$ ) TNF- $\alpha$  mRNA in both WT and ATX mice and increased significantly IL-6 gene expression in WT mice only (Fig. 1). In cultured human EC, angptl2 (100 nmol/L) increased TNF- $\alpha$  and IL-6 gene expression after 10 min, an effect that was sustained after incubation of human EC with angptl2 for 1, 4 or 24 hours (Fig. S2).

***Acute stimulation with exogenous angptl2 increases P-selectin and ICAM-1 expression in EC*** Inflammation is associated with an up-regulation of endothelial adhesion molecules. Basal expression of ICAM-1 and P-selectin mRNA was higher in aortic EC freshly isolated from ATX mice than WT mice (Fig. 2A). Angptl2 stimulated the expression of ICAM-1 and P-selectin in ATX mice and tended to increase their expression in WT mice (Fig. 2A).

***Acute stimulation with exogenous angptl2 induces adhesion of leukocytes onto the native endothelium in ATX, but not WT mice*** Expression of adhesion molecule promotes leukocyte adhesion. The basal adhesion of  $^{51}\text{Cr}$ -leukocytes to native aortic endothelium was similar in 3-mo WT and ATX mice (Fig. 2B). Pre-incubation of the aorta endothelium with 10 U/ml of thrombin stimulated leukocytes adhesion in WT mice and this response was potentiated in ATX mice (Fig. 2B). In contrast, stimulation with recombinant angptl2 (100 nmol/L) did not induce leukocyte/endothelium interactions in WT mice, while it stimulated the adhesion of leukocytes in ATX mice as efficiently as did thrombin (Fig. 2B). Pre-incubation of the aortic segments with anti-P-selectin or anti-ICAM-1 antibodies prior to stimulation with recombinant angptl2 prevented the adhesion of leukocytes on the endothelium in ATX mice (Fig. 2C). Incubation with the isotype-matched IgG did not affect angptl2-mediated leukocytes

adhesion (Fig. 2C). In control experiments, aortae were incubated for 30 minutes with exogenous recombinant angptl2-GST and then probed with an anti-GST antibody. Subsequent analysis of immunofluorescence revealed that exogenous angptl2 efficiently bound to the aorta (Fig. S3 and S4).

***Acute stimulation with exogenous angptl2 increases adhesion molecule expression at the surface of the leukocytes*** Basal expression of CD18, CD62L and CD162 mRNA were similar in leukocytes from WT and ATX mice (Fig. 3A-C). Incubation with angptl2 increased the expression of these genes similarly in leukocytes isolated from WT and ATX mice (Fig. 3A-C). Flow cytometry revealed that expression of adhesion molecule proteins was similar in leukocytes from both groups of mice (Fig. 3D-F). Angptl2 enhanced the fluorescence intensity of CD18 similarly in WT and ATX mice (Fig. 3D). Due to proteolysis of cell surface molecules, CD162 levels decreased after stimulation with angptl2 similarly in both groups (Fig. 3F). Angptl2 only tended to induce CD62L shedding (Fig. 3E). Angptl2 mRNA and protein were not detected in leukocytes isolated from 3-mo WT or ATX mice (data not shown).

***Chronic angptl2 infusion promotes the expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules in EC*** In pre-atherosclerotic dyslipidemic ATX mice, 1 month exposure to recombinant angptl2 (plasma concentration of ~150 ng/ml) increased the expression of inflammatory TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA in fresh aortic EC by 9- (p<0.05) and 4-fold (p=0.0571), respectively (Fig. 4A). In addition, the expression of ICAM-1 and P-Selectin mRNA was increased by 7- and 4-fold (p<0.05), respectively (Fig. 4A).

***Chronic angptl2 infusion accelerates the formation of the atherosclerotic plaque*** Chronic exposure of pre-atherosclerotic dyslipidemic mice to recombinant angptl2 led to a 10-fold increase (p<0.05) in the size of the atherosclerotic lesion when compared to ATX mice infused with vehicle (TBSE) (Fig. 4B). While non-significant lesions were observed in 4-mo vehicle-treated ATX mice (1.5 $\pm$ 0.2% of total thoracic aorta area), angptl2 infusion increased the area of the lesions (14 $\pm$ 2%).



***Chronic angptl2 infusion increases total- and LDL-cholesterol*** Chronic delivery of angptl2 significantly increased plasma levels of total-cholesterol and LDL-cholesterol without affecting HDL-cholesterol or triglycerides (Fig. 4C). Angptl2 infusion increased total cholesterol (from  $11.8 \pm 1.0$  to  $19.1 \pm 1.6$  mM) and LDL-cholesterol (from  $6.6 \pm 0.7$  to  $12.9 \pm 1.1$  mM) to values similar to those in 12-mo ATX mice ( $23.3 \pm 2.6$  mM and  $14.7 \pm 0.5$  mM, respectively).

***Plasma angptl2 levels increase with age and progression of atherosclerosis*** While below the limits of detection by Western blot in 3-mo WT and ATX mice, circulating levels of angptl2 increased significantly from 6- to 12-mo in WT and even further in ATX mice (Fig. 5A). In parallel, while absent at 3-mo, the atherosclerotic lesion covered  $10 \pm 1\%$  of the thoracic aorta at 6-mo in untreated ATX mice, to then rise with age at 9-mo and 12-mo, covering  $33 \pm 4\%$  and  $74 \pm 4\%$ , respectively, of the internal surface (Fig. 5B). WT mice never developed lesions during this time period.

***Endogenous aortic angptl2 expression in the plaque increases with age and progression of atherosclerosis*** In ATX mice, angptl2 protein expression was quantified specifically in the aortic lesion: its pattern of expression positively correlates with the lesion area and followed the expression of F4/80, a specific marker of macrophages (Fig. 5C,D). WT mice did not develop lesions (Fig. 6), but endogenous angptl2 aortic mRNA and protein expression increased with age from 6- to 12-mo in WT mice, although to a lesser extent than in ATX mice (data not shown).

Confocal immunofluorescent images show that the endogenous levels of angptl2 increased with age and the progression of atherosclerosis (Fig. 6A-B). This was observed in both freshly isolated, longitudinal aortic sections (Fig. 6A and Fig. S5) and in frozen sections (Fig. 6B and Fig. S5). Angptl2 was particularly abundant in the atherosclerotic lesion, but also present in EC as demonstrated by the co-localization of angptl2 with the endothelial marker CD-31 (Fig. 6C and Fig. S3). Angptl2-fluorescence in VSMC was also clearly observed throughout the media in 6- and 12-mo WT and ATX mice (Fig. 6B-C and Fig. S3 and S4), but not in young 3-mo WT mice and at a very low level in pre-atherosclerotic 3-mo ATX mice (Fig. S6).

***Angptl2 is secreted by EC but not by VSMC*** In order to elucidate the cellular specificity of angptl2 expression, we compared its production by cultured human EC isolated in coronary patients (hIMAEC) (Voghel *et al.*, 2007), HUVEC and human VSMC. Immunoblotting analysis (Fig. 7A) showed that angptl2 protein was abundantly expressed and secreted by hIMAEC, less detectable in HUVEC, and undetectable in VSMC. Similar results were observed by immunofluorescence (Fig. 7B) and at the mRNA level (Fig. 7C). These results indicate that angptl2 is secreted by EC, particularly in a pro-atherosclerotic environment, but not by VSMC. It is likely that angptl2 expression is higher in hIMAEC than in HUVEC because of the elevated level of damage sustained by cells isolated from patients with severe atherosclerosis (Voghel *et al.*, 2007).

***The intensity of angptl2-luciferase binding is stronger in VSMC than in EC*** The binding of recombinant angptl2-luciferase to the cell surface of living hIMAEC, HUVEC and VSMC was examined (Fig. 7D). The binding of luciferase alone (no angptl2 in the construct) was negligible (Fig. S7). We observed a marked accumulation of angptl2-luciferase on the surface of living VSMC over time; the signal remained stable for up to 5 min. The signal was less intense on the surface of HUVEC and hIMAEC (Fig. 7D). These results suggest that angptl2-luciferase is more efficiently captured by VSMC than by EC, implying that angptl2 receptors are in greater abundance and/or affinity on VSMC than EC. Altogether, the data from Figure 7 show that angptl2 is produced by EC, but not VSMC, and that it predominantly binds to VSMC (Fig. S3 and S4).

***Circulating levels of angptl2 increase in CAD patients*** Compared to age-matched male healthy volunteers (Table 1), plasma angptl2 levels were significantly higher in CAD patients ( $1.00 \pm 0.18$  versus  $6.02 \pm 1.33$  ng/ml, healthy subjects versus CAD patients; Fig. 8). The presence of CAD was documented by the history of angina (5/11 patients), infarct (6/11), previous dilatation (3/11) or coronary bypass (1/11). Almost all CAD patients were dyslipidemic and treated with statins (10/11), explaining their lower total cholesterol and LDL-cholesterol levels when compared to healthy volunteers (Table 1).

## Discussion

The novel findings of this study are that 1) angptl2 promotes the adhesion of leukocytes to the native inflamed endothelium of pre-atherosclerotic young ATX mice, but not WT mice, *via* a robust activation of P-selectin and ICAM-1; 2) the chronic administration of angptl2 in pre-atherosclerotic young ATX mice strongly accelerates the formation of atherosclerotic lesions while increasing the expression of endothelial pro-inflammatory cytokines and adhesion molecules and circulating levels of cholesterol; 3) angptl2 plasma levels increase with age and disease, angptl2 concentrates in the atherosclerotic lesion of aging ATX mice and binds predominantly to VSMC; and 4) angptl2 is secreted by cultured EC but not by VSMC. We also show for the first time that circulating levels of angptl2 are significantly higher in Caucasian CAD patients than in healthy volunteers. Altogether, these observations demonstrate that angptl2 is active in the different steps of atherogenesis, promoting leukocyte adhesion to the inflamed pre-atherosclerotic and dysfunctional (Gendron *et al.*, 2010) vascular endothelium and contributing to the formation of the lesions.

Studies investigating the physiological and pathophysiological role of angptl2 are limited. It has been reported that angptl2 is a growth factor that stimulates the expansion (Kim *et al.*, 1999b) and the survival (Broxmeyer *et al.*, 2012) of hematopoietic stem cells. It was shown to be pro-angiogenic (Morisada *et al.*, 2006a; Oike *et al.*, 2004a) and to induce vasculogenesis in mice (Oike *et al.*, 2009a), and to be pro-inflammatory (Aoi *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012; Kanda *et al.*, 2012; Ogata *et al.*, 2012; Okada *et al.*, 2010; Tabata *et al.*, 2009; Tazume *et al.*, 2012). Despite strong evidence that angptl2 is positively associated with chronic inflammatory diseases, its direct implication in atherogenesis is unknown. Circulating angptl2 levels are higher in Japanese patients with CAD when compared to healthy subjects and correlate with the severity of the disease (Oike *et al.*, 2009a; Tabata *et al.*, 2009). In the present study, we show that Caucasian CAD patients also exhibit higher angptl2 plasma concentrations than healthy volunteers (Fig. 8). Interestingly, while the values of angptl2 levels were similar in healthy Caucasian and Japanese subjects, circulating levels of angptl2 were higher in

our North American cohort of CAD patients than in Asian CAD patients (Oike *et al.*, 2009a; Tabata *et al.*, 2009).

To study the role of angptl2 in atherogenesis, we used LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sub>100</sub><sup>+/+</sup> mice characterized by severe dyslipidemia, *i.e.* abnormally high circulating levels of total cholesterol (8-fold), LDL-cholesterol (20-fold) and triglycerides (9-fold) (Bolduc *et al.*, 2011; Drouin *et al.*, 2011a; Gendron *et al.*, 2010). Three-month old ATX mice exhibit premature endothelial dysfunction, oxidative stress, inflammation; ATX mice develop aortic atherosclerotic plaques by the age of 6 months (Bolduc *et al.*, 2011; Drouin *et al.*, 2011a; Gendron *et al.*, 2010) (Fig. 5 and 6). At 3-mo, ATX mice are therefore prone to react to a pro-atherosclerotic factor. Consistent with the established relationship between inflammation and the progression of atherosclerosis (Libby, 2002; Tabas *et al.*, 2013), we observed that recombinant angptl2 up-regulated the inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-6 in EC freshly isolated from the aorta of WT and ATX mice, and within 10 minutes in cultured human EC (Fig. S2). Similarly, a recent study (Tabata *et al.*, 2009) focusing on the pro-inflammatory role of angptl2 showed that plasma angptl2 levels correlated with inflammation, adiposity and insulin resistance both in mice and humans. Although basal levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were higher in the endothelium of ATX compared to WT mice, we showed that the up-regulation of both inflammatory cytokines by acute exposure to angptl2 was not exacerbated in ATX mice (Fig. 1). However, chronic infusion of angptl2 strongly potentiated the inflammatory response of the endothelium in pre-atherosclerotic mice (Fig. 4). This potent pro-inflammatory effect of angptl2 likely synergizes with the rise in total cholesterol to accelerate atherogenesis.

Atherogenesis involves three essential successive phases starting with (i) capture and rolling of leukocytes from the circulation to the inflamed endothelium, (ii) arrest and firm adhesion of leukocytes and (iii) the transendothelial migration of leukocytes (Ley *et al.*, 2007a). Our data demonstrate for the first time that angptl2 promotes leukocyte adhesion to the native endothelium *ex vivo*, and that this property of angptl2 requires a pro-inflammatory environment. Indeed, angptl2 stimulated leukocyte adhesion in ATX, but not in WT mice (Fig. 2). The pro-inflammatory environment of the ATX mice (illustrated by increased expression of inflammatory and adhesion

molecules, Fig. 1 and 2A) likely primes EC to strongly respond to angptl2. Importantly, leukocyte adhesion induced by angptl2 was prevented by P-selectin or ICAM neutralization. P-selectin deficiency has been associated with a reduction in inflammation and in the progression of atherosclerosis in ApoE null mice (Luo *et al.*, 2012). In addition, P-selectin inactivation limits plaque macrophage content and neointima formation after endothelial injury in the carotid of ApoE null mice (Phillips *et al.*, 2003). Altogether, these data further support the essential role of inflammation, leukocyte adhesion and macrophages in the initiation of the atherosclerotic process in dyslipidemic mice. In contrast, angptl2 increased the expression of adhesion molecules at the surface of leukocytes isolated from WT and ATX mice to a similar extent (Fig. 3), suggesting that the increase in cell adhesion observed in the native endothelium from ATX mice is not due to altered adhesion molecule expression on leukocytes, but rather to an up-regulation of adhesion molecule expression on EC. Altogether, our data (Farhat *et al.*, 2008) and those from the literature (Ogata *et al.*, 2012; Okada *et al.*, 2010; Tazume *et al.*, 2012) suggest that chronic inflammation may trigger angptl2 expression and feed forward an endothelial pro-inflammatory loop (Ait-Oufella *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2012) and initiate atherogenesis through P-selectin- and ICAM-dependent leukocyte adhesion.

In a seminal study, it was briefly reported that in mice over-expressing angptl2, a model associated with inflammation, adhesion of leukocytes/macrophages to the vascular wall was augmented (Tabata *et al.*, 2009). The authors proposed that the fibrinogen-like domain of angptl2 might interact with the integrin  $\alpha 5\beta 1$  expressed at the site of inflammation (Tabata *et al.*, 2009). In our ATX mice, however, we could not detect integrin  $\alpha 5\beta 1$  mRNA expression in native aortic EC exposed or not to angptl2 (data not shown). Angptl2 is still considered as an orphan ligand, although a recent study demonstrates that immune inhibitory receptors such as human leukocyte immunoglobulin-like receptor B2 bind different angptls including angptl2 (Zheng *et al.*, 2012a).

Chronic exposure (1 month) of young pre-atherosclerotic ATX mice to angptl2 induced a potent inflammatory response, potentiated the expression of endothelial adhesion molecules and strongly accelerated the formation of atherosclerotic lesions

(Fig. 4). Unexpectedly, *angptl2* also significantly increased both total cholesterol and LDL-cholesterol levels. In contrast to *angptl3* (Ando *et al.*, 2003; Kathiresan *et al.*, 2008), *angptl4* (Adachi *et al.*, 2009) and *angptl8* (Quagliarini *et al.*, 2012) which are known to modulate lipid metabolism, to the best of our knowledge, this is the first report of such an effect of *angptl2* on circulating cholesterol levels. A recent study, however, demonstrated that levels of *angptl2* reflect adiposity and might regulate inflammation and triglyceride metabolism (Muramoto *et al.*, 2011). Although inflammation triggers atherosclerosis in animal models of dyslipidemia (Ait-Oufella *et al.*, 2011), it is not possible at this stage to decipher whether the premature atherogenic response induced by *angptl2* is due to its pro-inflammatory effect or to its hypercholesterolemic effect. We observed that the infusion of *angptl2* in ATX mice increased total cholesterol levels by 62% (Fig. 4C); whether this augmentation alone, on top of an already very high level of cholesterol (7 fold increase), could accelerate the atherosclerotic plaque formation by ~10-fold (Fig. 4B) is possible, but unlikely. However, the hypercholesterolemic effect of *angptl2* combined with its pro-inflammatory effect (Fig. 4A) likely synergize to promote atherosclerosis. The relative contribution of inflammation vs. hypercholesterolemia in atherogenesis is a recurrent question in the field of atherosclerosis (Libby *et al.*, 2011a; Roubille *et al.*, 2013). Short term intervention with sulfasalazine, an inhibitor of NF $\kappa$ B, in patients with coronary artery disease has not been successful at reversing endothelial dysfunction (Tabit *et al.*, 2012), while in a small group of patients with recent acute coronary syndrome, inhibition of the leukotriene-generating enzyme 5-lipoxygenase reduced inflammation and plaque progression (Tardif *et al.*, 2010). More studies are ongoing to further decipher the exact contribution of inflammation in atherogenesis (Roubille *et al.*, 2013; Tabas *et al.*, 2013).

Both circulating and aortic levels of *angptl2* increased progressively with aging and prematurely with atherosclerosis. Consistently, healthy aging is associated with a rise in blood levels of *angptl2* in humans (Tabata *et al.*, 2009), while in diabetic and obese subjects, a positive correlation was found between the circulating level of *angptl2* and the concentration of the biomarker C-reactive protein (CRP) (Tabata *et al.*, 2009). In addition, we observed a strong increase in endogenous *angptl2* expression in human EC isolated from patients undergoing coronary artery by-pass surgery (Fig. 7A-C)

characterized by premature senescence and a highly pro-atherogenic environment (Farhat *et al.*, 2008; Voghel *et al.*, 2007); after chronic treatment of these cells with the antioxidant N-acetyl-cystein, the expression of angptl2 was reduced (unpublished data). Interestingly, angptl2 expression is higher in hIMAEC than in HUVEC (Fig. 7), likely because of the elevated level of oxidative damage of sustain *in vivo* (Voghel *et al.*, 2008b; Voghel *et al.*, 2007). The elevation in circulating angptl2 associated with the progression of atherosclerosis in ATX mice (Fig. 5A) and its accumulation in the plaque (Fig. 5B-C and 6A-B) strongly suggests that angptl2 contributes to the pathology. While we showed that cultured VSMC did not secrete angptl2, confocal immunofluorescence images showed high levels of angptl2 not only in the plaque but also in the endothelium and throughout the media. Angptl2 production could differ between cultured cells and *in vivo*, however this is unlikely since cultured VSMC have a secretory phenotype. On the other hand, our data suggest that angptl2 present in VSMC is a results of its binding, but not its local production. Indeed, immunohistofluorescent staining in aortic sections of 3-mo WT mice showed absence of angptl2 in VSMC and mostly present in EC (Fig. S6). In ATX mice of the same age however, angptl2 is observed in VSMC in addition to EC. Circulating angptl2 may originate from various cell types, including EC, adipocytes and macrophages, bind to EC, VSMC and other cells in the plaque. In line with this, plasma angptl2 levels increase with age and even more in ATX mice (Fig. 5A). Thus, it is possible that circulating angptl2 binds to VSMC to a greater extent in ATX mice (Fig. 6). The biological consequences of the binding on VSMC remain to be elucidated.

Angptl2 can be produced by thioglycollate-induced peritoneal macrophages, inducing vascular inflammation and contributing to the formation of abdominal aneurysms (Tazume *et al.*, 2012). We observed a parallel rise in protein expression of angptl2 and of macrophage F4/80 in the plaque (Fig. 5B-D), but we do not know if macrophages from the plaque produce angptl2. We observed that leukocytes do not express angptl2 (data not shown), but according to the literature (Tazume *et al.*, 2012), their transformation to macrophages should be accompanied with the induction of angptl2 expression.

Further studies are needed to decipher whether T-cells or any cell type contained in the plaque other than EC and macrophages could contribute to angptl2 expression

within the atherosclerotic lesion. Similarly, the specific cell type within the leukocytes that binds the endothelium and infiltrate the wall should be identified; indeed, leukocytes include many different cell types such as monocytes, effector and regulatory T cells, neutrophils, thus using leukocytes instead of pure monocytes could be a limitation. The present study focused on TNF- $\alpha$  and IL-6 as inflammatory markers, and P-selectin and ICAM-1 as adhesion markers, although a broader spectrum of inflammatory cytokines, growth factors and adipokines could be involved in the observed pro-atherogenic effect of angptl2. The fact that some comparisons failed to reach statistical significance, due to small samples, is another potential limitation. Finally, other models of atherosclerosis must be examined to validate that angptl2 also contributes to the pathogenesis of atherosclerosis. Nonetheless, as angptl2 levels are significantly higher in Caucasian (Fig. 8) and Japanese CAD patients (Tabata *et al.*, 2009), and based on our present data, we believe that our findings are not limited to ATX mice.

In conclusion, our results demonstrate that angptl2 increases in the blood with age in mice and prematurely in ATX mice. We found that angptl2 is a key inflammatory factor activating adhesion molecule expression while increasing circulating cholesterol levels, accelerating the development of atherosclerotic plaques in pre-atherosclerotic, severely dyslipidemic mice. Although angptl2 is still an orphan ligand, more studies are needed to decipher the exact mechanisms of action of angptl2 that may emerge as a key player in the atherosclerotic process.



**Funding:** This work is supported by the Canadian Institutes for Health Research [MOP14496 to E.T.]. Nada Farhat was a recipient of a *Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships - Doctoral Award* in association with the Canadian Institute for Health Research.

**Conflict of Interest Disclosures:** Nada Farhat: none; Nathalie Thorin-Trescases: none; Maya Mamarbachi: none; Louis Villeneuve: none; Carol Yu: none; Cécile Martel: none; Natacha Duquette: none, Mathieu Gayda: none; Anil Nigam: none; Martin Juneau: none; Bruce G. Allen: none and Eric Thorin: none.

## References

1. Hato T, Tabata M, Oike Y. The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18:6-14
2. Morisada T, Kubota Y, Urano T, Suda T, Oike Y. Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis. *Endothelium.* 2006;13:71-79
3. Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, Grishin NV, Hyde R, Boerwinkle E, Valenzuela DM, Murphy AJ, Cohen JC, Hobbs HH. Atypical angiopoietin-like protein that regulates angptl3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:19751-19756
4. Ando Y, Shimizugawa T, Takeshita S, Ono M, Shimamura M, Koishi R, Furukawa H. A decreased expression of angiopoietin-like 3 is protective against atherosclerosis in apoe-deficient mice. *J Lipid Res.* 2003;44:1216-1223
5. Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, Cooper GM, Roos C, Voight BF, Havulinna AS, Wahlstrand B, Hedner T, Corella D, Tai ES, Ordovas JM, Berglund G, Vartiainen E, Jousilahti P, Hedblad B, Taskinen MR, Newton-Cheh C, Salomaa V, Peltonen L, Groop L, Altshuler DM, Orho-Melander M. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet.* 2008;40:189-197
6. Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, Nishikawa T, Ogawa R, Matsumura T, Ishii N, Nagai R, Miyata K, Tabata M, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Kawashima J, Takeya M, Yamashita S, Koh GY, Nagy A, Suda T, Oike Y, Araki E. Angptl 4 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379:806-811
7. Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, Ito Y, Urano T, Kimura Y, Kubota Y, Maekawa H, Miyamoto T, Miyata K, Matsumoto S, Sakai J, Nakagata N, Takeya M, Koseki H, Ogawa Y, Kadowaki T, Suda T. Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat Med.* 2005;11:400-408
8. Oike Y, Tabata M. Angiopoietin-like proteins. *Circ J.* 2009;73:2192-2197

9. Miida T, Hirayama S. Impacts of angiopoietin-like proteins on lipoprotein metabolism and cardiovascular events. *Curr Opin Lipidol.* 2010;21:70-75
10. Kim I, Moon SO, Koh KN, Kim H, Uhm CS, Kwak HJ, Kim NG, Koh GY. Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein. Angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem.* 1999;274:26523-26528
11. Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, Urano T, Zhu HJ, Tsukano H, Tazume H, Kaikita K, Miyashita K, Iwawaki T, Shimabukuro M, Sakaguchi K, Ito T, Nakagata N, Yamada T, Katagiri H, Kasuga M, Ando Y, Ogawa H, Mochizuki N, Itoh H, Suda T, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell Metab.* 2009;10:178-188
12. Oike Y, Ito Y, Maekawa H, Morisada T, Kubota Y, Akao M, Urano T, Yasunaga K, Suda T. Angiopoietin-related growth factor (agf) promotes angiogenesis. *Blood.* 2004;103:3760-3765
13. Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Takahashi O, Mukai N, Hata J, Iwase M, Kitazono T, Oike Y, Kiyohara Y. Angiopoietin-like protein 2 and risk of type 2 diabetes in a general Japanese population: The hisayama study. *Diabetes Care.* 2012
14. Farhat N, Thorin-Trescases N, Voghel G, Villeneuve L, Mamarbachi M, Perrault LP, Carrier M, Thorin E. Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008;86:761-769
15. Okada T, Tsukano H, Endo M, Tabata M, Miyata K, Kadomatsu T, Miyashita K, Semba K, Nakamura E, Tsukano M, Mizuta H, Oike Y. Synovial cell-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *Am J Pathol.* 2010;176:2309-2319
16. Ogata A, Endo M, Aoi J, Takahashi O, Kadomatsu T, Miyata K, Tian Z, Jinnin M, Fukushima S, Ihn H, Oike Y. The role of angiopoietin-like protein 2 in pathogenesis of dermatomyositis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;418:494-499

17. Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Nakano M, Horiguchi H, Ogata A, Odagiri H, Yano M, Araki K, Jinnin M, Ito T, Hirakawa S, Ihn H, Oike Y. Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis. *Cancer Res.* 2011;71:7502-7512
18. Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Kuroda H, Mikami S, Hato T, Aoi J, Horiguchi H, Miyata K, Odagiri H, Masuda T, Harada M, Horio H, Hishima T, Nomori H, Ito T, Yamamoto Y, Minami T, Okada S, Takahashi T, Mochizuki N, Iwase H, Oike Y. Tumor cell-derived angiopoietin-like protein angptl2 is a critical driver of metastasis. *Cancer Res.* 2012;72:1784-1794
19. Tazume H, Miyata K, Tian Z, Endo M, Horiguchi H, Takahashi O, Horio E, Tsukano H, Kadomatsu T, Nakashima Y, Kunitomo R, Kaneko Y, Moriyama S, Sakaguchi H, Okamoto K, Hara M, Yoshinaga T, Yoshimura K, Aoki H, Araki K, Hao H, Kawasuji M, Oike Y. Macrophage-derived angiopoietin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2012;32:1400-1409
20. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2012;32:2045-2051
21. Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, Des Rosiers C, Tardif JC, Thorin E. Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;301:H2081-2092
22. Gendron ME, Theoret JF, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Merhi Y, Thorin E. Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;298:H2062-2070
23. Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E. Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev.* 2007;128:662-671

24. Broxmeyer HE, Srour EF, Cooper S, Wallace CT, Hango G, Youn BS. Angiopoietin-like-2 and -3 act through their coiled-coil domains to enhance survival and replating capacity of human cord blood hematopoietic progenitors. *Blood Cells Mol Dis.* 2012;48:25-29
25. Kanda A, Noda K, Oike Y, Ishida S. Angiopoietin-like protein 2 mediates endotoxin-induced acute inflammation in the eye. *Lab Invest.* 2012;92:1553-1563
26. Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, Baraghis E, Lesage F, Gillis MA, Villeneuve L, Hamel E, Ferland G, Thorin E. Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:H1032-1043
27. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-874
28. Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: Challenges and opportunities. *Science.* 2013;339:166-172
29. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. *Nature.* 2007;7:678-689
30. Luo W, Wang H, Ohman MK, Guo C, Shi K, Wang J, Eitzman DT. P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency leads to cytokine resistance and protection against atherosclerosis in apolipoprotein e deficient mice. *Atherosclerosis.* 2012;220:110-117
31. Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM, Hesselbacher SE, Czarnik AC, Manka D, Vestweber D, Ley K, Sarembock IJ. Single injection of p-selectin or p-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody blocks neointima formation after arterial injury in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation.* 2003;107:2244-2249
32. Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2011;31:969-979
33. Zheng J, Umikawa M, Cui C, Li J, Chen X, Zhang C, Huynh H, Kang X, Silvany R, Wan X, Ye J, Canto AP, Chen SH, Wang HY, Ward ES, Zhang CC.

- Inhibitory receptors bind angptls and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature*. 2012;485:656-660
34. Muramoto A, Tsushita K, Kato A, Ozaki N, Tabata M, Endo M, Oike Y, Oiso Y. Angiopoietin-like protein 2 sensitively responds to weight reduction induced by lifestyle intervention on overweight Japanese men. *Nutr Diabetes*. 2011;1:e20
  35. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317-325
  36. Roubille F, Kritikou EA, Roubille C, Tardif JC. Emerging anti-inflammatory therapies for atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*. 2013 Feb 15, epub, PMID: 23438958
  37. Tabit CE, Holbrook M, Shenouda SM, Dohadwala MM, Widlansky ME, Frame AA, Kim BH, Dues MA, Kluge MA, Levit A, Keaney JF, Jr., Vita JA, Hamburg NM. Effect of sulfasalazine on inflammation and endothelial function in patients with established coronary artery disease. *Vasc Med*. 2012;17:101-107
  38. Tardif JC, L'Allier P L, Ibrahim R, Gregoire JC, Nozza A, Cossette M, Kouz S, Lavoie MA, Paquin J, Brotz TM, Taub R, Pressacco J. Treatment with 5-lipoxygenase inhibitor via-2291 (atreleuton) in patients with recent acute coronary syndrome. *Circulation. Cardiovascular imaging*. 2010;3:298-307
  39. Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Fortier A, Perrault LP, Carrier M, Thorin E. Chronic treatment with n-acetylcysteine delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev*. 2008;129:261-270

### Figures legends

**Figure 1:** *Angptl2 stimulates the expression of inflammatory markers in EC* Quantitative RT-PCR analysis of TNF- $\alpha$  and IL-6 mRNA expression was performed in EC freshly extracted from aortas of 3-mo WT and LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup>(ATX) mice stimulated or not (Control) with purified recombinant angptl2 (100 nmol/L). Results were normalized to cyclophilin A (CycloA) expression and average gene expression level in WT control cells was arbitrarily set at 1. Data are mean  $\pm$  SEM of n=4 WT and n=4 ATX mice, each experiment was performed in triplicates. \*: p < 0.05 versus Control; †: p<0.05 versus WT mice.

**Figure 2:** *Angptl2 stimulates leukocyte adhesion to the native endothelium in ATX, but not WT mice* (A) Expression of P-selectin and ICAM-1 mRNA in freshly isolated aortic EC from WT (n=7) and LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup>(ATX, n=6) mice was quantified by quantitative RT-PCR and normalized to cyclophilin A after stimulation or not with purified recombinant angptl2 (100 nmol/L). Data are mean  $\pm$  SEM of n mice. \*: p < 0.05 versus Control; †: p<0.05 versus condition-matched in WT mice. (B) Leukocytes from n=12 WT and n=6 ATX mice were labeled with <sup>51</sup>Cr and incubated with aortic segments stimulated or not (Control) with thrombin (10 U/ml) or purified recombinant angptl2 (100 nmol/L). Adherent <sup>51</sup>Cr-leukocytes were counted and results were expressed as number of adherent cells / mm<sup>2</sup> of endothelium surface area. Data are mean  $\pm$  SEM of n mice. \*: p < 0.05 versus Control; †: p<0.05 versus condition-matched in WT mice. (C) Aortic segments from n=16 WT mice (left panel) and n=9 ATX mice (right panel) were pre-incubated with anti-P-selectin, anti-ICAM-1 antibodies or the corresponding isotype-matched IgG prior to stimulation with purified recombinant angptl2 (100 nmol/L). Adhesion of <sup>51</sup>Cr-leukocytes was then quantified. Data are mean  $\pm$  SEM of n mice. \*: p < 0.05 versus Control; †: p<0.05 versus + angptl2 condition;  $\phi$ : p<0.05 versus antibody + angptl2 condition.

**Figure 3:** *Angptl2 mRNA abundance and cell surface expression of cell adhesion molecules in leukocytes from both WT and ATX mice* Basal and angptl2-induced mRNA expression of (A) CD18, (B) CD62L and (C) CD162 in leukocytes from 3-mo WT

(n=6) and ATX (n=6) mice, were quantified by quantitative RT-PCR and normalized by cyclophilin A. Cell surface protein expression of (D) CD18, (E) CD62L and (F) CD162 was quantified in Control and angptl2-treated WT (n=6) and ATX (n=6) leukocytes by flow cytometry. Leukocytes were labeled using monoclonal anti-CD18, anti-CD62 and anti-CD162 antibodies or with corresponding isotype-matched IgG (data not shown). Data are mean  $\pm$  SEM of n mice. \*:  $p < 0.05$  versus Control condition.

**Figure 4:** *Chronic angptl2 infusion for 1 month accelerates atherogenesis in 3-mo ATX mice* (A) Infusion with angptl2 promotes the expression of inflammatory cytokines and adhesion molecules in freshly scraped EC from the aorta evaluated by quantitative RT-PCR and normalized by cyclophilin A, (B) angptl2 accelerates the formation of the atherosclerotic plaque and (C) angptl2 increases total cholesterol and LDL plasma levels. Data are mean  $\pm$  SEM of n=5 angptl2-infused mice and n=5 TBSE-infused mice. \*:  $p < 0.05$  versus TBSE condition.

**Figure 5:** *Angptl2 plasma levels and angptl2 expression in the atherosclerotic plaque increase with age and atherosclerosis* (A) Samples corresponding to equal amounts of total protein were collected from plasma in wild-type mice (WT, n=4) and LDLr<sup>-/-</sup>;hApoB<sup>+/+</sup> (ATX, n=4) mice at 3, 6 and 12 months of age. Low abundant proteins in the plasma samples were enriched using Bio-Rad ProteoMiner protein enrichment kits. Following enrichment, the samples were resolved on SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and probed with an antibody against angptl2. Uniform protein loading and transfer was verified by staining membranes with Ponceau red. Results (arbitrary units, AU) are presented as the mean  $\pm$  SEM of 4 mice in each group. \*:  $p < 0.05$  versus 3-mo mice;  $\phi$ :  $p < 0.05$  versus 6-mo mice. (B) Photographs of the atherosclerotic lesion in abdominal aorta from 6-, 9- and 12-mo LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup> (ATX) mice. (C) Proteins were specifically extracted from the lesion and Western blot analysis was performed for angptl2 (n=4 at 6-, 9-, and 12-mo ATX mice) and F4/80 (n=3 at 6-, 9-, and 12-mo ATX mice), a marker of mature macrophages. (D) Correlation between angptl2 level (Pearson  $r = 0.8959$ ,  $p < 0.0001$ ,  $r^2 = 0.8026$ , n=12), F4/80 (Pearson  $r = 0.9682$ ,  $p < 0.0001$ ,  $r^2 = 0.9373$ , n=9), and the surface area of the lesion. Data are mean



± SEM of n mice. \*:  $p < 0.05$  versus 6-mo ATX mice;  $\gamma$ :  $p < 0.05$  versus 9-mo ATX mice.

**Figure 6:** *Aortic angptl2 immunofluorescence increases with age and the progression of atherosclerosis with a marked accumulation within the atherosclerotic plaque*  
Immunofluorescence was used to visualize angptl2 in (A) fresh longitudinally opened aortas and (B) frozen aortic sections of WT and LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup> (ATX) mice at 6 and 12 months of age. In Panel A, z-stacks were acquired, deconvolved, and 3D images rendered. Angptl2 accumulates in the plaque and in the media. Angptl2 levels are shown in red and basal membrane in green. Nuclei are shown in blue. (C) Double-immunostaining of angptl2 (red) and CD-31 (green) in frozen aortic sections from 6-mo ATX mice, showing that angptl2 co-localizes with the endothelial marker CD-31.

**Figure 7:** *Expression and secretion of angptl2 is greater in EC than in VSMC but angptl2 binding is higher in VSMC than in EC* (A) Western blot analysis of endogenous angptl2 secreted into the culture medium overnight (16 h) by hIMAEC, HUVEC and VSMC. Angptl2 protein expression was also quantified in the cell lysates. (B) Endogenous angptl2 expression in the cells was detected by immunofluorescence using a confocal microscope. Scale bar represents 20  $\mu$ m. (C) Quantitative RT-PCR analysis of angptl2 mRNA expression was performed in the cell lysate from cultured cells (n=3 hIMAEC, n=3 HUVEC, n=3 VSMC). Results were normalized to GAPDH expression and average gene expression level in hIMAEC was arbitrarily set at 1. Data are mean ± SEM of n=3, each experiment was performed in duplicates. \*:  $p < 0.05$  versus hIMAEC. (D) To assess angptl2 binding, hIMAEC, HUVEC and VSMC were incubated for 10 min with human angptl2-luciferase (100 nmol/L) in phenol-free medium. Cells were then washed and the binding of angptl2-luciferase to cell surface was revealed by adding the luciferase substrate. A selection of confocal time-series images acquired in a single living cell at 0, 50 and 200 seconds is shown (left panel). The average angptl2-luciferase fluorescent signals (AU) recorded in VSMC (n=6 cells), hIMAEC (n=6 cells) and HUVEC (n=4 cells) were derived from the time-series images (right panel). Data are mean ± SEM and the assay was performed 3-4 times.

**Figure 8:** *Plasma angptl2 levels are higher in CAD patients than in healthy volunteers*  
Circulating angptl2 levels were quantified in CAD patients (n=11) and in age-matched healthy volunteers (n=6) by ELISA. Data are presented as dot plot. \*:  $p < 0.05$  versus healthy volunteers.

**Table 1:** Clinical profiles of male subjects in whom plasma angptl2 concentration was measured.

	<b>Healthy volunteers</b>	<b>CAD</b>
	<b>(n=6)</b>	<b>(n=11)</b>
Age (years)	60 ± 3	60 ± 4
Glucose (mM)	5.2 ± 0.1	5.6 ± 0.2
Triglycerides (mM)	1.4 ± 0.2	1.1 ± 0.2
Total cholesterol (mM)	4.8 ± 0.2	3.8 ± 0.2 *
HDL cholesterol (mM)	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1
LDL cholesterol (mM)	2.9 ± 0.2	2.0 ± 0.2 *
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23.9 ± 0.9	28.2 ± 1.1 *
SAP (mm Hg)	118 ± 5	132 ± 5
DAP (mm Hg)	72 ± 3	80 ± 2 *

Data are mean±SEM of n=6 healthy individuals and n=11 CAD patients. \*: p<0.05 *versus* healthy volunteers.

Figure 1

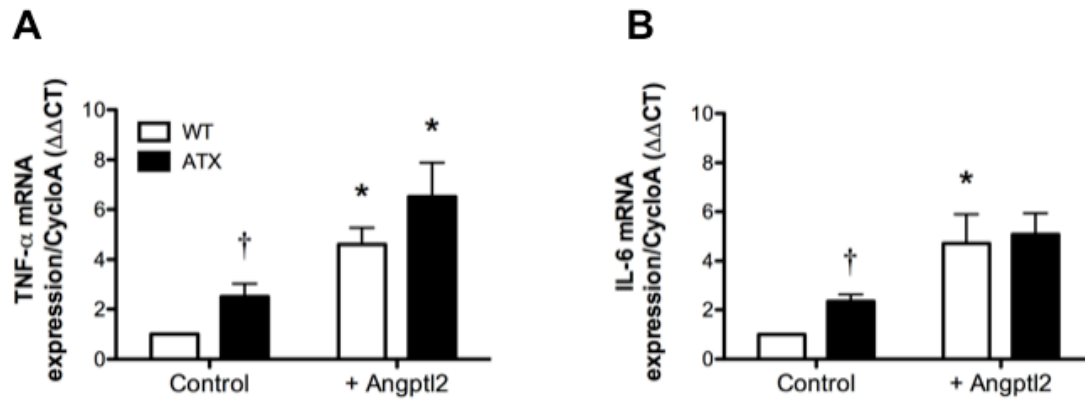


Figure 2

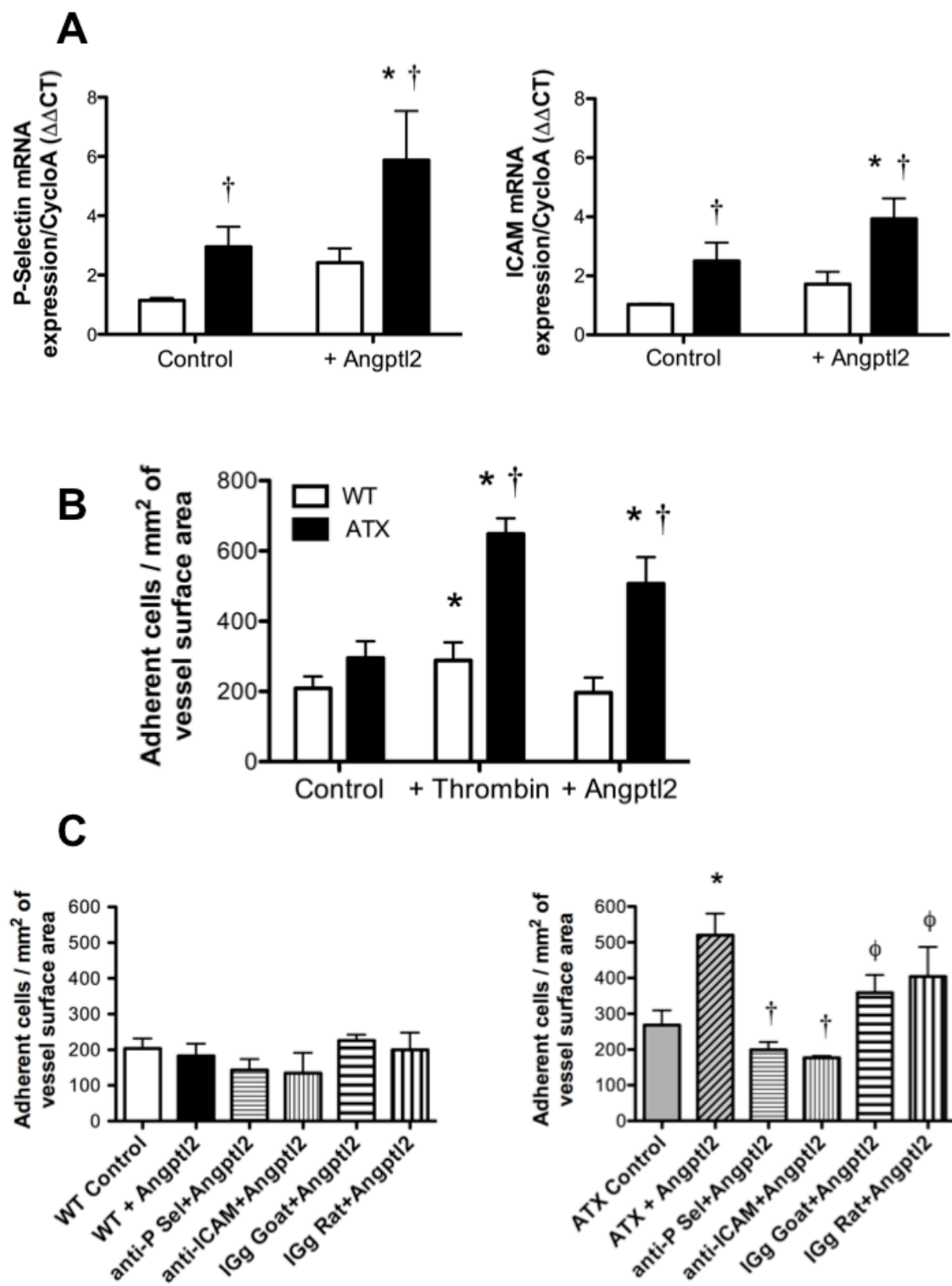


Figure 3

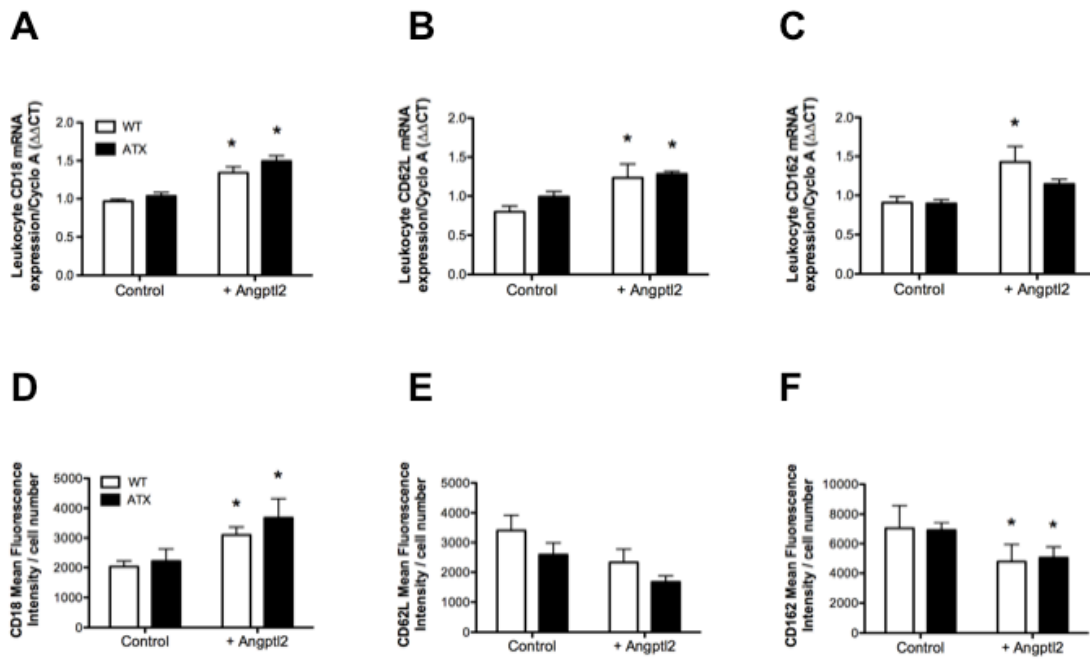


Figure 4

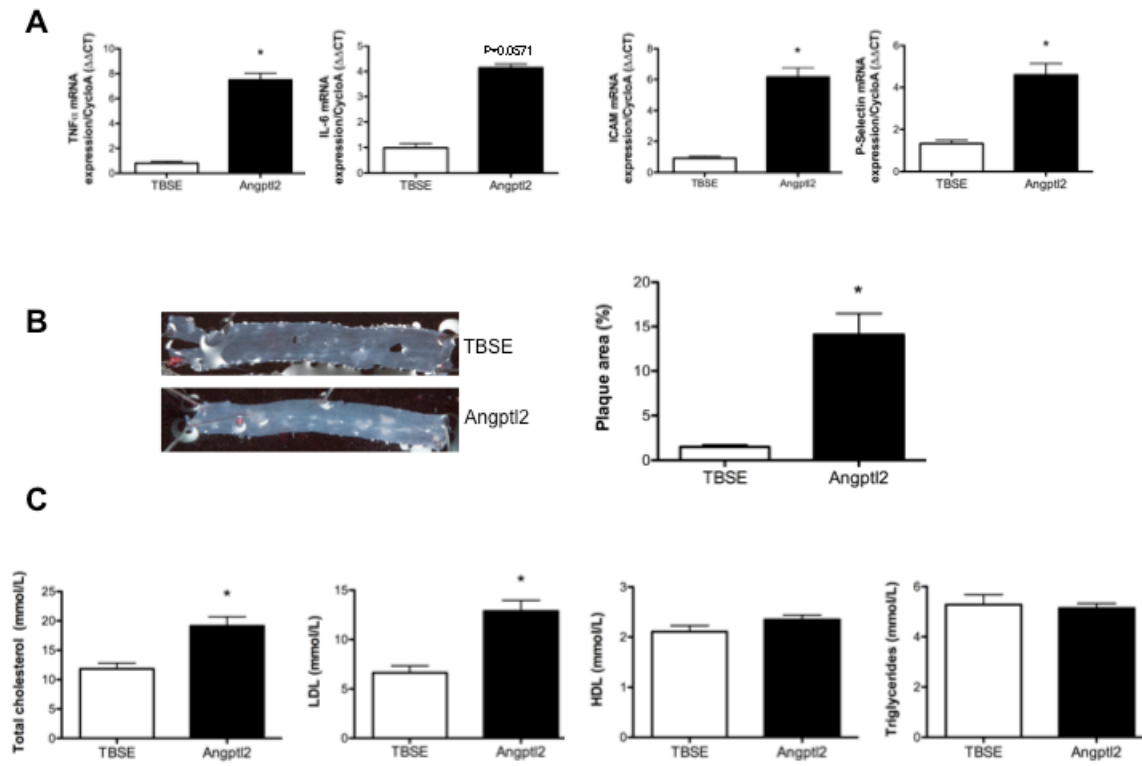


Figure 5

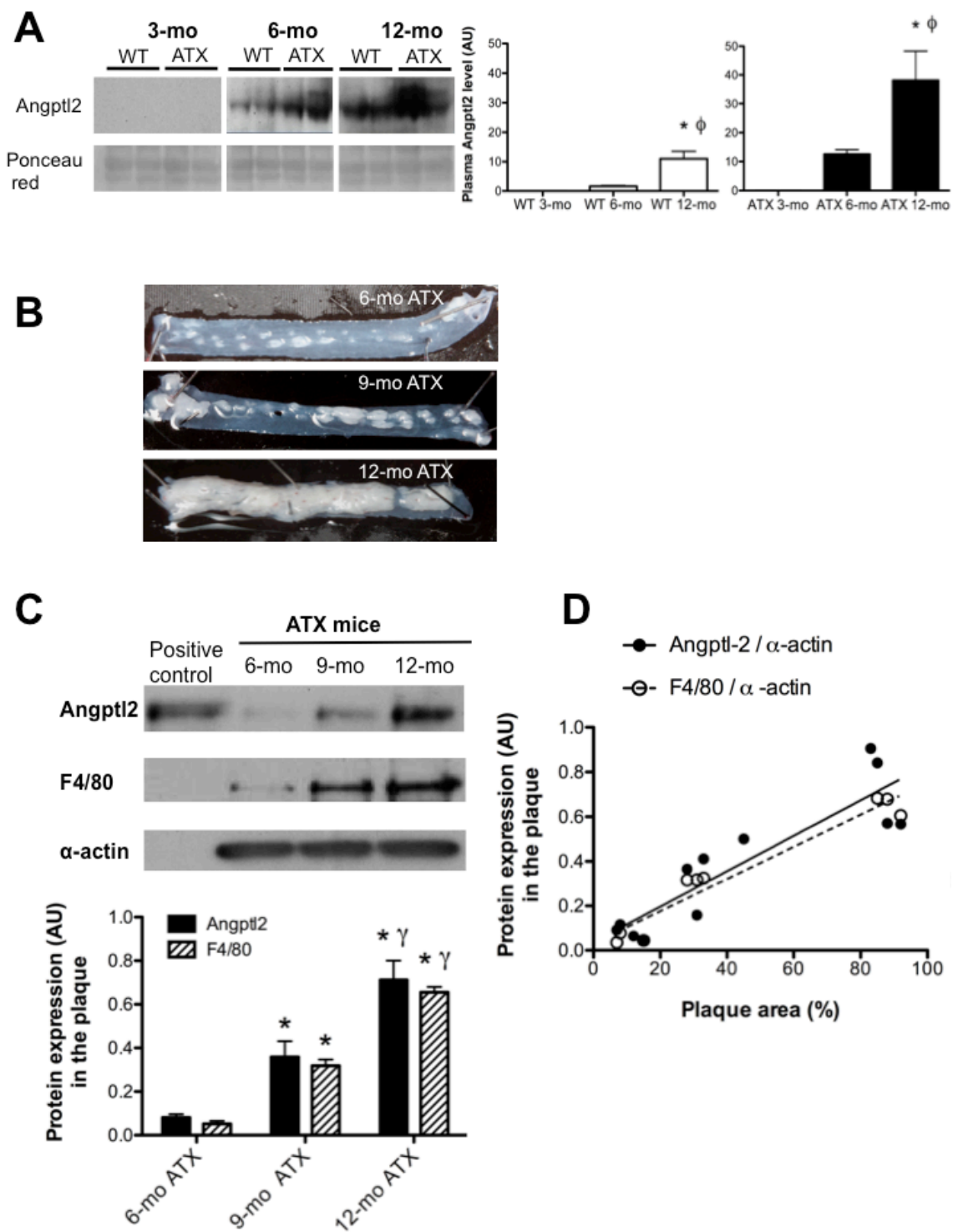




Figure 6

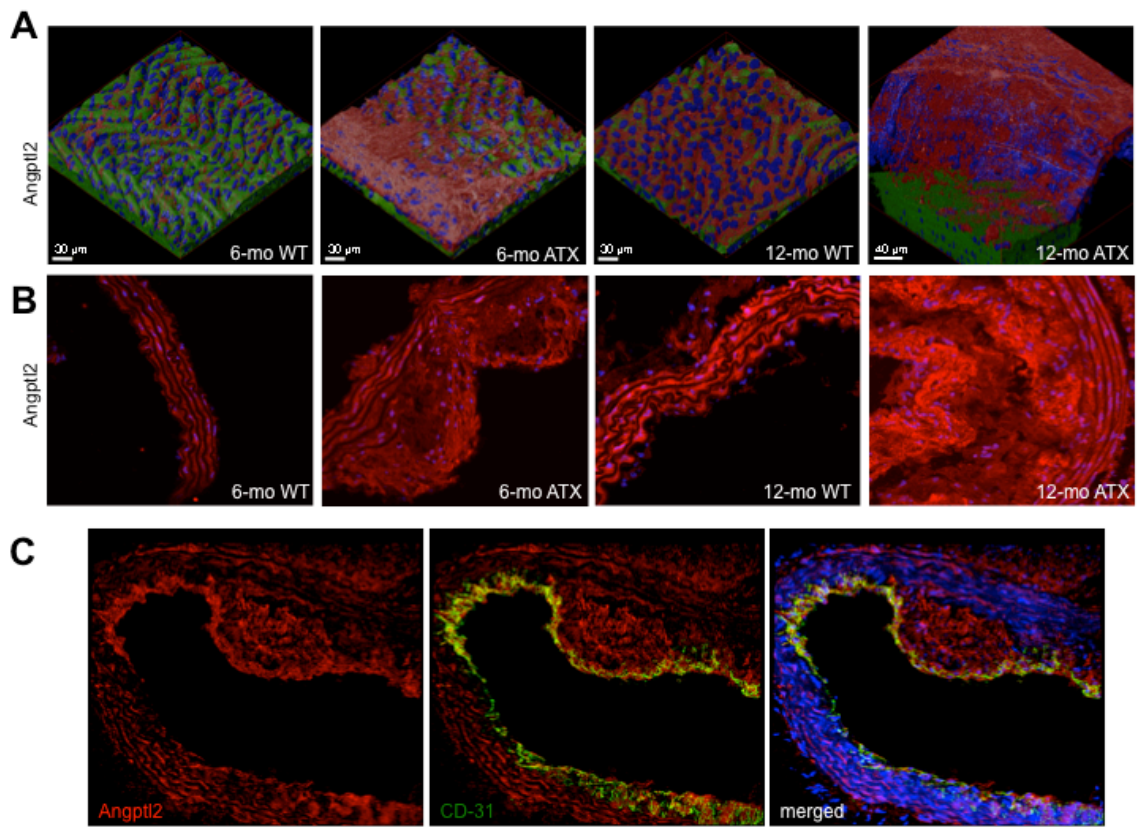


Figure 7

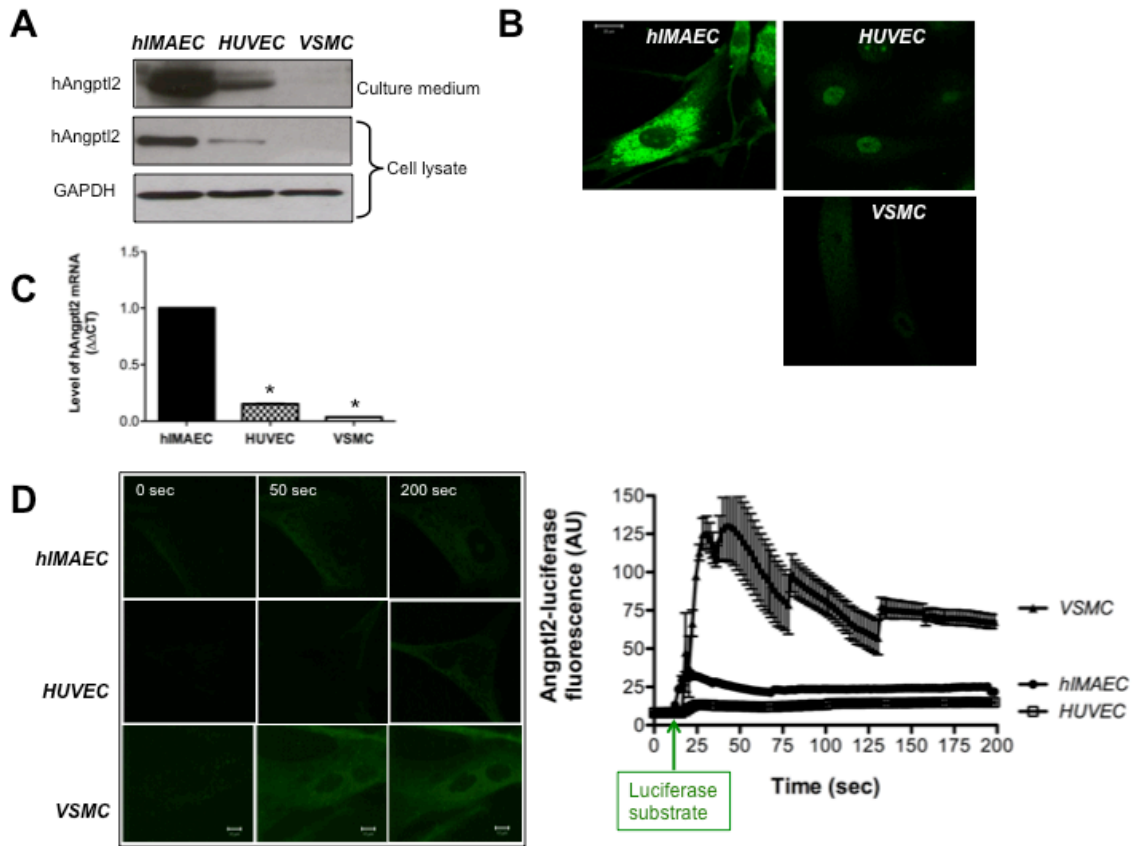
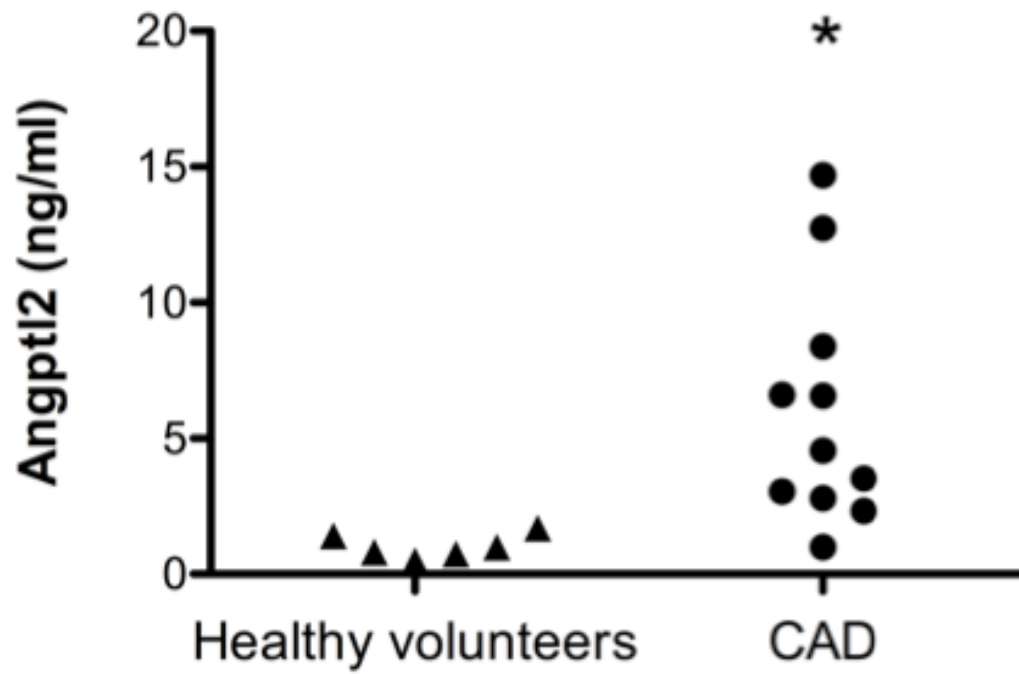


Figure 8



## Angiopoietin-like 2 promotes atherogenesis in mice

Nada Farhat<sup>1</sup>, Nathalie Thorin-Trescases\*, Maya Mamarbachi\*, Louis Villeneuve\*, Carol Yu<sup>1</sup>, Cécile Martel<sup>1</sup>, Natacha Duquette\*, Mathieu Gayda<sup>2</sup>, Anil Nigam<sup>2</sup>, Martin Juneau<sup>2</sup>, Bruce G. Allen<sup>2</sup> and Eric Thorin<sup>1, 3</sup>

### ***SUPPLEMENTAL MATERIAL***

#### ***Expanded Methods***

*Angptl2-GST construct* To generate a recombinant protein, angptl2 was fused to glutathione S-transferase (GST) at its C-terminus. Angptl2 was cloned into pSPORT1 vector (clone ID LIFESEQ2268890) (Open Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The pSPORT1 insert was subcloned in pcDNA3.1 (Life Technologies, Burlington, ON, Canada) and angptl2 cDNA insert was confirmed by sequencing. To clone GST in phase 3' to angptl2, the angptl2 stop codon was first removed from the pcDNA3.1 construct by PCR and the latter was ligated and amplified. GST cDNA was generated by PCR using pGEX6P2vector (GE Health Care Lifescience, Baie d'Urfe, QC, Canada) as template and ligated in phase with the 3' end of angptl2. The final clone was confirmed by sequencing.

*Purification of the angptl2-GST fusion protein* HEK-293 cells were transfected with the pGEX6P2 plasmid vector containing angptl2-GST cDNA using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. To obtain stable cell lines, transfected HEK-293 cells were cultured in the presence of 1 mg/ml of Geneticin (G418, Life Technologies). Culture medium from transfected HEK-293 cells was collected twice a week, centrifuged for 2 h at 100 000 g (4°C) and then loaded (2 liters of medium) onto a GSTrap HP column (GE Health Care). After extensive washing of the column with Tris-Buffered Saline-EDTA (TBSE, pH 7.5) to remove unbound proteins, the recombinant protein was eluted with 10 ml of the washing buffer

containing 10 mmol/L of glutathione (pH 8.0, Roche). The wash and eluted products were collected (20 fractions; 0.5 ml/tube). To assess the purity of the eluted recombinant protein, an aliquot of each fraction was resolved on SDS-PAGE (15% acrylamide) and proteins revealed using Coomassie Brilliant blue R250 (Figure S1, Panel A). The elution of angptl2-GST was confirmed by Western blot (Figure S1, Panel B). In addition, the Coomassie-stained band eluting in fractions F16-F18 was excised and confirmed to be angptl2-GST by sequencing on LC/MS-MS. The fractions containing angptl2-GST were pooled, concentrated using a centrifugal concentrator (Centricon plus 20, Millipore, Billerica, MA), dialyzed against TBSE at 4°C and quantified using BSA as a standard. For long-term storage, purified angptl2-GST was aliquoted and frozen at -80°C. From the 2 liters of medium loaded on the column, at least 50 µg of purified angptl2-GST protein were recovered.

*Animal models* All experiments were performed in wild-type (WT) C57Bl/6 and in our colony of knockout/transgenic atherosclerotic LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sup>+/+</sup> (ATX) male mice fed a normal diet. Mice were anaesthetized with 44 mg/kg ketamine and 2.2 mg/kg xylazine and ventilated.

*Quantification of circulating levels of angptl2 in mice after purification of plasma proteins by immunodepletion* High-abundance plasma proteins masking angptl2 levels were removed using the ProteoMiner protein enrichment kit optimized for plasma samples (BioRad, Mississauga, ON, Canada) following the manufacturer's recommendations. To quantify plasma angptl2, 1 µl of the ProteoMiner eluate was subjected to analysis by Western blot (see below).

*Quantification of Angptl2 levels in aorta tissues* Aortas extracted from WT and ATX mice were powdered under liquid nitrogen and solubilized in a lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 at 4°C, 20 mmol/L β-glycerophosphate, 20 mmol/L NaF, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L EGTA, 1 mmol/L Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mmol/L benzamidine, 0.5 mmol/L PMSF, 10 µg/ml leupeptin, 5 mmol/L DTT, 1 µmol/L microcystin and 1% (v/v) reduced Triton X-100). The whole-tissue lysate was centrifuged for 15 min at 10 000 g and 4°C.

The protein concentration was determined in the supernatant using  $\gamma$ -globulin as a standard.

*Quantification of angptl2 in the atherosclerotic lesion* Atherosclerotic plaques were dissected from the aorta of ATX mice, homogenized in liquid nitrogen and cells were disrupted for 10 min with 1ml of QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Toronto, ON, Canada) 1/5 volume of chloroform was added to the cell lysate, incubated for 15 min at room temperature and centrifuged for 15 min (12, 000 x g at 4°C). After removal of the upper aqueous phase, DNA was precipitated from the organic phase with 1 volume of 100% ethanol (5 min, room temperature). Samples were then centrifuged to sediment DNA. Protein in the phenol/ethanol supernatant was precipitated with 1 volume of isopropanol. After incubation for 20 min at room temperature, samples were centrifuged to remove supernatant and the pellet was precipitated with 2 ml of guanidine/ethanol for 20 min at room temperature. The pellet was washed with 2 ml of 100 % ethanol for 20 min at room temperature and then centrifuged at 7500 x g for 5 min. This step was repeated three times. After air drying, the pellet was dissolved in denaturing solution (10 mol/L urea / 50 mmol/L DTT) and incubated 1h at room temperature. During the last incubation, samples were sonicated 10 times on ice and then centrifuged 10 min at 10,000 x g. The samples were then analyzed by SDS-PAGE.

*Western blot* To detect angptl2 expression, 1  $\mu$ l from the enrichment plasma sample, 50  $\mu$ g of tissue-lysate protein, 50  $\mu$ g of the lesion protein or 0.5  $\mu$ l from the purified recombinant angptl2 protein were denatured by heating (80°C) in Laemmli sample buffer, resolved by electrophoresis on 12.5% SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose (0.45 $\mu$ m) at 100 V and 4°C for 90 min. After blocking, membranes were incubated for 3 h with a goat anti-angptl2 antibody (dilution 1:200, R&D Systems, Minneapolis, MN, #AF2084) at room temperature in 5% milk, then washed three times with TBST (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.05 % (v/v) Tween-20) and re-incubated with an anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (dilution 1:10,000 in 5% [w/v] milk, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) for 2h at room temperature. Immunoreactive bands were revealed with

Enhanced Chemiluminescence Substrate using BioMax BML Kodak films. The protein loading was normalized to  $\alpha$ -actin immunoreactivity (dilution 1: 10<sup>6</sup>, Ambion Life technologies, Burlington, ON, Canada) or to Ponceau red (for plasma samples).

*Quantification of plaque area.* Thoracic aortas still attached to the heart were removed and dissected from surrounding tissues. The aortic arch and the aorta were opened longitudinally from the aortic valve through the end of the thoracic aorta and pinned on a Petri dish. Unstained aortas were directly photographed and digitalized. Plaque areas were quantified using Gimp 2.6 software ([www.gimp.org](http://www.gimp.org)) and expressed in percentage of total aorta area.

*RNA extraction and RT reaction* Total RNA was extracted from leukocytes and from freshly isolated EC, scraped with a blade from longitudinally opened segments of the thoracic aorta, using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). Total RNA was also extracted from whole aortic tissue using the RNeasy Fibrous Tissue Kit (Qiagen) to quantify mRNA *angptl2* expression in aortas. Contamination with DNA was prevented by a digestion with a DNase I mix (Qiagen) according to the manufacturer's guidelines and total RNA was quantified using a NanoDrop ND-100 spectrophotometer. Total RNA was reverse transcribed to generate a cDNA library, following the manufacturer's protocol. Briefly, 1  $\mu$ g of total RNA was mixed with 100 ng of random primers and 1  $\mu$ l of 10 mmol/L dNTP mix in a total volume of 12  $\mu$ l. Samples were incubated at 65°C for 5 min. Then, 4  $\mu$ l of 5X First-Standard buffer, 2  $\mu$ l of 0.1mol/L of DTT, 1  $\mu$ l of RNase out and 1  $\mu$ l of Moloney murine leukemia virus (M-MLV) reverse transcriptase were added and incubated 50 min at 37°C. The RT reaction was stopped by heating at 70°C for 15 min.

*Real time quantitative PCR* 25  $\mu$ l of qPCR reaction mix contained 12.5  $\mu$ l of Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies), a final concentration of 300 nmol/L of forward and reverse primers (2  $\mu$ l; Table S1), 0.5  $\mu$ l of reference dye ROX (Life Technologies) and 1 ng (10  $\mu$ l) of cDNA sample. The qPCR reactions were performed using a MxPro3000 platform (Agilent, Mississauga, ON, Canada) with the following profile: initial step of enzyme activation (10 min at 95°C) then 40 cycles of

denaturing (30 s at 95°C), annealing (1 min at 55°C) and extension (1 min at 72°C). The primers of target genes were designed using the Clone Manager software (Table S1). The efficiency of real time qPCR was calculated using a standard curve. The presence of a valid product was confirmed by both the appearance of a single peak in the dissociation curve and by sequencing. All samples were run in duplicate and the fold changes in gene expression were calculated by a  $\Delta\Delta C_T$  method using cyclophilin A or GAPDH as the housekeeping gene.

*Immunofluorescence* Freshly dissected thoracic aortas were cut longitudinally and fixed in a Petri dish with the endothelium faced up. Aorta sections were washed with PBS, fixed with 4% paraformaldehyde (in PBS, pH 7.45) for 30 min at room temperature, washed again with PBS and then blocked with 2% normal donkey serum in PSB for 1 h at room temperature. Fixed tissue segments were then incubated with goat anti-angptl2 (1:50, R&D Systems) or anti-CD31 (1: 50, Abcam, #ab7388-50) in the blocking buffer for 2 h at room temperature. Aorta sections were washed with PBS and incubated for 2 h at room temperature with the appropriate secondary antibody (Alexa fluor-555 donkey anti-goat, #A21433, Molecular Probes, Burlington, ON, Canada) diluted 1:500 in the blocking buffer. Nuclei were stained with TO-PRO3 (1:1000, Life Technologies). After washing, sections were mounted between coverslips and glass slides and fluorescence was visualized using a confocal microscope (Zeiss, Toronto, ON, Canada). Negative controls were performed by omitting the primary antibodies during the staining procedure.

*Preparation of leukocytes in suspension* Spleens were dissected from WT and ATX mice, gently crushed and squeezed into single cells in 5 ml RPMI 1640 medium (Life Technologies). The cell suspension was passed through a 200- $\mu$ m mesh and then centrifuged for 20 min at 1200 rpm. Contaminating erythrocytes were lysed by agitating with 4 ml of water (for 15 s) followed by the addition of 4 ml of 1.8% NaCl. Leukocytes were filtered, washed twice and resuspended with the appropriate volume of RPMI 1640 medium as described previously (Gendron *et al.*, 2010). Briefly, the leukocytes were suspended in 2 ml of RPMI 1640 medium and labeled with  $^{51}\text{Cr}$  (activity of 100  $\mu\text{Ci}$ ,



Perkin-Elmer, Waltham, MA) for 1 h at 37°C, with gentle agitation every 15 min. Leukocytes were then centrifuged and washed three times. The number of leukocytes was counted and the cell density adjusted to  $1 \times 10^6$  cells/ml with DMEM.

*Splenocyte adhesion to native endothelium* Aorta was carefully dissected, cut into sections and pinned out with EC facing up onto silicone-coated Petri dishes. The aorta sections were treated for 30 min with or without 100 nmol/L of recombinant Angptl2, 10 U/ml of thrombin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada), anti-P-selectin (1:50, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, #sc6943), anti-ICAM-1 (1:50, Santa Cruz Biotech, #sc-1511), goat-IgG (1:50, Santa Cruz Biotech, #sc-2028) or rat-IgG (1:50, Santa Cruz Biotech, #sc-2026) (Gendron *et al.*, 2010).

After 30 min of stimulation, aortic segments were washed and incubated with 20  $\mu$ l of labeled leukocytes for an additional 30 min. The segments were then washed and the radiation was detected using a gamma counter. The number of leukocytes adhering to the endothelium was expressed per surface area of the segment (adherent cells/mm<sup>2</sup> of endothelium surface area).

*Expression of adhesion molecules on the leukocytes* The expression of CD18 (#553293), CD62L (#553151) and CD162 (#555306) (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada) was analyzed by imaging flow cytometry (AMNIS, Markham, ON, Canada). Leukocytes in suspension ( $5 \times 10^6$  cell/ml) were stimulated with or without 100 nmol/L of angptl2 (for 10 min at 37°C) and then fixed in 2% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. After three wash steps with ice-cold PBS, leukocytes were labeled with monoclonal antibodies conjugated with phycoerythrin (PE, 5:100, BD Biosciences) or with their isotype control IgG (5:100, PE-rat IgG<sub>2a,k</sub> isotype #553930 and PE-rat IgG<sub>1,k</sub> isotype #553925, BD Biosciences) in the dark, for 30 min at 4°C. Nuclei were stained by incubating the leukocytes with DRAQ5 dye (1:10 000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, #4084) for 10 min at 4°C. Fluorescence was assessed on an AMNIS ImageStream system using 488 nm and 678 nm lasers to excite DRAQ5 and PE, respectively. A total of 5000 events were acquired for each sample. All data were collected with INSPIRE software and analyzed with IDEAS analytical software.

*Cell culture* Experiments were performed with (i) human internal mammary arteries endothelial cells (hIMAEC), (ii) HUVEC (Lonza, Mississauga, MA) and (iii) VSMC (Lonza). hIMAEC were isolated from discarded segments of IMA from patients undergoing coronary artery bypass graft and were cultured as previously described (Voghel *et al.*, 2007).

*Angptl2-Gussia luciferase-GST construct* To visualize angptl2 binding to receptors on the cell surface, EC and VSMC were incubated with recombinant angptl2-luciferase. The vector pCMV Gussia luciferase was a gift from Dr Stéphane Angers (University of Toronto, ON, Canada). Briefly, the stop codon was removed by PCR from pSPORT1 Angptl2 (Open Biosystems) and the coding sequence was fused in phase to the 5' end of Gussia luciferase by overlapping PCR. The validation of the construct was confirmed by sequencing. HEK-293 cells were transfected with angptl2-luciferase-pcDNA 3.1 or with luciferase-pcDNA 3.1 (as a negative control). Cells were plated into 175 cm<sup>2</sup> flasks and allowed to grow to 90% confluence in the presence of Geneticin. The medium was then replaced by starving phenol red-free DMEM and the cells were cultured for 48 h at 37°C. The medium was then collected, centrifuged 1 h at 100 000xg and the angptl2-luciferase concentrated 1,000-fold using an Amicon Stirred-Cell system (membrane nominal molecular weight limit 10 kDa). The concentration of angptl2-luciferase protein was estimated by Western blot and the protein was used at ~100 nmol/L.

For live cell imaging, VSMC or EC (HUVEC and hIMAEC) were cultured overnight on coverslips inserted in a 35 mm petri dish, in their respective medium. The cells were washed two times with phenol-free medium and incubated for 10 min with HEK-293-angptl2-luciferase or HEK-293-luciferase transfected medium. The fraction of angptl2-luc binding to the cell surface was monitored by the activity of luciferase, using Gussia Luciferase assay kit (New England Biolabs, Whitby, ON, Canada). Live cells were monitored using a confocal microscope (Zeiss, Toronto, ON, Canada) before and immediately after addition of the luciferase substrate. During image acquisition, petri dishes were maintained at 37°C for the duration of the video and supplied with 5% CO<sub>2</sub>. A 450 nm laser was used and images (512x512), acquired at 0.5 sec intervals, were collected with a 63x/1.4 plan apochromat Oil DIC objective.

*Western blot* Cells were homogenized in a Triton based lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5 at 5°C, 20 mmol/L  $\beta$ -glycerophosphate, 20 mmol/L NaF, 5 mmol/L EDTA, 10 mmol/L EGTA, 1 mmol/L  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 10 mmol/L benzamidine, 0.5 mmol/L PMSF, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 5 mmol/L DTT, 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  microcystin and 1% (v/v) reduced Triton X-100). Cell homogenates were centrifuged for 15 min at 10 000xg and 4°C. Protein concentrations in the supernatant were determined by the Bradford method using  $\gamma$ -globulin as a standard.

To measure the secretion of endogenous angptl2 into the culture medium, hMAEC, HUVEC or VSMC were cultured in serum free medium for 16 h and 1 ml of this medium was concentrated to 20  $\mu\text{l}$  using Microcon centrifugal filters (with a cutoff of 10 kDa, Millipore) and combined to 10  $\mu\text{l}$  of Laemmli buffer (containing 1% SDS).

For Western blot analysis, the proteins (50  $\mu\text{g}$  of protein from the cell lysate, 20  $\mu\text{l}$  from the concentrated culture medium or 2  $\mu\text{l}$  from the purified recombinant protein) were resolved by electrophoresis as described above.

*Fluorescent immunocytochemistry* hMAEC, HUVEC and VSMC were cultured for 24 h on coverslips, washed with PBS, fixed with 2% paraformaldehyde (in PBS, pH 7.45) for 20 min at room temperature, washed again with PBS and then blocked with 2% normal donkey serum and 0.1% Triton X-100 in PSB for 1 h at room temperature. The cells were then incubated with an angptl2 specific antibody and then with the Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-goat secondary antibody (#A11055, Molecular Probes) as described above. Fluorescence was visualized using a confocal microscope. Negative controls were performed in the absence of the primary antibody.

## ***Expanded Results***

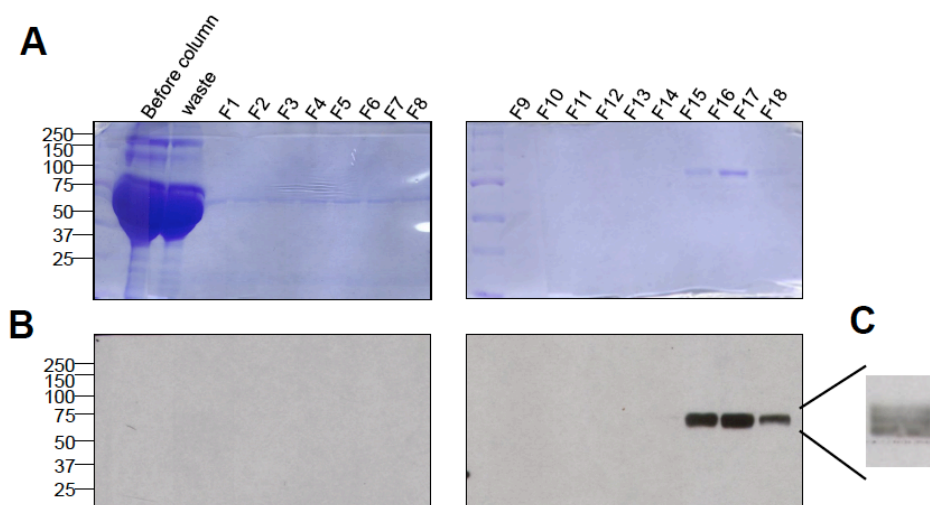
*Expression and purification of angptl2 fusion protein* Angptl2-GST was expressed in HEK-293 cells and purified (> 95%, Figure S1A) by affinity chromatography on GSTrap HP columns. The recombinant angptl2-GST protein migrated at ~90 kDa, which corresponds to the calculated molecular weight of angptl2 (64 kDa) plus GST (28

kDa). Human angptl2-GST migrated as three bands on SDS-PAGE (Figures S1B-C), likely the result of glycosylation. Angptl2 possesses two consensus glycosylation sites that can shift its mass from 57 to 64 kDa. To confirm this possibility, recombinant angptl2-GST was incubated with N-glycosidase, after which angptl2-GST migrated on SDS-PAGE as a single band (data not shown). Thus, the purified recombinant angptl2 is a glycoprotein, similarly to the endogenous native protein.

**Supplemental Table 1:** Sequence of primers (5'→3') used in qRT-PCR.

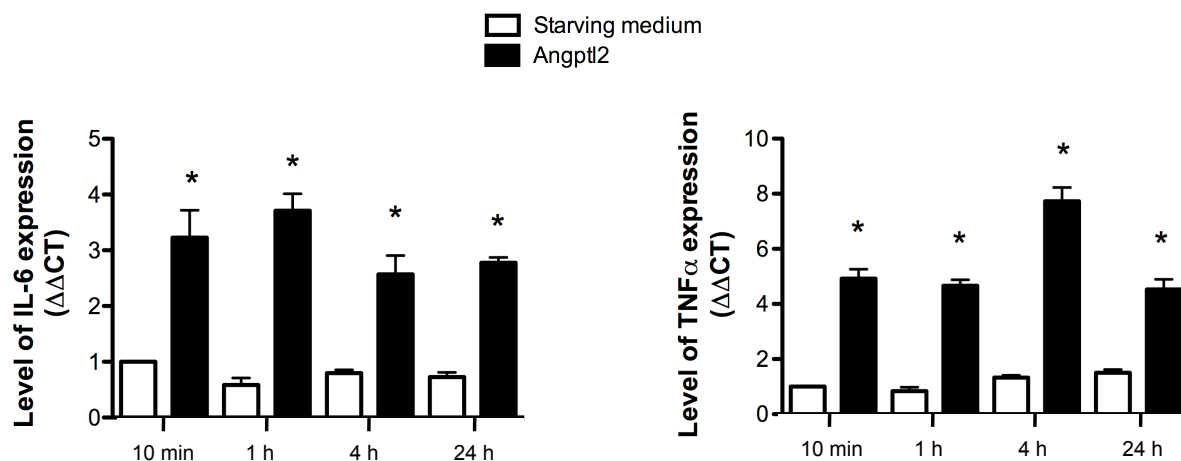
<i>Gene</i>	<i>Sense</i>	<i>Antisense</i>
<i>angptl2</i>	GATCCAGAGTGACCAGAATC	TCTCAGGCTTCACCAGGTAG
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	TGATCCGCGACGTGGAAGTGG	CGACGTGGGCTACAGGCTTGTC
<i>IL-6</i>	CCATAGCTACCTGGAGTACATGA	GTCCTTAGCCACTCCTTCTGTGA
<i>P-selectin</i>	GGAGTGCATCGAGACCATTG	GGATGGCTGCAGTTCATGAG
<i>ICAM-1</i>	GACAGCAGTCCGCTGTGCTT	GAGGTCTCAGCTCCACACTC
<i>CD18</i>	CAACGAGATCACCGAGTCTG	CTGGTTGGAGTTGTCGGTTA
<i>CD62L</i>	CATGGAGATGTGAGGGTACT	CCATGGTGTATCAGGAAGTC
<i>CD162</i>	TCACTGAGGCAGAGTCGTTT	CAAGATGGTCAGCAGCACAA
<i>CycloA</i>	CCGATGACGAGCCCTTGG	GCCGCCAGTGCCATTATG

**Figure S1:** Purification of human *angptl2* recombinant protein. Coomassie blue (A) and Western blot (B) analysis of the recombinant *angptl2*-GST protein purified by affinity chromatography on glutathione Sepharose. (A) Lane 1 in each gel contains protein molecular weight markers, lane 2 (in first gel) represents sample before purification, lane 3 represents the flow-through fraction. Fractions 1 to 18 (F1-F18) represent the column wash and product eluted. (B) Western blot detection using a human *angptl2* antibody. Coomassie blue staining shows the purity of the protein and Western blot detection confirms the presence of *angptl2*-GST. (C) Purified *angptl2* presents three bands on SDS-PAGE.

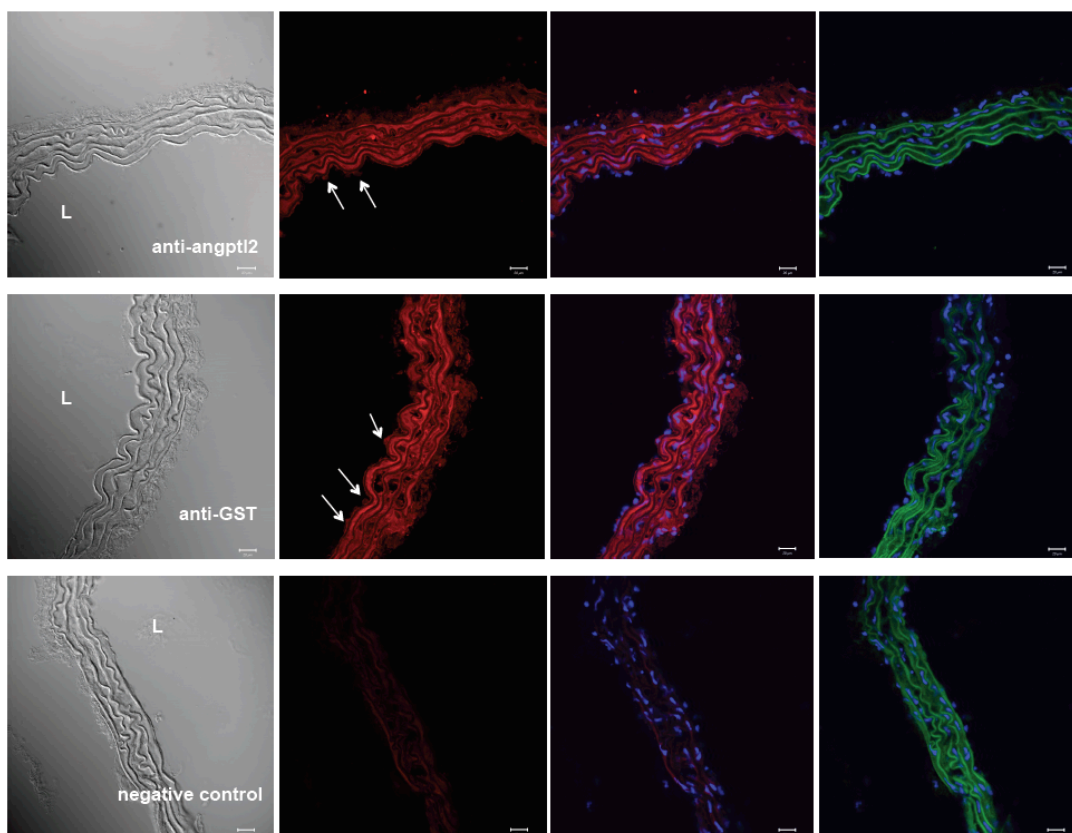


**Figure S2:** *Angptl2 stimulation promotes expression of inflammatory molecules.*

Quantitative RT-PCR analysis of IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA was performed in cultured HUVEC stimulated or not (Starving medium) with recombinant angptl2 (100 nM) for 10 min, 1 h, 4 h or 24 h. Results were normalized to cyclophilin A expression and the average mRNA level in un-stimulated cells (starving medium for 10 min) was arbitrarily set at 1. Data are mean  $\pm$  SEM of n=3, each experiment was performed in triplicate. \*: p < 0.05 vs. Starving medium (paired condition).

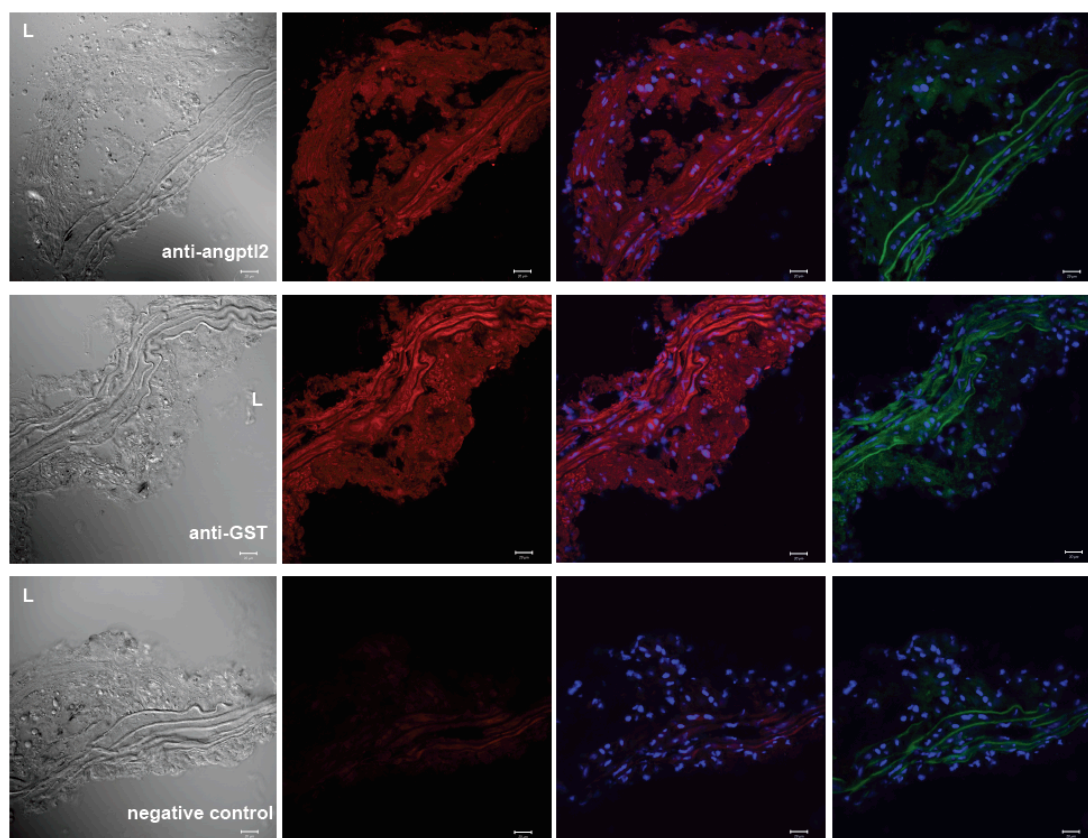


**Figure S3:** *Binding of an angptl2-GST fusion protein to endothelial cells and vascular smooth muscle cells.* Angptl2 binding on 6-mo LDLr<sup>-/-</sup>;hApoB<sup>+/+</sup> aortic cross sections (without atherosclerotic lesion) incubated for 30 min with purified recombinant angptl2-GST was visualized by immunofluorescence using anti-angptl2 (top panels) or anti-GST (middle panels). In the negative control (bottom panels), the primary antibody was omitted. Angptl2 or GST is shown in red, basal membrane in green and nuclei in blue. Phase contrast images, angptl2 or GST immunostaining, angptl2 or GST and nuclei, and basal membrane and nuclei are shown in 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> column, respectively. L: lumen of the artery. The arrows indicate endothelial cells positive for angptl2 or for GST (scale bar = 20 μm).

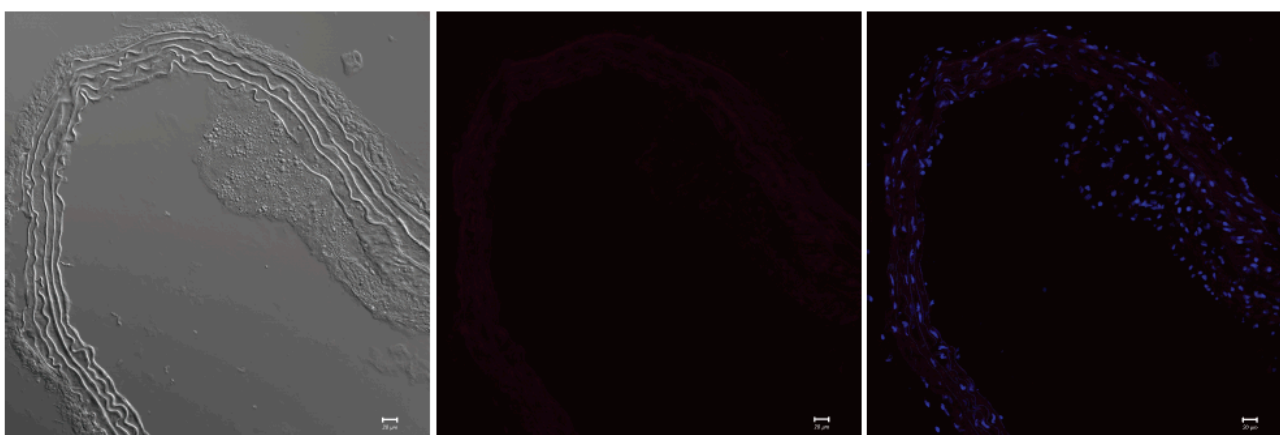
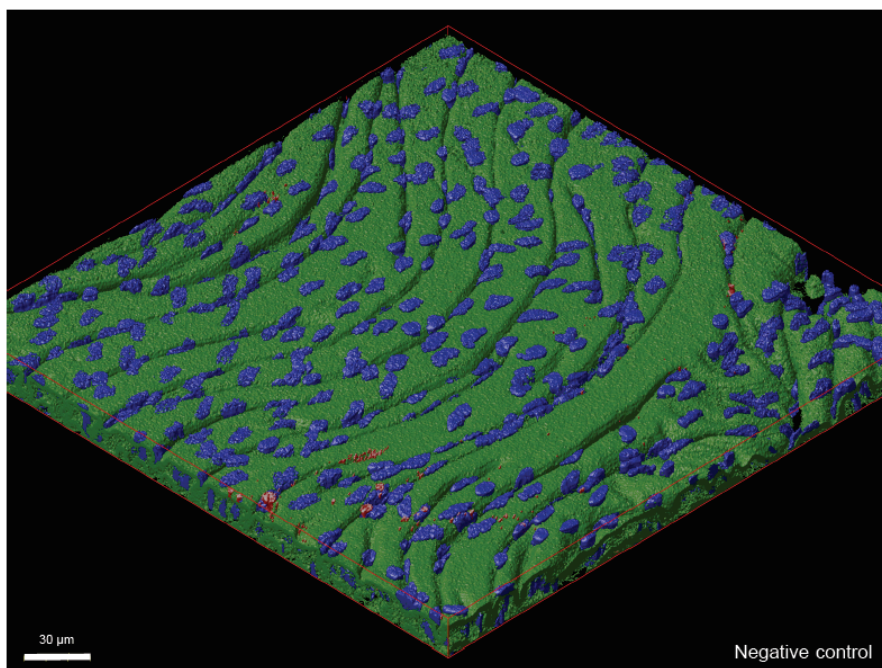




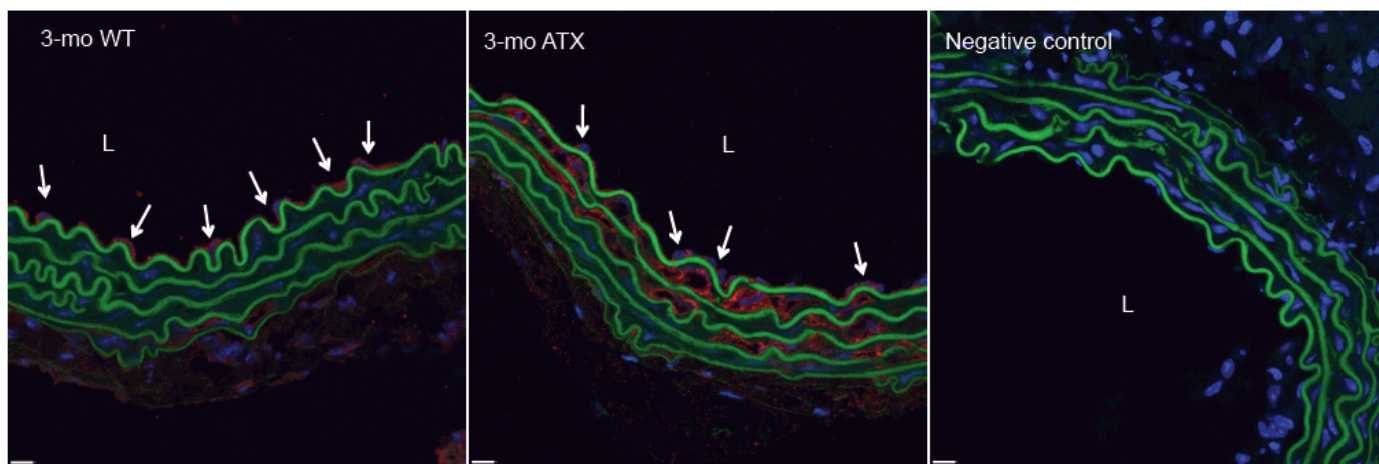
**Figure S4:** *Binding of an angptl2-GST fusion protein to vascular smooth muscle cells and plaque.* Angptl2 binding on 6-mo LDLr<sup>-/-</sup>;hApoB<sup>+/+</sup> aortic cross sections (with atherosclerotic lesion) incubated for 30 min with purified recombinant angptl2-GST protein was visualized by immunofluorescence using anti-angptl2 (top panels) or anti-GST (middle panels). In the negative control (bottom panels), the primary antibody was omitted. Angptl2 or GST is shown in red, basal membrane in green and nuclei in blue. Phase contrast images, angptl2 or GST immunostaining, angptl2 or GST and nuclei, and basal membrane and nuclei are shown in 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> column, respectively. L: lumen of the artery (scale bar = 20 μm).



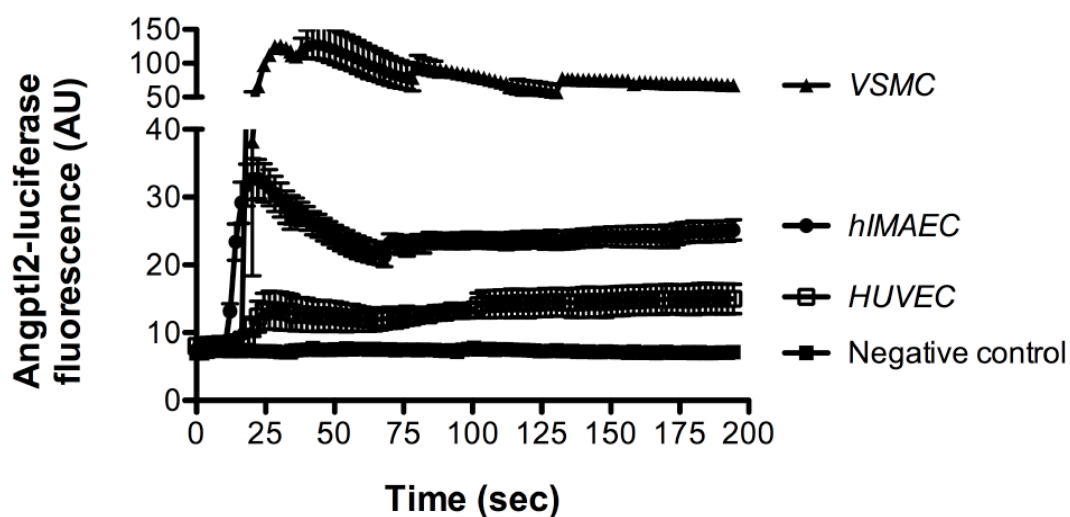
**Figure S5:** *Negative control for aortic en face (top) and cross section (bottom) staining of angptl2.* During immunostaining (confocal imaging), the primary antibody against angptl2 was omitted. Non-specific signal is shown in red, nuclei in blue and basal membrane in green (for en face staining only). Top panel, scale bar = 30  $\mu\text{m}$ ; bottom panels, scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure S6:** *Low angptl2 immunoreactivity in vascular cells from young mice.* Angptl2 immunoreactivity on aortic cross sections from 3-mo wild-type (WT) and LDLr<sup>-/-</sup>;hApoB<sup>+/+</sup> (ATX) mice was visualized by immunofluorescence using anti-angptl2 antibody. In the negative control, the primary antibody was omitted. Angptl2 is shown in red, basal membrane in green and nuclei in blue. L: lumen of the artery. The arrows indicate endothelial cells positive for angptl2 (scale bar = 11 μm).



**Figure S7: Negative control for *angptl2*-luciferase activity** Cultured VSMC, HUVEC and hMAEC were incubated 10 min with 100 nmol/L HEK-293-*angptl2*-luciferase; VSMC were also stimulated with HEK-293-vector-luciferase (negative controls). Cells were then washed and the binding of *angptl2*/vector-luciferase to cell surface was revealed by adding the luciferase substrate and by monitoring the activity of luciferase. The average *angptl2*-luciferase fluorescent signals (AU) recorded in hMAEC (n=6) and HUVEC (n=4), and the average vector-luciferase fluorescent signals (negative controls) recorded in VSMC (n=4) were derived from the confocal time-series images.



*Supplemental References*

- 1 Gendron, M. E., Theoret, J. F., Mamarbachi, A. M., Drouin, A., Nguyen, A., Bolduc, V., Thorin-Trescases, N., Merhi, Y. and Thorin, E., Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298: H2062-2070.
- 2 Voghel, G., Thorin-Trescases, N., Farhat, N., Nguyen, A., Villeneuve, L., Mamarbachi, A. M., Fortier, A., Perrault, L. P., Carrier, M. and Thorin, E., Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors, *Mech Ageing Dev*, 2007, 128: 662-671.

# Discussion

## 4. Discussion

Des études récentes suggèrent un rôle pathologique de l'Angptl2 dans le développement de maladies inflammatoires chroniques telles que les maladies cardiovasculaires (Kadomatsu *et al.*, 2011; Kubota *et al.*, 2005b; Oike *et al.*, 2005b; Oike *et al.*, 2009b), le cancer (Aoi *et al.*, 2011; Endo *et al.*, 2012; Kikuchi *et al.*, 2008), l'arthrite rhumatoïde (Okada *et al.*, 2010) et la dermatomyosite (Ogata *et al.*, 2012). Sachant que l'Angptl2 est un ligand pour un récepteur potentiel (section 1.4.2.), il est logique d'imaginer que cette protéine est susceptible de moduler des voies de signalisation dans le but d'exacerber l'inflammation et de dégrader les mécanismes de défense intracellulaire. Nos travaux suggèrent que l'Angptl2, initialement identifiée par *Differential Display* dans des cellules sénescents, est augmentée en présence de sénescence induite par le stress oxydant dans les CE de patients coronariens; est corrélée au vieillissement précoce et à l'inflammation des CE de patients fumeurs atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique; a des effets pro-oxydants; contribue au développement de l'athérosclérose chez la souris; son taux circulant est 6 fois supérieur chez des patients coronariens Canadiens par rapport à des sujets sains du même âge. La discussion sera présentée sous forme de questions : je discuterai surtout des liens possibles entre l'effet inhibiteur de l'Angptl2 sur les défenses antioxydantes intracellulaires et ses implications pathologiques, car cet aspect n'a jamais été discuté dans la littérature auparavant et pourrait, à mon avis, être à l'origine des différentes fonctions délétères de l'Angptl2. Une deuxième partie discutera de l'Angptl2 comme un biomarqueur potentiel de l'athérosclérose *via* ses fonctions pro-angiogéniques et sur l'impact de cette angiogenèse sur l'expansion et l'instabilité de la plaque. Pour terminer, les récepteurs Toll-like méritent d'être signalés comme récepteurs potentiels de l'Angptl2 puisque l'activation de ces récepteurs mime les effets de l'Angptl2. Finalement, je résumerai les principaux obstacles et limitations rencontrés au cours de la réalisation de mes travaux.

#### **4.1. L'Angptl2 contribue-t-elle à l'athérosclérose par le biais d'une dérégulation de l'équilibre redox *via* la voie Nrf2 dans les cellules endothéliales ?**

La fonction de Nrf2 réside dans la nature des gènes dont il contrôle l'expression. Les gènes cibles de Nrf2 possèdent des fonctions de protection cellulaire contre le stress oxydant et les xénobiotiques et ils sont impliqués dans la régulation de l'équilibre *redox* intracellulaire (Li *et al.*, 2009). De ce fait, Nrf2 est défini comme un facteur de transcription protecteur et sensible à l'équilibre *redox* intracellulaire (Kensler *et al.*, 2007). L'activation du système de défense intracellulaire de Nrf2/l'HO-1 est considérée comme un mécanisme de protection face aux augmentations du niveau de ROS associées avec les maladies inflammatoires (Singh *et al.*, 2010). Une surexpression de l'Angptl2 a été observée dans le diabète (Tabata *et al.*, 2009), le cancer (Aoi *et al.*, 2011), l'athérosclérose (Horio *et al.*, 2010; Tabata *et al.*, 2009) et plusieurs autres maladies inflammatoires chroniques (Ogata *et al.*, 2012; Okada *et al.*, 2010). D'un autre côté, nos résultats démontrent une inhibition chronique (après 24 h) de la voie Nrf2/HO-1 induite par l'Angptl2 dans les HUVEC. Nous avons aussi observé une production de ROS stimulée par la présence d'Angptl2 dans ces cellules. L'ensemble de ces observations suggère que l'Angptl2 joue un rôle essentiel dans la dérégulation de l'équilibre *redox* à l'intérieur des CE en situation pathologique telle que l'athérosclérose, et ce par deux mécanismes possibles : l'accélération de la synthèse de ROS et en parallèle, l'activation des voies de signalisation intracellulaires menant à l'inhibition de Nrf2 et donc de la synthèse des enzymes antioxydantes telles que HO-1. Dans la littérature, les résultats publiés concernant une implication directe du facteur de transcription Nrf2 dans le développement de l'athérosclérose sont peu nombreux. Une étude récente propose l'hypothèse selon laquelle l'activation de Nrf2 dans les CE protège contre le développement de l'athérosclérose et de l'inflammation causés par de faibles forces de cisaillement (Zakkar *et al.*, 2009). Les auteurs démontrent que Nrf2 est constitutivement actif dans les sites exposés à des forces de cisaillement élevées, ce qui



protège ces régions contre l'athérogénèse. Cependant, Nrf2 est exprimé sous sa forme inactive, dans le cytosol, dans les régions susceptibles au développement de l'athérosclérose, c'est-à-dire les régions où les forces de cisaillement sont faibles. Un traitement avec le sulforaphane, un antioxydant et un puissant activateur de Nrf2 indépendamment des forces de cisaillement (Thimmulappa *et al.*, 2002), rétablit les fonctions antioxydantes dans les régions susceptibles à l'athérosclérose chez les souris de type sauvage mais pas chez les souris Nrf2<sup>-/-</sup> (Zakkar *et al.*, 2009). Il a aussi été démontré que la voie du Nrf2 contrôle la croissance des CML en culture puisque l'activation génétique de Nrf2 arrête la prolifération de ces cellules *in vitro* (Villacorta *et al.*, 2007). Ceci est en accord avec la prolifération accrue des CML dans la plaque athérosclérotique quand Nrf2 est inhibé chez la souris (Villacorta *et al.*, 2007). Ces données confèrent au Nrf2 un rôle de protection cellulaire dans la prévention de l'athérosclérose supportant notre hypothèse qu'une inhibition de cette voie par l'Angptl2 est à l'origine de sa fonction pro-athérosclérotique.

## **4.2. L'Angptl2 contribue-t-elle à l'athérosclérose par la modulation des mécanismes moléculaires de Nrf2 impliqués dans la réaction inflammatoire ?**

Outre ses effets protecteurs vis-à-vis des changements *redox*, Nrf2 joue également un rôle modérateur dans les réactions inflammatoires, une fonction qui a été mise en évidence chez la souris invalidée pour le gène codant pour le Nrf2 (souris Nrf2<sup>-/-</sup>) : ce modèle de souris présente des phénotypes atypiques qui reflètent essentiellement des réponses inflammatoires anormales (Iizuka *et al.*, 2005). Parmi ces phénotypes, on observe chez les souris Nrf2<sup>-/-</sup> l'apparition d'un emphysème pulmonaire massif et une hypoxie bronchiale lors d'une exposition prolongée à la fumée de cigarettes, à l'hypoxie ou aux allergènes (Iizuka *et al.*, 2005). Ces souris présentent une infiltration accrue de cellules inflammatoires dans les petites artères pulmonaires (Iizuka *et al.*, 2005). L'apparition du syndrome de lupus érythémateux et de la susceptibilité accrue aux

toxines (Yoh *et al.*, 2001) observées chez la souris Nrf2<sup>-/-</sup> soulignent le rôle majeur de Nrf2 en tant que régulateur de réactions inflammatoires.

Il a été démontré qu'une délétion génétique de Nrf2 (souris Nrf2<sup>-/-</sup>) augmente dramatiquement l'expression des cytokines inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-1 et COX2 dans les CE (Thimmulappa *et al.*, 2002) et mène à l'activation soutenue du facteur de transcription NF- $\kappa$ B qui induit, à son tour, la transcription de cytokines inflammatoires (Li *et al.*, 2008). Ces mécanismes de signalisation semblent être exercés dans les CE et les macrophages (extraits de la plaque), deux joueurs qui contribuent au processus d'inflammation et à la production de ROS dans le contexte pathologique d'athérosclérose (Singh *et al.*, 2010). Chez des macrophages isolés de souris Nrf2<sup>-/-</sup>, une exposition à un agent inflammatoire tel que le lipopolysaccharide (LPS) conduit à un niveau excessivement élevé de ROS et à une activation des signaux intracellulaires (tels que la stimulation de NF- $\kappa$ B, de p38 MAPK et de VCAM-1), menant à une réponse inflammatoire intense qui reste activée pour une longue durée (24 h en culture) (Thimmulappa *et al.*, 2006). L'activation de ces voies est contrôlée par l'équilibre *redox* intracellulaire où Nrf2 exerce une fonction primordiale (Kolls, 2006). Dans notre quatrième étude, nous avons démontré qu'une activation des CE avec l'Angptl2 inhibe la voie de Nrf2 et conduit à la surproduction de cytokines inflammatoires. Selon les travaux publiés par le Dr Oike et son équipe, l'inflammation induite par l'Angptl2 se fait *via* le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Tabata *et al.*, 2009). Nous proposons que la réponse pro-inflammatoire induite par l'Angptl2 est, du moins partiellement, dépendante du blocage de la voie de Nrf2/HO-1, menant à l'activation de NF- $\kappa$ B et à la synthèse de cytokines inflammatoires. Il a aussi été proposé que le promoteur du gène de l'Angptl2 contient un élément régulateur de liaison pour le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et qu'une stimulation avec la cytokine inflammatoire TNF- $\alpha$  déclenche la synthèse de l'Angptl2 (Zheng *et al.*, 2011). Ces résultats pourraient indiquer l'existence d'un mécanisme de rétro-activation (un *feedback* positif) entre le niveau de l'Angptl2 et l'activation des voies inflammatoires, mécanisme par lequel l'Angptl2 contribuerait à accélérer l'athérosclérose.

### **4.3. La voie Nrf2/HO-1 est-elle contrôlée par les effets néfastes - inflammatoires et oxydants - de l'Angptl2 ?**

Dans des conditions d'inflammation et d'oxydation, l'activation de Nrf2 semble être biphasique : il a été montré que dans le cas de l'hyperglycémie associée au diabète, la voie de Nrf2 est initialement activée afin d'induire une défense anti-oxydante, puis, une production excessive de ROS finit par inhiber Nrf2 menant ainsi au découplage de la NOS, à la dysfonction mitochondriale et à la perte des défenses anti-oxydantes (Gao *et al.*, 2009). Ce même profil de réponse a été observé au cours du remodelage associé à l'hypertrophie cardiaque : le gène de Nrf2 est régulé transitoirement à la hausse durant le stade précoce de la maladie où la fonction cardiaque est préservée, puis l'expression de Nrf2 chute avec la dysfonction et l'adaptation cardiaques à un stade avancé du remodelage cardiaque (Li *et al.*, 2011). De façon plus mécanistique, des résultats montrent chez les souris KO pour Keap1 une sensibilité accrue au stress oxydant et une apoptose cellulaire (Strachan *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent, selon les auteurs, que l'abondance nucléaire de Nrf2 est régulée à la hausse et à la baisse (réponse biphasique), d'où l'hypothèse selon laquelle une activation des gènes possédant un ARE correspond à une réponse anti-oxydante précoce, et qu'un puissant stimulus (ou une exposition à long terme) fait intervenir des régulateurs négatifs, diminuant l'expression de ces mêmes gènes protecteurs (Jain *et al.*, 2006; Jaiswal, 2004). Cette séquence d'évènements moléculaires ressemble aux effets de l'Angptl2 observés sur Nrf2. Nos résultats (étude 4) indiquent que l'Angptl2 induit une réponse biphasique, avec une activation précoce de Nrf2/HO-1 (<1h de stimulation avec l'Angptl2) suivie d'une inhibition chronique (> 4h de stimulation avec l'Angptl2). Par conséquent, l'Angptl2 pourrait être un puissant modulateur de Nrf2/HO-1.

La capacité de Nrf2 à protéger les CE de l'inflammation réside dans l'inactivation de la voie de signalisation MKK/p38 MAPK et en conséquence, la suppression de l'expression des molécules d'adhésion telles que VCAM-1 et les cytokines inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et MCP-1 (Chen *et al.*, 2006b; Chen *et al.*, 2003). Ces mécanismes semblent être absents dans les sites susceptibles à l'athérosclérose (Zakkar

*et al.*, 2009). L'inactivation de p38 MAPK se fait à l'aide de la MAPK phosphatase-1 (MKP-1) qui possède, à ce niveau, un double rôle protecteur : une phosphatase inhibitrice de la p38 MAPK et par conséquent de la synthèse des molécules d'adhésion, et un agent anti-inflammatoire inhibant la formation des cytokines dans les CE (Singh *et al.*, 2010). Le mécanisme par lequel Nrf2 déclenche l'activité catalytique de la phosphatase MKP-1 n'est pas encore clarifié, mais un environnement *redox* serait à la base mécanistique de l'inactivation de p38 MAPK (Zakkar *et al.*, 2009).

Nous sommes les premiers à avoir démontré que l'Angptl2 possède une puissante capacité pro-oxydante (étude 4); de plus, l'abondance de l'Angptl2 dans les CE est associée à un niveau élevé de ROS (étude 5) et de peroxydation des lipides membranaires (étude 2). Nos résultats montrent que le niveau de stress oxydant augmente en présence d'Angptl2 exogène, et que la production endogène d'Angptl2 augmente dans un environnement pro-oxydant [dans les CE de patients coronariens (études 1 et 2) ou chez les souris athérosclérotiques (étude 5)]. De même, la production endogène d'Angptl2 diminue significativement suite à l'inactivation des composés radicalaires par un traitement pharmacologique avec un anti-oxydant tel que le NAC (étude 1). En parallèle, nous avons prouvé que l'Angptl2 est un activateur potentiel de la voie de signalisation p38 MAPK (étude 4). Ces données permettent de proposer l'hypothèse selon laquelle l'Angptl2, par le biais de l'inhibition transcriptionnelle de Nrf2 et l'inhibition potentielle de la phosphatase MKP-1, active la voie p38 MAPK conduisant ainsi à l'activation soutenue de l'expression des molécules d'adhésion par les CE. Cependant, nous ne savons pas si l'Angptl2 exerce un effet direct sur MKP-1. De plus, nous ne savons pas quel impact pourrait avoir une inhibition de MKP-1 ou une activation de p38 MAPK sur l'expression des molécules d'adhésion par l'Angptl2 et/ou sur la capacité de l'Angptl2 à stimuler l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour clarifier s'il existe une relation directe entre l'Angptl2 intracellulaire et l'activation de la voie p38 MAPK, dans le contexte du contrôle de l'équilibre *redox* par le Nrf2.

Nos études révèlent donc que, par ses capacités à déplacer l'équilibre *redox* à l'intérieur de la cellule, l'Angptl2 diminue, voire inhibe les mécanismes de protection cellulaire, favorise l'expression des molécules d'adhésion et des cytokines inflammatoires. Dans

ces conditions, l'expression de l'Angptl2 est elle-même exacerbée en présence de TNF- $\alpha$  et des ROS, favorisant ainsi une boucle de rétro-activation positive entre le niveau d'Angptl2, l'inflammation et l'oxydation. Toutes ces propriétés confèrent à l'Angptl2 un rôle dans l'athérogénèse, et pourraient expliquer l'accélération massive du développement de la lésion athérosclérotique observée chez la souris dyslipidémique après perfusion d'Angptl2 pendant quatre semaines (étude 5).

#### **4.4. L'Angptl2 contribue-t-elle à l'athérosclérose par le biais de l'angiogénèse?**

Comme nous l'avons signalé dans l'introduction de cette thèse (section 1.2.5.2.), l'instabilité de la plaque athéromateuse est une complication redoutable de l'angiogénèse pathologique (Moulton, 2006). Dans leur étude, Dunmore et ses collaborateurs démontrent que les nouveaux vaisseaux sont co-localisés spécifiquement avec des régions extrêmement riches en expression locale de facteurs de croissance tels que le VEGF (Dunmore *et al.*, 2007). De plus, l'utilisation des approches transgéniques et d'inactivation conditionnelle du gène du VEGF démontrent le rôle essentiel de ce facteur angiogénique pour l'induction de l'angiogénèse pathologique, de même que le développement de la plaque (Holm *et al.*, 2009). Un autre exemple de l'implication directe des facteurs angiogéniques au cours de l'athérosclérose est l'utilisation d'un dominant négatif du récepteur au FGF qui atténue significativement la néoformation de vaisseaux sanguins et diminue l'hémorragie chez la souris ApoE (Raj *et al.*, 2006). Ces dernières années, plusieurs études cliniques ont cherché à élaborer des stratégies thérapeutiques afin de renverser la situation ischémique et d'empêcher la pathogénèse de l'athérosclérose en ciblant des facteurs angiogéniques/antiangiogéniques (Lassalette *et al.*, 2011) et des facteurs pro-inflammatoires.

L'Angptl2 exerce un effet pro-angiogénique qui a été mis en évidence dans la première étude publiée par Kim *et al.* en utilisant des HUVEC en culture (Kim *et al.*, 1999b). Ces propriétés pro-angiogéniques de l'Angptl2 ont ensuite été confirmées *in vitro* et *in vivo* (Broxmeyer *et al.*, 2012; Kubota *et al.*, 2005a) et dans notre étude 3.

Cependant, la contribution pathologique de l'angiogenèse induite par l'Angptl2 dans le développement de l'athérosclérose, n'est pas définie.

Compte tenu de nos résultats qui prouvent que, tout comme le VEGF, l'expression de l'Angptl2 est stimulée dans les conditions hypoxiques (étude 2, (Farhat *et al.*, 2008)), et que l'Angptl2 exerce un effet angiogénique sur les CE et favorise la formation des connexions tubulaires entre elles (étude 3 et (Kim *et al.*, 1999b)), il est possible que l'Angptl2, en plus d'intervenir au cours des étapes précoces de l'athérosclérose (l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire), soit impliquée dans l'angiogenèse pathologique de la plaque athéromateuse à des stades plus tardifs.

Il est intéressant de mentionner que dans le cadre de notre étude 2 (Farhat *et al.*, 2008), nous avons observé dans les CE de patients coronariens, une corrélation positive entre l'expression génique de l'Angptl2 et celle de VEGF, et qu'une stimulation des CE avec de l'Angptl2 recombinante ne provoque pas d'augmentation du niveau du gène codant pour la protéine VEGF (étude 4), suggérant que les effets observés sont propres à l'Angptl2 et ne passent pas par l'intermédiaire des actions du VEGF. On peut néanmoins imaginer l'existence d'une synergie entre l'Angptl2 et le VEGF lors de l'angiogenèse associée au processus d'athérosclérose.

L'Angptl2 pourrait déclencher l'angiogenèse pathologique par l'intermédiaire de deux stimulateurs qui sont l'inflammation et l'oxydation. Les rôles de ces deux phénomènes dans l'induction et le maintien de l'angiogenèse au sein de la plaque, ainsi que leur implication primordiale dans l'hémorragie ont été largement étudiés (Ushio-Fukai, 2006; Vuorio *et al.*, 2012).

La relation existante entre l'angiogenèse et l'inflammation est réciproque et est due au fait que l'angiogenèse elle-même peut provoquer l'infiltration des cellules inflammatoires et donc contribuer de façon causale au processus d'inflammation (Slevin *et al.*, 2009). De plus, l'oxydation est également considérée comme un événement causant l'angiogenèse hémorragique (Bochkov *et al.*, 2006). L'inflammation et l'oxydation apparaissent associées à la présence élevée de facteurs angiogéniques, et sont vraisemblablement corrélés à la fragilisation de la chape fibreuse (Kahlon *et al.*, 1992). Afin d'appuyer efficacement l'hypothèse selon laquelle l'Angptl2 est impliquée dans l'inflammation angiogénique, nous allons emprunter les voies moléculaires et

mécanistiques. Tout d'abord, la participation d'une protéine au processus d'inflammation angiogénique est évaluée selon sa capacité à induire l'augmentation de la perméabilité vasculaire pour faciliter la diapédèse des cellules inflammatoires et la stimulation des mécanismes intracellulaires menant à la migration, adhésion et prolifération des CE (Herrmann *et al.*, 2006; Slevin *et al.*, 2009).

L'Angptl2 pourrait activer la signalisation des petites molécules Rho/Rac-1 GTPases (Tabata *et al.*, 2009), une voie qui est considérée à l'origine de la formation de protrusions membranaires et/ou des lamellipodes dans les CE (Ridley, 2001). En utilisant la même argumentation, nous pouvons aussi justifier l'effet de l'Angptl2 sur les leucocytes lors de leur infiltration sous-endothéliale qui pourrait donc être accomplie suite à l'activation de cette molécule GTPasique (Tabata *et al.*, 2009). Aucune étude ne supporte l'argument d'une activation de la voie migratrice au sein des cellules inflammatoires par l'Angptl2, cependant, nos résultats (étude 5) et les travaux du Dr Oike et de son équipe (Tabata *et al.*, 2009) démontrent que les leucocytes possèdent les récepteurs nécessaires pour transmettre les signaux induits par l'Angptl2.

Analysant le rôle potentiel des facteurs angiogéniques et de leurs récepteurs à la surface cellulaire dans le contrôle de l'angiogenèse pathologique, il a été démontré que les facteurs angiogéniques tels que le VEGF et le FGF, interagissent spécifiquement avec les intégrines  $\beta 1$  de surface, les récepteurs qui confèrent à la CE des interactions stables avec la matrice extracellulaire afin d'accomplir l'angiogenèse (Byzova *et al.*, 2000). Les intégrines (surtout  $\beta 1$ ) exprimées à la surface des CE au cours de l'angiogenèse sont spécifiques pour la vitronectine, la fibronectine et le fibrinogène (Armulik, 2002). Outre son rôle majeur dans l'adhérence cellulaire lors de l'angiogenèse, les facteurs de croissance, le VEGF par exemple, semblent emprunter la voie Akt afin d'induire une augmentation de la perméabilité vasculaire (Holm *et al.*, 2009), un processus indispensable à l'infiltration des cellules inflammatoires, elles-mêmes productrices de VEGF, au sein de la plaque (Holm *et al.*, 2009). Sachant que l'Angptl2 possède un domaine d'homologie au fibrinogène dans sa région carboxy-terminale, le Dr Tabata et son équipe ont proposé que l'Angptl2 interagisse également avec l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  à la surface des CE, ce qui lui confère en plus de son activité pro-inflammatoire, une capacité angiogénique (Tabata *et al.*, 2009). Cette hypothèse a été confirmée en

empêchant l'interaction dynamique entre l'Angptl2 et les intégrines à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les différentes intégrines endothéliales (Tabata *et al.*, 2009). Dans cette même étude, les auteurs démontrent une perméabilité vasculaire accrue dans des lignées de souris surexprimant l'Angptl2 (Tabata *et al.*, 2009), suggérant une implication directe de cette dernière dans la perméabilité vasculaire. De façon similaire aux autres facteurs perméabilisants qui stimulent l'angiogenèse pathologique, l'Angptl2 active également la voie Akt (Kubota *et al.*, 2005b; Tabata *et al.*, 2009), cependant l'implication directe de cette voie de signalisation dans la perméabilité vasculaire déclenchée par l'Angptl2 n'a pas encore été démontrée. L'ensemble de ces données propose un mode d'action pour l'Angptl2 dans l'inflammation angiogénique par le biais du contrôle, non seulement de la perméabilité vasculaire, mais aussi de la migration des CE en agissant directement sur la déformation membranaire et indirectement sur les interactions cellule-matrice extracellulaire.

Parallèlement à la voie de l'inflammation, la libération des ROS constitue un deuxième axe majeur par lequel l'Angptl2 pourrait contribuer à l'angiogenèse et à l'athérosclérose. En effet, le processus d'oxydation participe à toutes les étapes de l'athérogénèse depuis l'initiation et l'oxydation des LDL par les CE jusqu'à la lésion avancée et l'hémorragie de la plaque (Kahlon *et al.*, 1992). Un grand nombre d'études a été réalisé pour confirmer l'effet direct du phénomène d'oxydation dans le développement de l'athérosclérose. Dandapat *et al.* ont rapporté que l'oxydation responsable de la formation des ox-LDL est un stimulateur potentiel de l'angiogenèse et de la formation des structures tubulaires par les CE (Dandapat *et al.*, 2007), suggérant ainsi qu'en plus de leurs rôles cytotoxiques, apoptotiques et inflammatoires, les ox-LDL conduisent à l'instabilité de la plaque. De plus, il a été publié que l'oxydation de la phosphatidylcholine qui est le composant prédominant des ox-LDL, active l'angiogenèse de la plaque suite à son accumulation dans les CE des parois vasculaires et dans le plasma des sujets athérosclérotiques (Bochkov *et al.*, 2006). En 2011, Nakagawa et son équipe ont démontré que l'oxydation de cette phosphatidylcholine augmente la capacité du VEGF à accomplir son rôle angiogénique *in vitro* (HUVEC en culture) et à augmenter la déstabilisation de la plaque *via* l'angiogenèse pathologique *in vivo* chez le rat (Nakagawa *et al.*, 2011). De façon similaire, l'angiotensine II active des



mécanismes intracellulaires menant à la déstabilisation de la plaque suite à l'activation de l'expression des métalloprotéases par les CML. L'induction excessive des MMP est dépendante de mécanismes d'oxydation (Kranzhofer *et al.*, 1999b) et de l'activation de NF- $\kappa$ B (Kranzhofer *et al.*, 1999a). Tous ces exemples témoignent d'un rôle capital de l'oxydation dans le phénomène d'angiogenèse.

Nous sommes les premiers à avoir attribué une fonction pro-oxydante à l'Angptl2. De plus, nous proposons une relation réciproque entre l'Angptl2 et l'oxydation. En effet, nous avons prouvé que l'expression de l'Angptl2 est non seulement associée à un environnement oxydant (études 2 et 5) mais induit également la production de ROS (étude 4). Nous avons observé chez des ex-fumeurs une baisse de l'expression génique d'Angptl2 et en même temps, une baisse des marqueurs de l'oxydation (tels que le 4-hydroxy-nonenal, HNE) comparativement à ceux de fumeurs actifs (Farhat *et al.*, 2008), suggérant un effet causal entre l'oxydation produit par le tabagisme et l'expression génique de l'Angptl2. Nous avons montré que l'expression de l'Angptl2 est augmentée de 6 fois dans les CE des patients atteints de MPOC, cellules qui sont à la fois hypoxiques et associées à un niveau élevé de stress oxydant et d'inflammation (Farhat *et al.*, 2008). Nous avons aussi mis en évidence et caractérisé la contribution directe de l'Angptl2 dans le phénomène d'oxydation des CE : l'Angptl2 pourrait provoquer un déséquilibre dans l'équilibre *redox* en favorisant la formation de ROS tout en inhibant les mécanismes endogènes antioxydants tels que la voie Nrf2/HO-1 (étude 4).

Il a été rapporté que l'augmentation des niveaux de ROS suite à la présence excessive de VEGF active préférentiellement les protéines oncogènes G (GTPasiques telles que Rho/Ras), résultant en la néoformation des vaisseaux sanguins (Kranenburg *et al.*, 2004). Tout comme le VEGF, l'Angptl2 qui induit la formation de ROS, pourrait aussi déclencher la voie des petites protéines G Rho/Ras et produire l'angiogenèse pathologique. Tous ces mécanismes moléculaires de l'Angptl2 restent à être démontrés.

La littérature publiée sur le sujet de l'angiogenèse pathologique permet d'extrapoler que l'Angptl2, protéine pro-inflammatoire et pro-oxydante, déclenche la formation de néo-capillaires, facilitant la diapédèse des différentes familles leucocytaires vers les tissus de la plaque et participe à l'hémorragie de ces néotubes fragiles. Cependant, il est

important de ne pas généraliser trop rapidement ces résultats et de reconnaître qu'il s'agit d'hypothèses à vérifier.

#### **4.5. L'Angptl2 pourrait-elle être un ligand qui interagisse avec les récepteurs *Toll-Like Receptors* ?**

Les ox-LDL générées dans l'environnement pro-oxydant de la plaque exercent leurs effets délétères en grande partie par l'intermédiaire des récepteurs modulateurs des réponses immunitaires dans la pathogenèse des maladies autoimmunes, les TLR (Katsargyris *et al.*, 2008; Siegel *et al.*, 2013). Ce système de TLR joue un rôle dans des situations pathologiques comme le suggèrent les différentes données de la littérature (Liu *et al.*, 2008; Tobias *et al.*, 2007). En effet, une perte de la synthèse des récepteurs TLR chez la souris transgénique (TLR<sup>-/-</sup>) retarde le développement de l'athérosclérose comparativement aux souris de type sauvage (Li *et al.*, 2007). Au sein de la plaque athérosclérotique, l'expression des récepteurs TLR se trouve concentrée aux sites d'inflammation dans les macrophages et les CE (une colocalisation avec l'expression de NF-κB) (Edfeldt *et al.*, 2002). Une corrélation positive entre l'abondance des TLR, la vulnérabilité et l'augmentation du volume de la plaque a été observée (Edfeldt *et al.*, 2002). En parallèle, une étude intéressante réalisée à différents stades de l'athérosclérose confirme une corrélation significative entre l'angiogenèse (présence des facteurs angiogéniques) et l'expression des TLR, suggérant une relation de causalité (Monaco *et al.*, 2009). Dans ce contexte, les réponses biologiques observées avec TLR ressemblent à celles de l'Angptl2 (étude 5) : 1) l'expression de l'Angptl2 est associée à la présence des macrophages au sein de la plaque athérosclérotique (étude 5), 2) l'Angptl2 déclenche le processus d'infiltration des leucocytes par l'endothélium vasculaire (étude 5) et 3) l'administration d'Angptl2 (100 nM) pendant quatre semaines déclenche l'expansion de la plaque athérosclérotique chez les souris ATX (LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sub>100</sub><sup>+/+</sup>). Au niveau de son mécanisme d'action, l'activation de la signalisation du récepteur de « scavenger » TLR a pour conséquence d'augmenter la sécrétion des cytokines inflammatoires (IL-1, TNF, MCP-1, interférons), de stimuler les activités catalytiques

des protéases (i.e. les MMP) et de déclencher la libération des molécules nécessaires pour faciliter la progression de l'athérosclérose (i.e. les interférons) (Siegel *et al.*, 2013). Les TLR sont donc considérés comme un lien potentiel entre l'inflammation et les maladies cardiovasculaires (Katsargyris *et al.*, 2008). Plusieurs études démontrent que, dans un contexte pathologique d'athérosclérose, le récepteur TLR active la voie de signalisation inflammatoire intracellulaire de p38 MAPK, mais également les voies Ras/Rhac/Rho kinases qui activent le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Gareus *et al.*, 2008). Encore une fois, l'activation des molécules inflammatoires (études 4 et 5) et la stimulation de la voie p38 MAPK par l'Angptl2 ressemblent aux effets des TLR.

Tel que mentionné dans l'introduction de cette thèse, l'Angptl2 a été récemment identifiée comme un ligand potentiel du récepteur LILRB2 qui joue un rôle au niveau du système immunitaire (Zheng *et al.*, 2012b). Puisque l'Angptl2 semble induire des mécanismes très similaires à ceux déclenchés par les récepteurs « scavenger » TLR, l'Angptl2 pourrait-elle être le ligand d'un récepteur modulateur de la réponse immunitaire autre que LILRB2, soit les TLR ?

Cette hypothèse a été proposée pour la première fois par le groupe japonais du Dr Oike (Kadomatsu *et al.*, 2011; Tabata *et al.*, 2009). Dans un modèle de cellules en culture, les auteurs démontrent que l'Angptl2, *via* son interaction avec un récepteur de la famille des intégrines, active la signalisation de la petite protéine GTPases Rho/Rac (Tabata *et al.*, 2009), des mécanismes d'action intracellulaire semblables aux voies déclenchées par les TLR. De plus, tout comme les TLR, l'Angptl2 est un médiateur de la signalisation intracellulaire conduisant à la stimulation de NF- $\kappa$ B (Tabata, Kadomatsu et al. 2009). De même, nous avons observé que l'Angptl2 active significativement de la voie p38 MAPK (étude 4) et déclenche la synthèse des cytokines inflammatoires par un mécanisme qui fait vraisemblablement intervenir le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Tabata, Kadomatsu et al. 2009). Il semble donc difficile de dissocier les effets de l'Angptl2 de ceux des TLR. Cependant, il ne faut pas oublier que les effets potentiels de l'Angptl2 *via* le récepteur de surface TLR sont basés sur des évidences indirectes, limitant la vérification d'une telle hypothèse.

Les données de la littérature combinées à nos résultats suggèrent un rôle de l'Angptl2 dans le développement vasculaire athéromateux (l'angiogenèse et l'athérogenèse) par le biais d'un récepteur membranaire qui pourrait potentiellement être de la famille des TLR, conduisant à l'inflammation, l'activation des leucocytes, l'angiogenèse et l'augmentation du cholestérol circulant (étude 5). Toutes ces observations permettent de proposer que le rôle potentiellement délétère de l'Angptl2 comprend la stimulation 1) de la réponse inflammatoire avec l'expression des cytokines et des molécules d'adhésion nécessaires au recrutement des cellules immunitaires et 2) de la réponse oxydative *via* la production de ROS et l'inhibition des voies de défenses antioxydantes. L'expression de l'Angptl2 augmente avec la progression de la maladie (étude 5), accélère la formation de la plaque et induit un profil lipidique délétère (étude 5), ce qui représente potentiellement un signal d'activation de l'angiogenèse pour nourrir la plaque, infiltrer des cellules inflammatoires et finalement, contribuer à l'étape décisive et terminale qui est l'hémorragie et la déstabilisation de la plaque. Nos travaux suggèrent donc que l'Angptl2 contribue au processus de l'athérosclérose.

#### **4.6. Limites des travaux**

L'obstacle majeur et non négligeable que nous avons rencontré au cours de nos travaux a été la disponibilité restreinte de la protéine recombinante de l'Angptl2. Dans l'étude 3, nous avons tenté de souligner l'importance de produire la protéine dans des conditions optimales : il est important de mentionner que la protéine Angptl2 est en fait disponible dans le commerce, mais cette Angptl2 est fabriquée dans un système bactérien (ou dans des cellules végétales) qui empêche les modifications post-transcriptionnelles indispensables au bon fonctionnement de l'Angptl2. Afin de surmonter cet obstacle, nous avons testé différentes approches (pendant un an et demi), avec des degrés de réussite variables, avant d'arriver à optimiser les conditions nécessaires et efficaces pour produire une protéine Angptl2 fonctionnelle. La disponibilité de l'Angptl2 ne se limite pas à l'optimisation des conditions d'amplification et de purification, puisque la quantité obtenue suite à la purification est également primordiale. Notre faible rendement de purification est un problème qui a

évidemment limité la réalisation de différentes expériences, même si nous sommes conscients de leur nécessité. Par exemple, nous avons décidé de réaliser nos études (étude 4 et 5) avec une concentration d'Angptl2 exogène de l'ordre de 100 nM (10 µg/ml) sans tester l'effet d'une concentration plus faible, en se basant sur l'étude publiée par l'équipe du Dr Oike qui montre une courbe dose/réponse à l'Angptl2 sur la migration et l'adhésion des CE (Tabata *et al.*, 2009). Dans cette étude, l'Angptl2 produit son effet maximal à la concentration que nous avons utilisée au cours de nos études.

Dans le même ordre d'idée, nous aurions pu tester le niveau de l'activité fonctionnelle de l'Angptl2 (effet chimio-attractant, angiogénique, inflammatoire...) après chaque purification, pour une meilleure homogénéité des résultats. Nous avons évité ces tests afin de pouvoir effectuer d'autres expériences qui nous semblaient plus pertinentes. La disponibilité de l'Angptl2 a été l'étape limitante qui nous a empêché de réaliser certaines études *in vivo* telles que l'administration de l'Angptl2 sur une longue période (> 1 mois) chez la souris afin d'évaluer son impact à long terme sur la progression et l'accélération de l'athérosclérose à des stades plus avancés.

Bien que nos études apportent des données supplémentaires concernant l'implication physiopathologique de l'Angptl2 lors du développement de l'athérosclérose, elles présentent certaines limitations. En fait, l'association observée entre l'expression (endogène ou exogène) d'Angptl2 et le développement de l'athérosclérose (étude 5) n'est pas un argument de causalité; de même, cette association n'indique pas un effet direct de l'angptl2 dans l'athérogénèse. Les effets pro-athérogéniques observés suite à la perfusion i.v. d'Angptl2 sont-ils spécifiques à l'Angptl2?

Deux approches pourraient être élaborées et appliquées afin de vérifier l'effet direct de l'Angptl2 : l'utilisation d'un antagoniste spécifique dans le but de bloquer exclusivement la réponse à la protéine, ou l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques qui n'expriment pas le gène de l'Angptl2. Malheureusement, puisque le récepteur de l'Angptl2 n'est pas connu, aucun antagoniste n'est disponible. Il est important de mentionner que dans le laboratoire du Dr Thorin, nous sommes maintenant en possession depuis quelques mois d'un modèle de souris transgénique «*Knock-down*» pour l'Angptl2, validé et prêt à être utilisé. Des résultats encourageants montrent que nos souris Angptl2<sup>-/-</sup> ne développent pas de dyslipidémie après une exposition à une

diète riche en gras et sont donc «protégées». Ces données sont tout à fait en accord avec l'augmentation de cholestérol circulant observée chez les souris ATX perfusées avec de l'Angptl2 (étude 5).

Sur une toute autre note, nous avons démontré (étude 5) que l'ajout exogène d'Angptl2 sur l'aorte de souris ATX ( $LDLr^{-/-}$ ;  $hApoB_{100}^{+/+}$ ) augmente l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium vasculaire et que l'Angptl2 augmente la synthèse de molécules d'adhésion à la surface des CE et de leucocytes. Nous sommes conscients de l'existence de différents types cellulaires dans les splénocytes, notamment des monocytes inflammatoires (et des macrophages), des cellules effectrices T, des cellules T régulatrices, des cellules B, des neutrophiles, et des cellules dendritiques (Parney, 2012). Afin de préciser la nature des cellules ciblées par les effets de l'Angptl2, il aurait été intéressant d'extraire les différentes classes de cellules et de tester l'adhésion de façon spécifique à chaque cellule. Cependant, il est difficile, voire impossible, dans ce type d'étude de séparer les cellules à partir de la rate du même animal et d'avoir suffisamment de cellules pour réaliser l'expérience d'adhésion. Nous avons donc considéré l'usage de l'ensemble de ces cellules comme une solution alternative. Il faut cependant rester prudent dans l'interprétation des résultats.

## **Conclusions et perspectives**

## 5. Conclusions et perspectives

Nos objectifs étaient de caractériser les propriétés vasculaires de l'Angptl2 et de déterminer sa contribution potentielle dans le processus d'athérosclérose. Nous avons identifié l'Angptl2 par *Differential Display*, nous avons déterminé ses propriétés pro-inflammatoires, pro-oxydantes, pro-angiogéniques, chimio-attractantes *in vitro* et nous avons étudié ses effets pro-athérogéniques *in vivo* chez la souris. Ces effets sont également présents chez l'Homme puisque le taux circulant d'Angptl2 est anormalement élevé chez les patients coronariens (Tabata *et al.*, 2009). L'ensemble de nos travaux permet d'établir que l'Angptl2 est induite par des facteurs de risque cardiovasculaire tels que le tabagisme et la dyslipidémie et un environnement pro-oxydant présent dans les CE de patients atteints des maladies coronariennes : l'expression de l'Angptl2 est directement liée à l'environnement oxydant cellulaire. Ces travaux sont également les premiers à révéler une fonction pro-oxydante de l'Angptl2 et à élucider les mécanismes moléculaires sous-jacents à cette réponse. Nous avons défini que l'Angptl2 favorise non seulement un état pro-oxydant à l'intérieur des CE (favorise la synthèse des composés radicalaires), mais réprime également l'activité du facteur de transcription Nrf2, ce qui diminue l'expression de l'enzyme cytoprotectrice HO-1. L'Angptl2 freine les mécanismes de défense antioxydante et instaure un statut oxydant délétère. De plus, nos travaux (étude 5) complètent les observations du Dr Oike et de ses collaborateurs sur l'effet stimulant de l'Angptl2 sur l'adhésion des leucocytes et l'augmentation de son niveau circulant chez les patients coronariens (Tabata *et al.*, 2009). Nous avons donc identifié l'Angptl2 comme un contributeur potentiel de l'athérosclérose. Nous avons démontré que l'induction de son expression au cours du développement de la maladie constitue un signal important dans les processus cellulaires tels que l'inflammation, le recrutement des leucocytes dans les parois vasculaires et l'expansion de la plaque. Ces processus cellulaires sont essentiels et contribuent efficacement à la pathogenèse de l'athérosclérose. Ainsi, l'Angptl2 pourrait potentiellement être un biomarqueur et une cible thérapeutique de premier choix dans les maladies à caractère oxydant ou inflammatoire en général, et dans l'athérosclérose en particulier.



Nos travaux sur l'Angptl2 ouvrent des portes pour poursuivre ce projet fascinant : si les résultats obtenus dans cette thèse constituent une avancée dans la compréhension de l'impact pathologique de l'Angptl2 lors de la progression de l'athérosclérose, des questions demeurent sans réponse, la plus importante selon moi étant de clarifier les mécanismes moléculaires derrière les effets fonctionnels de l'Angptl2. Les effets observés de l'Angptl2 chez la souris sont-ils directs ? Sont-ils dus à l'existence d'un médiateur endogène qui régule la fonction mais aussi la taille de l'Angptl2 comme c'est le cas de certaines Angptls?

L'Angptl4, par exemple, se trouve en effet dans la circulation assemblée en oligomères (Ge *et al.*, 2004a), mais aussi sous des formes tronquées solubles comme la forme contenant exclusivement le domaine N terminal *coiled-coil* et la forme contenant le domaine carboxyterminal *fibrinogen-like* (Ge *et al.*, 2004a; Mandard *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2009). Les études réalisées *in vitro* ont confirmé que chaque domaine de l'Angptl4 exerce un rôle particulier, celui du domaine *coiled-coil* est plus métabolique (*via* l'inhibition de l'activité LPL) (Ge *et al.*, 2005; Sukonina *et al.*, 2006), alors que le domaine *fibrinogen-like* semble avoir une fonction anti-angiogénique (Yang *et al.*, 2008). De plus, *in vitro*, le domaine soluble *coiled-coil* de l'Angptl4 pourrait exercer un rôle modulateur sur l'activité de la forme entière de la protéine, les deux formes interagissent ensemble *via* des ponts disulfures formant ainsi un hétérodimère qui ne possède aucune activité métabolique (Ge *et al.*, 2004b). De façon fort intéressante, nous avons accumulé des résultats préliminaires chez la souris qui suggèrent la présence d'une forme courte de l'Angptl2 contenant exclusivement le domaine N terminal *coiled-coil* avec un patron d'expression très semblable à celui de la forme entière. Il s'agit d'un variant génétique qui partage l'exon 1 et 2 (exon contenant le site d'initiation de la transcription) de la forme entière mais qui contient un bout terminal de l'intron sous jacent donnant ainsi naissance à une protéine de 37 kDa. La petite forme de l'Angptl2 semble exercer une fonction opposée à celle de la grande forme : le niveau d'ARNm du variant génétique diminue avec l'âge et la progression de l'athérosclérose chez la souris (données non-publiées, validées dans l'aorte et le cœur). En perspective, il est évident que nous allons poursuivre cette étude dans le but de tester si la petite forme de l'Angptl2 est un antagoniste et/ou un inhibiteur endogène qui pourrait former un

hétérodimère avec la grande forme, neutralisant ainsi sa fonction pathologique. Ces résultats sont très prometteurs puisqu'ils suggèrent une régulation endogène de l'Angptl2.

À l'avenir, nous voudrions donc caractériser le rôle physiologique joué par ce variant de l'Angptl2 et surtout comprendre son implication lors du développement de l'athérosclérose : surexprimer cette petite forme de l'Angptl2 dans notre modèle de souris ATX (LDLr<sup>-/-</sup>; hApoB<sub>100</sub><sup>+/+</sup>) et examiner son impact sur la progression de la maladie s'avèrerait un outil de choix pour valider son effet antagoniste. Il serait aussi intéressant d'étudier les mécanismes de régulation de la petite forme de l'Angptl2, notre antagoniste endogène potentiel, chez l'humain.

Nous possédons également des résultats préliminaires qui démontrent que chez des patients coronariens non actifs physiquement, l'exercice diminue significativement le niveau circulant d'Angptl2, 24 et 72 heures après l'exercice. De même, le niveau plasmatique d'Angptl2 diminue efficacement 2 heures après un repas riche en carbohydrates, suggérant que l'Angptl2 est sensible à l'environnement métabolique postprandial. Il reste énormément de travail à faire mais tester le rôle métabolique de l'Angptl2 sur des cohortes humaines fait partie de nos priorités. Nous voulons étudier le taux circulant d'Angptl2 chez des patients obèses soumis ou pas à un régime amaigrissant et à l'exercice et chez des patients coronariens avant et après un programme d'exercice physique. Nos résultats préliminaires montrent que trois mois d'entraînement physique diminuent significativement le taux circulant d'Angptl2 anormalement élevé chez des patients coronariens. Si le taux d'Angptl2 régresse parallèlement à l'obésité et à la stabilisation de la pathologie cardiovasculaire, ces résultats permettraient de valider définitivement le rôle biomarqueur de l'Angptl2.

À la lumière des résultats obtenus dans notre l'étude 5 (article), le niveau d'Angptl2 augmente avec l'âge dans le plasma de la souris. Cette observation est également vraie chez l'humain (étude 5 et (Tabata *et al.*, 2009)). Selon l'équipe du Dr Oike, l'Angptl2 circulante est à un niveau très bas chez les centenaires (communication personnelle, données non-publiées) et nos données montrent que l'Angptl2 est plus élevée chez les

coronariens : cela signifie-t-il que l'Angptl2 est un marqueur de l'âge biologique de nos cellules somatiques?

Nos données préliminaires chez la souris sur la relation existante entre les deux formes de l'Angptl2 pourraient définir chez l'Homme les motifs potentiellement impliqués dans le fonctionnement de la protéine, ce qui constituerait des pistes idéales pour dessiner un peptide neutralisant l'Angptl2. Ce peptide pourrait être la petite forme de l'Angptl2 elle-même. Puisque l'Angptl2 joue un rôle délétère dans les maladies chroniques inflammatoires, le développement d'un tel peptide thérapeutique serait majeur.

# Références

## 6. Références

- Abd TT, Eapen DJ, Bajpai A, Goyal A, Dollar A, Sperling L (2011). The role of C-reactive protein as a risk predictor of coronary atherosclerosis: implications from the JUPITER trial. *Current atherosclerosis reports* **13**(2): 154-161.
- Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, Nishikawa T, Ogawa R, Matsumura T, *et al.* (2009). Angptl 4 deficiency improves lipid metabolism, suppresses foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Biochemical and biophysical research communications* **379**(4): 806-811.
- Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A (2011). Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **31**(5): 969-979.
- Alamanda V, Singh S, Lawrence NJ, Chellappan SP (2012). Nicotine-mediated induction of E-selectin in aortic endothelial cells requires Src kinase and E2F1 transcriptional activity. *Biochemical and biophysical research communications* **418**(1): 56-61.
- Albrecht H, Schook LB, Jongeneel CV (1995). Nuclear migration of NF-kappa B correlates with TNF-alpha mRNA accumulation. *Journal of inflammation* **45**(1): 64-71.
- Ambrose J, Barua R (2004 ). The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *J Am Coll Cardiol.* **43**(10): 1731-1737.
- Ambrose JA, Barua RS (2004). The pathophysiology of cigarette smoking and cardiovascular disease: an update. *Journal of the American College of Cardiology* **43**(10): 1731-1737.
- Ando Y, Shimizugawa T, Takeshita S, Ono M, Shimamura M, Koishi R, *et al.* (2003). A decreased expression of angiotensin-like 3 is protective against atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Journal of lipid research* **44**(6): 1216-1223.
- Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Nakano M, Horiguchi H, *et al.* (2011). Angiotensin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis. *Cancer research* **71**(24): 7502-7512.
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology* **55**: 373-399.
- Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C (1998). Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annual review of immunology* **16**: 27-55.

- Armulik A (2002). Splice variants of human beta 1 integrins: origin, biosynthesis and functions. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **7**: d219-227.
- Asami S, Manabe H, Miyake J, Tsurudome Y, Hirano T, Yamaguchi R, *et al.* (1997). Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis* **18**(9): 1763-1766.
- Asano K, Okamoto S, Fukunaga K, Shiomi T, Mori T, Iwata M, *et al.* (1999). Cellular source(s) of platelet-activating-factor acetylhydrolase activity in plasma. *Biochemical and biophysical research communications* **261**(2): 511-514.
- Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G, *et al.* (2004). Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* **109**(7): 837-842.
- Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* **87**(8): 3336-3343.
- Barreiro O, Sanchez-Madrid F (2009). Molecular basis of leukocyte-endothelium interactions during the inflammatory response. *Revista espanola de cardiologia* **62**(5): 552-562.
- Barua R, Ambrose J, Eales-Reynolds L, DeVoe M, Zerva J, DC. S (2002). Heavy and light cigarette smokers have similar dysfunction of endothelial vasoregulatory activity: an in vivo and in vitro correlation. *J Am Coll Cardiol.* **39**(11): 1758-1763.
- Barua R, Ambrose J, Srivastava S, De Voe M, LJ. E-R, (2003). Reactive oxygen species are involved in smoking-induced dysfunction of nitric oxide biosynthesis and upregulation of endothelial nitric oxide synthase: an in vitro demonstration in human coronary artery endothelial cells. *Circulation* **107**(18): 2342-2347.
- Ben-Porath I, Weinberg R (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* **37**(5): 961-976.
- Ben-Porath I, Weinberg R (2004a). When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *J Clin Invest.* **113**(1): 8-13.
- Ben-Porath I, Weinberg RA (2004b). When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence. *The Journal of clinical investigation* **113**(1): 8-13.
- Benditt EP (1988). Origins of human atherosclerotic plaques. The role of altered gene expression. *Arch Pathol Lab Med* **112**(10): 997-1001.

- Benn M, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A (2007). Improving prediction of ischemic cardiovascular disease in the general population using apolipoprotein B: the Copenhagen City Heart Study. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**(3): 661-670.
- Bennett MR (1999). Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovascular research* **41**(2): 361-368.
- Bernatchez PN, Tremblay F, Rollin S, Neagoe PE, Sirois MG (2003). Sphingosine 1-phosphate effect on endothelial cell PAF synthesis: role in cellular migration. *Journal of cellular biochemistry* **90**(4): 719-731.
- Bitar MS, Liu C, Ziaei A, Chen Y, Schmedt T, Jurkunas UV (2012). Decline in DJ-1 and decreased nuclear translocation of Nrf2 in Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Investigative ophthalmology & visual science* **53**(9): 5806-5813.
- Bjornheden T, Levin M, Evaldsson M, Wiklund O (1999). Evidence of hypoxic areas within the arterial wall in vivo. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **19**(4): 870-876.
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L (2003). Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **170**(2): 191-203.
- Blann A, McCollum C (1993). Adverse influence of cigarette smoking on the endothelium. *Thromb Haemost* **70**(4): 707-711.
- Blann AD, Nadar SK, Lip GY (2003). The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. *European heart journal* **24**(24): 2166-2179.
- Bochkov VN, Philippova M, Oskolkova O, Kadl A, Furnkranz A, Karabeg E, *et al.* (2006). Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via autocrine mechanisms, implicating a novel role for lipid oxidation in the evolution of atherosclerotic lesions. *Circulation research* **99**(8): 900-908.
- Bolduc V, Drouin A, Gillis MA, Duquette N, Thorin-Trescases N, Frayne-Robillard I, *et al.* (2011). Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **301**(5): H2081-2092.
- Bonnefoy A, Daenens K, Feys HB, De Vos R, Vandervoort P, Vermynen J, *et al.* (2006). Thrombospondin-1 controls vascular platelet recruitment and thrombus adherence in mice by protecting (sub)endothelial VWF from cleavage by ADAMTS13. *Blood* **107**(3): 955-964.

- Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998). Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **394**(6696): 894-897.
- Bornfeldt KE, Tabas I (2011). Insulin resistance, hyperglycemia, and atherosclerosis. *Cell metabolism* **14**(5): 575-585.
- Boullier A, Bird DA, Chang MK, Dennis EA, Friedman P, Gillotre-Taylor K, *et al.* (2001). Scavenger receptors, oxidized LDL, and atherosclerosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **947**: 214-222; discussion 222-213.
- Boutten A, Goven D, Boczkowski J, Bonay M (2010). Oxidative stress targets in pulmonary emphysema: focus on the Nrf2 pathway. *Expert opinion on therapeutic targets* **14**(3): 329-346.
- Brevetti G, Schiano V, Chiariello M (2008). Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? *Atherosclerosis* **197**(1): 1-11.
- Brogi E, Winkles JA, Underwood R, Clinton SK, Alberts GF, Libby P (1993). Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages. *The Journal of clinical investigation* **92**(5): 2408-2418.
- Broxmeyer HE, Srour EF, Cooper S, Wallace CT, Hangoc G, Youn BS (2012). Angiopoietin-like-2 and -3 act through their coiled-coil domains to enhance survival and replating capacity of human cord blood hematopoietic progenitors. *Blood cells, molecules & diseases* **48**(1): 25-29.
- Bulelzai MA, Dubbeldam JL (2012). Long time evolution of atherosclerotic plaques. *Journal of theoretical biology* **297**: 1-10.
- Bullard DC, Kunkel EJ, Kubo H, Hicks MJ, Lorenzo I, Doyle NA, *et al.* (1996). Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice. *The Journal of experimental medicine* **183**(5): 2329-2336.
- Byzova TV, Goldman CK, Pampori N, Thomas KA, Bett A, Shattil SJ, *et al.* (2000). A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Molecular cell* **6**(4): 851-860.
- Cai W, Schaper W (2008). Mechanisms of arteriogenesis. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **40**(8): 681-692.



- Calabro P, Willerson JT, Yeh ET (2003). Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* **108**(16): 1930-1932.
- Camenisch G, Pisabarro MT, Sherman D, Kowalski J, Nagel M, Hass P, *et al.* (2002). ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin alpha vbeta 3 and induces blood vessel formation in vivo. *The Journal of biological chemistry* **277**(19): 17281-17290.
- Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC (1998). Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science* **279**(5349): 381-384.
- Campisi J, Sedivy J (2009). How does proliferative homeostasis change with age? What causes it and how does it contribute to aging? *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **64**(2): 164-166.
- Carmeliet P (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature medicine* **6**(4): 389-395.
- Castelli WP (1988). Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study. *The Canadian journal of cardiology* **4 Suppl A**: 5A-10A.
- Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD (2001). Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nature medicine* **7**(4): 425-429.
- Chang SH, Barbosa-Tessmann I, Chen C, Kilberg MS, Agarwal A (2002). Glucose deprivation induces heme oxygenase-1 gene expression by a pathway independent of the unfolded protein response. *The Journal of biological chemistry* **277**(3): 1933-1940.
- Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH (2007). Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *Journal of the American College of Cardiology* **49**(25): 2379-2393.
- Chen CH, Walterscheid JP (2006a). Plaque angiogenesis versus compensatory arteriogenesis in atherosclerosis. *Circulation research* **99**(8): 787-789.
- Chen H, Wu C, Hong C, Chang C (2004a). Urinary excretion of 3,N4-etheno-2'-deoxycytidine in humans as a biomarker of oxidative stress: association with cigarette smoking. *Chem Res Toxicol* **17**(7): 896-903.

- Chen HW, Chien ML, Chaung YH, Lii CK, Wang TS (2004b). Extracts from cigarette smoke induce DNA damage and cell adhesion molecule expression through different pathways. *Chem Biol Interact* **150**(3): 233-241.
- Chen QW, Edvinsson L, Xu CB (2010). Cigarette smoke extract promotes human vascular smooth muscle cell proliferation and survival through ERK1/2- and NF-kappaB-dependent pathways. *ScientificWorldJournal* **10**: 2139-2156.
- Chen XL, Dodd G, Thomas S, Zhang X, Wasserman MA, Rovin BH, *et al.* (2006b). Activation of Nrf2/ARE pathway protects endothelial cells from oxidant injury and inhibits inflammatory gene expression. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **290**(5): H1862-1870.
- Chen XL, Varner SE, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, *et al.* (2003). Laminar flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. A novel anti-inflammatory mechanism. *The Journal of biological chemistry* **278**(2): 703-711.
- Chien S (2007). Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **292**(3): H1209-1224.
- Cho KA, Park SC (2005). Caveolin-1 as a prime modulator of aging: a new modality for phenotypic restoration? *Mech Ageing Dev* **126**(1): 105-110.
- Chomel C, Cazes A, Faye C, Bignon M, Gomez E, Ardidie-Robouant C, *et al.* (2009). Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **23**(3): 940-949.
- Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, *et al.* (1990). Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *The Journal of experimental medicine* **172**(6): 1535-1545.
- Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P (1992). Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *The American journal of pathology* **140**(2): 301-316.
- Cnop M, Foufelle F, Velloso LA (2012). Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends in molecular medicine* **18**(1): 59-68.

- Cohen JR, Sarfati I, Danna D, Wise L (1992). Smooth muscle cell elastase, atherosclerosis, and abdominal aortic aneurysms. *Annals of surgery* **216**(3): 327-330; discussion 330-322.
- Colonna M, Nakajima H, Cella M (1999). Inhibitory and activating receptors involved in immune surveillance by human NK and myeloid cells. *Journal of leukocyte biology* **66**(5): 718-722.
- Conklin BS, Zhao W, Zhong DS, Chen C (2002). Nicotine and cotinine up-regulate vascular endothelial growth factor expression in endothelial cells. *Am J Pathol* **160**(2): 413-418.
- Conklin D, Gilbertson D, Taft DW, Maurer MF, Whitmore TE, Smith DL, *et al.* (1999). Identification of a mammalian angiopoietin-related protein expressed specifically in liver. *Genomics* **62**(3): 477-482.
- Cooney MT, Dudina A, De Bacquer D, Wilhelmsen L, Sans S, Menotti A, *et al.* (2009). HDL cholesterol protects against cardiovascular disease in both genders, at all ages and at all levels of risk. *Atherosclerosis* **206**(2): 611-616.
- Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, *et al.* (1990). Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *The Journal of clinical investigation* **86**(1): 228-234.
- Criqui MH, Cowan LD, Tyroler HA, Bangdiwala S, Heiss G, Wallace RB, *et al.* (1987). Lipoproteins as mediators for the effects of alcohol consumption and cigarette smoking on cardiovascular mortality: results from the Lipid Research Clinics Follow-up Study. *Am J Epidemiol* **126**(4): 629-637.
- Cunningham KS, Gotlieb AI (2005). The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **85**(1): 9-23.
- Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. (1991). Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **251**(4995): 788-791.
- Dandapat A, Hu C, Sun L, Mehta JL (2007). Small concentrations of oxLDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**(11): 2435-2442.
- Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, *et al.* (2004). C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *The New England journal of medicine* **350**(14): 1387-1397.

- Davies MJ (1997). The composition of coronary-artery plaques. *The New England journal of medicine* **336**(18): 1312-1314.
- Davis JM, 3rd, Matteson EL (2012). My treatment approach to rheumatoid arthritis. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic* **87**(7): 659-673.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ (2007). Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. *Circulation* **115**(10): 1285-1295.
- Desai U, Lee EC, Chung K, Gao C, Gay J, Key B, *et al.* (2007). Lipid-lowering effects of anti-angiopoietin-like 4 antibody recapitulate the lipid phenotype found in angiopoietin-like 4 knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(28): 11766-11771.
- Devaraj S, Kumaresan PR, Jialal I (2004). Effect of C-reactive protein on chemokine expression in human aortic endothelial cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* **36**(3): 405-410.
- Devaraj S, Xu DY, Jialal I (2003). C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. *Circulation* **107**(3): 398-404.
- Dhanabal M, LaRoche WJ, Jeffers M, Herrmann J, Rastelli L, McDonald WF, *et al.* (2002). Angioarrestin: an antiangiogenic protein with tumor-inhibiting properties. *Cancer research* **62**(13): 3834-3841.
- Dichek DA, Anderson J, Kelly AB, Hanson SR, Harker LA (1996). Enhanced in vivo antithrombotic effects of endothelial cells expressing recombinant plasminogen activators transduced with retroviral vectors. *Circulation* **93**(2): 301-309.
- Dietrich M, Block G, Hudes M, Morrow J, Norku E, Traber M, *et al.* (2002). Antioxidant supplementation decreases lipid peroxidation biomarker F(2)-isoprostanes in plasma of smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(1): 7-13.
- Dimri G, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(20): 9363-9367.
- Dinarello CA (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**(6): 2095-2147.
- Dinarello CA (2006). Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *The American journal of clinical nutrition* **83**(2): 447S-455S.

- Doi Y, Ninomiya T, Hirakawa Y, Takahashi O, Mukai N, Hata J, *et al.* (2012). Angiopoietin-Like Protein 2 and Risk of Type 2 Diabetes in a General Japanese Population: The Hisayama Study. *Diabetes Care*.
- Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I (2005). Mortality from cancer in relation to smoking: 50 years observations on British doctors. *Br J Cancer* **92**(3): 426-429.
- Doyle B, Caplice N (2007). Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* **49**(21): 2073-2080.
- Drouin A, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Belanger E, Fernandes P, Baraghis E, *et al.* (2011a). Catechin treatment improves cerebrovascular flow-mediated dilation and learning abilities in atherosclerotic mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **300**(3): H1032-1043.
- Drouin A, Farhat N, Bolduc V, Thorin-Trescases N, Gillis MA, Villeneuve L, *et al.* (2011b). Up-regulation of thromboxane A(2) impairs cerebrovascular eNOS function in aging atherosclerotic mice. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **462**(3): 371-383.
- Dunmore BJ, McCarthy MJ, Naylor AR, Brindle NP (2007). Carotid plaque instability and ischemic symptoms are linked to immaturity of microvessels within plaques. *Journal of vascular surgery : official publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* **45**(1): 155-159.
- Eberhardt RT, Coffman JD (2004). Cardiovascular morbidity and mortality in peripheral arterial disease. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* **4**(3): 209-217.
- Ebert T, Bachmann A, Lossner U, Kratzsch J, Bluher M, Stumvoll M, *et al.* (2009). Serum levels of angiopoietin-related growth factor in diabetes mellitus and chronic hemodialysis. *Metabolism: clinical and experimental* **58**(4): 547-551.
- Ebnet K, Vestweber D (1999). Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochemistry and cell biology* **112**(1): 1-23.
- Edelman ER, Nugent MA, Smith LT, Karnovsky MJ (1992). Basic fibroblast growth factor enhances the coupling of intimal hyperplasia and proliferation of vasa vasorum in injured rat arteries. *The Journal of clinical investigation* **89**(2): 465-473.

- Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson GK, Yan ZQ (2002). Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation. *Circulation* **105**(10): 1158-1161.
- Eliasziw M, Streifler JY, Fox AJ, Hachinski VC, Ferguson GG, Barnett HJ (1994). Significance of plaque ulceration in symptomatic patients with high-grade carotid stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial. *Stroke* **25**(2): 304-308.
- Endo M, Nakano M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Kuroda H, Mikami S, *et al.* (2012). Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis. *Cancer research* **72**(7): 1784-1794.
- Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L (2001). Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *The Journal of experimental medicine* **194**(2): 205-218.
- Ezzati M, Lopez AD (2004). Regional, disease specific patterns of smoking-attributable mortality in 2000. *Tob Control* **13**(4): 388-395.
- Fain JN (2006). Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitamins and hormones* **74**: 443-477.
- Fantuzzi G (2005). Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* **115**(5): 911-919; quiz 920.
- Farhat N, Thorin-Trescases N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Yu C, Martel C, *et al.* (2013). Angiopoietin-like 2 promotes atherogenesis in mice. *JAHA*: in press.
- Farhat N, Thorin-Trescases N, Voghel G, Villeneuve L, Mamarbachi M, Perrault LP, *et al.* (2008). Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **86**(11): 761-769.
- Feldman DL, Hoff HF, Gerrity RG (1984). Immunohistochemical localization of apoprotein B in aortas from hyperlipemic swine. Preferential accumulation in lesion-prone areas. *Arch Pathol Lab Med* **108**(10): 817-822.
- Fernandez-Borja M, van Buul JD, Hordijk PL (2010). The regulation of leucocyte transendothelial migration by endothelial signalling events. *Cardiovascular research* **86**(2): 202-210.

- Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, *et al.* (2006). Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nature medicine* **12**(2): 235-239.
- Fisher M, Paganini-Hill A, Martin A, Cosgrove M, Toole JF, Barnett HJ, *et al.* (2005). Carotid plaque pathology: thrombosis, ulceration, and stroke pathogenesis. *Stroke* **36**(2): 253-257.
- Flammer AJ, Luscher TF (2010). Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **459**(6): 1005-1013.
- Florey (1966). The endothelial cell. *Br Med J* **2**(5512): 487-490.
- Fogelstrand P, Boren J (2012). Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **22**(1): 1-7.
- Folkman J (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* **285**(21): 1182-1186.
- Folsom AR, Peacock JM, Demerath E, Boerwinkle E (2008). Variation in ANGPTL4 and risk of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Metabolism: clinical and experimental* **57**(11): 1591-1596.
- Foster JG, Blunt MD, Carter E, Ward SG (2012). Inhibition of PI3K signaling spurs new therapeutic opportunities in inflammatory/autoimmune diseases and hematological malignancies. *Pharmacological reviews* **64**(4): 1027-1054.
- Frangogiannis NG, Ren G, Dewald O, Zymek P, Haudek S, Koerting A, *et al.* (2005). Critical role of endogenous thrombospondin-1 in preventing expansion of healing myocardial infarcts. *Circulation* **111**(22): 2935-2942.
- Frenette PS, Mayadas TN, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD (1996). Susceptibility to infection and altered hematopoiesis in mice deficient in both P- and E-selectins. *Cell* **84**(4): 563-574.
- Fujimoto K, Koishi R, Shimizugawa T, Ando Y (2006). Angptl3-null mice show low plasma lipid concentrations by enhanced lipoprotein lipase activity. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* **55**(1): 27-34.
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**(5789): 373-376.
- Galbiati F, Volonté D, Liu J, Capozza F, Frank P, Zhu L, *et al.* (2001). Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* **12**(8): 2229-2244.

- Gao L, Mann GE (2009). Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovascular research* **82**(1): 9-20.
- Gareus R, Kotsaki E, Xanthoulea S, van der Made I, Gijbels MJ, Kardakaris R, *et al.* (2008). Endothelial cell-specific NF-kappaB inhibition protects mice from atherosclerosis. *Cell metabolism* **8**(5): 372-383.
- Garton KJ, Gough PJ, Raines EW (2006). Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *Journal of leukocyte biology* **79**(6): 1105-1116.
- Ge H, Cha JY, Gopal H, Harp C, Yu X, Repa JJ, *et al.* (2005). Differential regulation and properties of angiopoietin-like proteins 3 and 4. *Journal of lipid research* **46**(7): 1484-1490.
- Ge H, Yang G, Huang L, Motola DL, Pourbahrami T, Li C (2004a). Oligomerization and regulated proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4. *The Journal of biological chemistry* **279**(3): 2038-2045.
- Ge H, Yang G, Yu X, Pourbahrami T, Li C (2004b). Oligomerization state-dependent hyperlipidemic effect of angiopoietin-like protein 4. *Journal of lipid research* **45**(11): 2071-2079.
- Gealekman O, Burkart A, Chouinard M, Nicoloso SM, Straubhaar J, Corvera S (2008). Enhanced angiogenesis in obesity and in response to PPARgamma activators through adipocyte VEGF and ANGPTL4 production. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **295**(5): E1056-1064.
- Gendron ME, Theoret JF, Mamarbachi AM, Drouin A, Nguyen A, Bolduc V, *et al.* (2010). Late chronic catechin antioxidant treatment is deleterious to the endothelial function in aging mice with established atherosclerosis. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **298**(6): H2062-2070.
- Geng YJ, Libby P (1995). Evidence for apoptosis in advanced human atheroma. Colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *The American journal of pathology* **147**(2): 251-266.
- Gilligan DM, Sack MN, Guetta V, Casino PR, Quyyumi AA, Rader DJ, *et al.* (1994). Effect of antioxidant vitamins on low density lipoprotein oxidation and impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with hypercholesterolemia. *Journal of the American College of Cardiology* **24**(7): 1611-1617.
- Gilstrap LG, Wang TJ (2012). Biomarkers and cardiovascular risk assessment for primary prevention: an update. *Clinical chemistry* **58**(1): 72-82.
- Glass CK, Witztum JL (2001). Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**(4): 503-516.



- Glukhova MA, Kabakov AE, Frid MG, Ornatsky OI, Belkin AM, Mukhin DN, *et al.* (1988). Modulation of human aorta smooth muscle cell phenotype: a study of muscle-specific variants of vinculin, caldesmon, and actin expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(24): 9542-9546.
- Gonzalez-Muniesa P, de Oliveira C, Perez de Heredia F, Thompson MP, Trayhurn P (2011). Fatty acids and hypoxia stimulate the expression and secretion of the adipokine ANGPTL4 (angiopoietin-like protein 4/ fasting-induced adipose factor) by human adipocytes. *Journal of nutrigenetics and nutrigenomics* **4**(3): 146-153.
- Gora S, Maouche S, Atout R, Wanherdrick K, Lambeau G, Cambien F, *et al.* (2010). Phospholipolyzed LDL induces an inflammatory response in endothelial cells through endoplasmic reticulum stress signaling. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**(9): 3284-3297.
- Gorelick PB (2008). Lipoprotein-associated phospholipase A2 and risk of stroke. *The American journal of cardiology* **101**(12A): 34F-40F.
- Goudar RK, Vlahovic G (2008). Hypoxia, angiogenesis, and lung cancer. *Current oncology reports* **10**(4): 277-282.
- Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB (2003). Interleukin-18. *Journal of leukocyte biology* **73**(2): 213-224.
- Gratchev A, Sobenin I, Orekhov A, Kzhyshkowska J (2012). Monocytes as a diagnostic marker of cardiovascular diseases. *Immunobiology* **217**(5): 476-482.
- Grover-Paez F, Zavalza-Gomez AB (2009). Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes research and clinical practice* **84**(1): 1-10.
- Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, *et al.* (1998). Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular cell* **2**(2): 275-281.
- Hackman A, Abe Y, Insull W, Jr., Pownall H, Smith L, Dunn K, *et al.* (1996). Levels of soluble cell adhesion molecules in patients with dyslipidemia. *Circulation* **93**(7): 1334-1338.
- Hansen LK, Grimm RH, Jr., Neaton JD (1990). The relationship of white blood cell count to other cardiovascular risk factors. *Int J Epidemiol* **19**(4): 881-888.
- Hansson GK, Hermansson A (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology* **12**(3): 204-212.

- Hansson GK, Schwartz SM (1983). Evidence for cell death in the vascular endothelium in vivo and in vitro. *The American journal of pathology* **112**(3): 278-286.
- Harman D (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* **11**(3): 298-300.
- Hato T, Tabata M, Oike Y (2008). The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med* **18**(1): 6-14.
- Hatsuda S, Shoji T, Shinohara K, Kimoto E, Mori K, Fukumoto S, *et al.* (2007). Association between plasma angiopoietin-like protein 3 and arterial wall thickness in healthy subjects. *Journal of vascular research* **44**(1): 61-66.
- Hattori Y, Matsumura M, Kasai K (2003). Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. *Cardiovascular research* **58**(1): 186-195.
- Hayflick L (2000). The future of ageing. *Nature* **408**(6809): 267-269.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* **25**: 585-621.
- Heistad DD, Armstrong ML, Marcus ML (1981). Hyperemia of the aortic wall in atherosclerotic monkeys. *Circulation research* **48**(5): 669-675.
- Heitzer T, Just H, Münzel T (1996). Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* **94**(1): 6-9.
- Herbig U, Jobling W, Chen B, Chen D, Sedivy J (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell Biol* **14**(4): 501-513.
- Hermann LM, Pinkerton M, Jennings K, Yang L, Grom A, Sowders D, *et al.* (2005). Angiopoietin-like-4 is a potential angiogenic mediator in arthritis. *Clin Immunol* **115**(1): 93-101.
- Herrmann J, Lerman LO, Mukhopadhyay D, Napoli C, Lerman A (2006). Angiogenesis in atherogenesis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**(9): 1948-1957.
- Herrmann J, Lerman LO, Rodriguez-Porcel M, Holmes DR, Jr., Richardson DM, Ritman EL, *et al.* (2001). Coronary vasa vasorum neovascularization precedes epicardial endothelial dysfunction in experimental hypercholesterolemia. *Cardiovascular research* **51**(4): 762-766.
- Hickey MM, Simon MC (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. *Current topics in developmental biology* **76**: 217-257.

- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **73**(3): 411-418.
- Hirschfield GM, Pepys MB (2003). C-reactive protein and cardiovascular disease: new insights from an old molecule. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians* **96**(11): 793-807.
- Holm PW, Slart RH, Zeebregts CJ, Hillebrands JL, Tio RA (2009). Atherosclerotic plaque development and instability: a dual role for VEGF. *Annals of medicine* **41**(4): 257-264.
- Horio E, Kaikita K, Tabata M, Zhe T, Tazume H, Miyata K, *et al.* (2010). Angiopoietin-like protein2 (angptl2) promotes coronary endothelial dysfunction and atherosclerosis *Circulation* **122**: A11343.
- Huo Y, Ley K (2001). Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand* **173**(1): 35-43.
- Iizuka T, Ishii Y, Itoh K, Kiwamoto T, Kimura T, Matsuno Y, *et al.* (2005). Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **10**(12): 1113-1125.
- Immenschuh S, Schroder H (2006). Heme oxygenase-1 and cardiovascular disease. *Histology and histopathology* **21**(6): 679-685.
- Inaba T, Matsuda M, Shimamura M, Takei N, Terasaka N, Ando Y, *et al.* (2003). Angiopoietin-like protein 3 mediates hypertriglyceridemia induced by the liver X receptor. *The Journal of biological chemistry* **278**(24): 21344-21351.
- Inukai K, Nakashima Y, Watanabe M, Kurihara S, Awata T, Katagiri H, *et al.* (2004). ANGPTL3 is increased in both insulin-deficient and -resistant diabetic states. *Biochemical and biophysical research communications* **317**(4): 1075-1079.
- Ito Y, Oike Y, Yasunaga K, Hamada K, Miyata K, Matsumoto S, *et al.* (2003). Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiopoietin-related protein 4. *Cancer research* **63**(20): 6651-6657.
- Jackson SP (2011). Arterial thrombosis--insidious, unpredictable and deadly. *Nature medicine* **17**(11): 1423-1436.
- Jain AK, Jaiswal AK (2006). Phosphorylation of tyrosine 568 controls nuclear export of Nrf2. *The Journal of biological chemistry* **281**(17): 12132-12142.
- Jaiswal AK (2004). Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free radical biology & medicine* **36**(10): 1199-1207.

- Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC (1999). Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research* **43**(3): 580-594.
- Jeyapalan JC, Sedivy JM (2008). Cellular senescence and organismal aging. *Mechanisms of ageing and development* **129**(7-8): 467-474.
- Jeziorska M, Woolley DE (1999). Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *The Journal of pathology* **188**(2): 189-196.
- Kadomatsu T, Tabata M, Oike Y (2011). Angiopoietin-like proteins: emerging targets for treatment of obesity and related metabolic diseases. *The FEBS journal* **278**(4): 559-564.
- Kahlon R, Shapero J, Gotlieb AI (1992). Angiogenesis in atherosclerosis. *The Canadian journal of cardiology* **8**(1): 60-64.
- Kampoli AM, Tousoulis D, Antoniadou C, Siasos G, Stefanadis C (2009). Biomarkers of premature atherosclerosis. *Trends in molecular medicine* **15**(7): 323-332.
- Kanda A, Noda K, Oike Y, Ishida S (2012). Angiopoietin-like protein 2 mediates endotoxin-induced acute inflammation in the eye. *Lab Invest* **92**(11): 1553-1563.
- Karabina SA, Brocheriou I, Le Naour G, Agrapart M, Durand H, Gelb M, *et al.* (2006). Atherogenic properties of LDL particles modified by human group X secreted phospholipase A2 on human endothelial cell function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**(14): 2547-2549.
- Kasahara Y, Tudor R, Cool C, Lynch D, Flores S, Voelkel N (2001). Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* **163**(3 Pt 1): 737-744.
- Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burtt NP, Riederer MJ, *et al.* (2008). Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat Genet* **40**(2): 189-197.
- Katoh Y, Katoh M (2006). Comparative integromics on Angiopoietin family members. *International journal of molecular medicine* **17**(6): 1145-1149.
- Katsargyris A, Klonaris C, Bastounis E, Theocharis S (2008). Toll-like receptor modulation: a novel therapeutic strategy in cardiovascular disease? *Expert opinion on therapeutic targets* **12**(11): 1329-1346.
- Katsuyama K, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y (1998). NO inhibits cytokine-induced iNOS expression and NF-kappaB activation by interfering with phosphorylation

- and degradation of IkappaB-alpha. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **18**(11): 1796-1802.
- Kelleher ZT, Matsumoto A, Stamler JS, Marshall HE (2007). NOS2 regulation of NF-kappaB by S-nitrosylation of p65. *The Journal of biological chemistry* **282**(42): 30667-30672.
- Kelly G (2003). The interaction of cigarette smoking and antioxidants. Part III: ascorbic acid. *Altern Med Rev* **8**(1): 43-54.
- Kelly GS (2002). The interaction of cigarette smoking and antioxidants. Part 2: alpha-tocopherol. *Altern Med Rev* **7**(6): 500-511.
- Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annual review of pharmacology and toxicology* **47**: 89-116.
- Kersten S (2005). Regulation of lipid metabolism via angiopoietin-like proteins. *Biochemical Society transactions* **33**(Pt 5): 1059-1062.
- Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, *et al.* (2000). Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *The Journal of biological chemistry* **275**(37): 28488-28493.
- Kikuchi R, Tsuda H, Kozaki K, Kanai Y, Kasamatsu T, Sengoku K, *et al.* (2008). Frequent inactivation of a putative tumor suppressor, angiopoietin-like protein 2, in ovarian cancer. *Cancer research* **68**(13): 5067-5075.
- Kim I, Kim HG, Kim H, Kim HH, Park SK, Uhm CS, *et al.* (2000). Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiopoietin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis. *The Biochemical journal* **346 Pt 3**: 603-610.
- Kim I, Kwak HJ, Ahn JE, So JN, Liu M, Koh KN, *et al.* (1999a). Molecular cloning and characterization of a novel angiopoietin family protein, angiopoietin-3. *FEBS letters* **443**(3): 353-356.
- Kim I, Moon SO, Koh KN, Kim H, Uhm CS, Kwak HJ, *et al.* (1999b). Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein. angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting. *The Journal of biological chemistry* **274**(37): 26523-26528.
- Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY (2001). Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circulation research* **89**(6): 477-479.
- Kirkwood TB, Austad SN (2000). Why do we age? *Nature* **408**(6809): 233-238.

- Kitazawa M, Nagano M, Masumoto KH, Shigeyoshi Y, Natsume T, Hashimoto S (2011). Angiopoietin-like 2, a circadian gene, improves type 2 diabetes through potentiation of insulin sensitivity in mice adipocytes. *Endocrinology* **152**(7): 2558-2567.
- Knowles JW, Reddick RL, Jennette JC, Shesely EG, Smithies O, Maeda N (2000). Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-)Apoe(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J Clin Invest* **105**(4): 451-458.
- Koenig W, Khuseyinova N, Lowel H, Trischler G, Meisinger C (2004). Lipoprotein-associated phospholipase A2 adds to risk prediction of incident coronary events by C-reactive protein in apparently healthy middle-aged men from the general population: results from the 14-year follow-up of a large cohort from southern Germany. *Circulation* **110**(14): 1903-1908.
- Koishi R, Ando Y, Ono M, Shimamura M, Yasumo H, Fujiwara T, *et al.* (2002). Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nature genetics* **30**(2): 151-157.
- Kojda G, Harrison D (1999). Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovascular research* **43**(3): 562-571.
- Kolls JK (2006). Oxidative stress in sepsis: a redox redux. *The Journal of clinical investigation* **116**(4): 860-863.
- Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, *et al.* (2004). Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**(8): 1442-1447.
- Korstanje R, Eriksson P, Samnegard A, Olsson PG, Forsman-Semb K, Sen S, *et al.* (2004). Locating Ath8, a locus for murine atherosclerosis susceptibility and testing several of its candidate genes in mice and humans. *Atherosclerosis* **177**(2): 443-450.
- Koster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, *et al.* (2005). Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology* **146**(11): 4943-4950.
- Kranenburg O, Gebbink MF, Voest EE (2004). Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1654**(1): 23-37.
- Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W (1999a). Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **257**(3): 826-828.

- Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, Hagl S, Libby P, Kubler W (1999b). Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **19**(7): 1623-1629.
- Kubota Y, Oike Y, Satoh S, Tabata Y, Niikura Y, Morisada T, *et al.* (2005a). Cooperative interaction of Angiopoietin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(38): 13502-13507.
- Kubota Y, Oike Y, Satoh S, Tabata Y, Niikura Y, Morisada T, *et al.* (2005b). Isolation and expression patterns of genes for three angiopoietin-like proteins, Angptl1, 2 and 6 in zebrafish. *Gene expression patterns : GEP* **5**(5): 679-685.
- Kuchtey J, Kallberg ME, Gelatt KN, Rinkoski T, Komaromy AM, Kuchtey RW (2008). Angiopoietin-like 7 secretion is induced by glaucoma stimuli and its concentration is elevated in glaucomatous aqueous humor. *Investigative ophthalmology & visual science* **49**(8): 3438-3448.
- Kuhlen cordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, *et al.* (2001). Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation* **104**(4): 448-454.
- Kumamoto M, Nakashima Y, Sueishi K (1995). Intimal neovascularization in human coronary atherosclerosis: its origin and pathophysiological significance. *Human pathology* **26**(4): 450-456.
- Kunkel EJ, Jung U, Bullard DC, Norman KE, Wolitzky BA, Vestweber D, *et al.* (1996a). Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1. *The Journal of experimental medicine* **183**(1): 57-65.
- Kunkel EJ, Ley K (1996b). Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circulation research* **79**(6): 1196-1204.
- Lassaletta AD, Chu LM, Sellke FW (2011). Therapeutic neovascularization for coronary disease: current state and future prospects. *Basic research in cardiology* **106**(6): 897-909.
- Law MR, Wald NJ (2003). Environmental tobacco smoke and ischemic heart disease. *Prog Cardiovasc Dis* **46**(1): 31-38.
- Lawson C, Wolf S (2009). ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep* **61**(1): 22-32.

- Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamande N, Favier J, *et al.* (2003). Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *The American journal of pathology* **162**(5): 1521-1528.
- Lee EC, Desai U, Gololobov G, Hong S, Feng X, Yu XC, *et al.* (2009). Identification of a new functional domain in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3) and angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) involved in binding and inhibition of lipoprotein lipase (LPL). *The Journal of biological chemistry* **284**(20): 13735-13745.
- Lee J, Taneja V, Vassallo R (2012). Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. *J Dent Res* **91**(2): 142-149.
- Lee RT, Libby P (1997). The unstable atheroma. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **17**(10): 1859-1867.
- Legry V, Goumidi L, Huyvaert M, Cottel D, Ferrieres J, Arveiler D, *et al.* (2009). Association between angiopoietin-like 6 (ANGPTL6) gene polymorphisms and metabolic syndrome-related phenotypes in the French MONICA Study. *Diabetes & metabolism* **35**(4): 287-292.
- Levi M, Ten Cate H (1999). Disseminated intravascular coagulation. *The New England journal of medicine* **341**(8): 586-592.
- Levin DC, Fallon JT (1982). Significance of the angiographic morphology of localized coronary stenoses: histopathologic correlations. *Circulation* **66**(2): 316-320.
- Ley K, Allietta M, Bullard DC, Morgan S (1998). Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circulation research* **83**(3): 287-294.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007a). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature* **7**: 678-689.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007b). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* **7**(9): 678-689.
- Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P (1993). An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* **13**(2): 197-204.
- Li H, Sun B (2007). Toll-like receptor 4 in atherosclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine* **11**(1): 88-95.
- Li J, Ichikawa T, Janicki JS, Cui T (2009). Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease. *Expert opinion on therapeutic targets* **13**(7): 785-794.



- Li J, Zhang C, Xing Y, Janicki JS, Yamamoto M, Wang XL, *et al.* (2011). Up-regulation of p27(kip1) contributes to Nrf2-mediated protection against angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Cardiovascular research* **90**(2): 315-324.
- Li W, Khor TO, Xu C, Shen G, Jeong WS, Yu S, *et al.* (2008). Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochemical pharmacology* **76**(11): 1485-1489.
- Libby P (2001). Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* **104**(3): 365-372.
- Libby P (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**(6917): 868-874.
- Libby P (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**(9): 2045-2051.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2011a). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**: 317-325.
- Libby P, Ridker PM, Hansson GK (2011b). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* **473**(7347): 317-325.
- Lichtenstein L, Berbee JF, van Dijk SJ, van Dijk KW, Bensadoun A, Kema IP, *et al.* (2007). Angptl4 upregulates cholesterol synthesis in liver via inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**(11): 2420-2427.
- Lindahl AK (1997). Tissue factor pathway inhibitor: from unknown coagulation inhibitor to major antithrombotic principle. *Cardiovascular research* **33**(2): 286-291.
- Liu X, Ukai T, Yumoto H, Davey M, Goswami S, Gibson FC, 3rd, *et al.* (2008). Toll-like receptor 2 plays a critical role in the progression of atherosclerosis that is independent of dietary lipids. *Atherosclerosis* **196**(1): 146-154.
- Lo SK, Detmers PA, Levin SM, Wright SD (1989). Transient adhesion of neutrophils to endothelium. *The Journal of experimental medicine* **169**(5): 1779-1793.
- Luo W, Wang H, Ohman MK, Guo C, Shi K, Wang J, *et al.* (2012). P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency leads to cytokine resistance and protection against atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice. *Atherosclerosis* **220**(1): 110-117.
- Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, *et al.* (2002). Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature medicine* **8**(8): 831-840.

- Ma JK, Drake PM, Christou P (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews. Genetics* **4**(10): 794-805.
- Ma T, Jham BC, Hu J, Friedman ER, Basile JR, Molinolo A, *et al.* (2010). Viral G protein-coupled receptor up-regulates Angiopoietin-like 4 promoting angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**(32): 14363-14368.
- MacIntyre SS, Schultz D, Kushner I (1983). Synthesis and secretion of C-reactive protein by rabbit primary hepatocyte cultures. *The Biochemical journal* **210**(3): 707-715.
- Mackay CR (2001). Chemokines: immunology's high impact factors. *Nature immunology* **2**(2): 95-101.
- Mahadevan V, Campbell M, McKeown P, Bayraktutan U (2006). Internal mammary artery smooth muscle cells resist migration and possess high antioxidant capacity. *Cardiovasc Res* **72**(1): 60-68.
- Mahil S, Marks D, McCormack M, Rahman A (2012). Dermatomyositis. *Br J Hosp Med (Lond)* **73**(2): C18-22.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, *et al.* (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* **277**(5322): 55-60.
- Mandard S, Zandbergen F, van Straten E, Wahli W, Kuipers F, Muller M, *et al.* (2006). The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *The Journal of biological chemistry* **281**(2): 934-944.
- Mattijssen F, Kersten S (2012). Regulation of triglyceride metabolism by Angiopoietin-like proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1821**(5): 782-789.
- Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD (1993). Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* **74**(3): 541-554.
- Mazzone P, Tierney W, Hossain M, Puvenna V, Janigro D, Cucullo L (2010). Pathophysiological impact of cigarette smoke exposure on the cerebrovascular system with a focus on the blood-brain barrier: expanding the awareness of smoking toxicity in an underappreciated area. *Int J Environ Res Public Health* **7**(12): 4111-4126.

- McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA (2006). Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants & redox signaling* **8**(9-10): 1775-1789.
- McMullen CB, Fleming E, Clarke G, Armstrong MA (2000). The role of reactive oxygen intermediates in the regulation of cytokine-induced ICAM-1 surface expression on endothelial cells. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**(4): 231-237.
- McVeigh GE, Brennan GM, Johnston GD, McDermott BJ, McGrath LT, Henry WR, *et al.* (1992). Impaired endothelium-dependent and independent vasodilation in patients with type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* **35**(8): 771-776.
- Merhi-Soussi F, Kwak BR, Magne D, Chadjichristos C, Berti M, Pelli G, *et al.* (2005). Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovascular research* **66**(3): 583-593.
- Mezzetti A, Lapenna D, Pierdomenico S, Calafiore A, Costantini F, Riario-Sforza G, *et al.* (1995). Vitamins E, C and lipid peroxidation in plasma and arterial tissue of smokers and non-smokers. *Atherosclerosis* **112**(1): 91-99.
- Miida T, Hirayama S (2010). Impacts of angiopoietin-like proteins on lipoprotein metabolism and cardiovascular events. *Current opinion in lipidology* **21**(1): 70-75.
- Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, Ishida Y, Yoshida H, Komuro I (2002). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction. *Circulation* **105**(13): 1541-1544.
- Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL (2011). Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *The American journal of the medical sciences* **342**(2): 135-142.
- Mofidi R, Crotty TB, McCarthy P, Sheehan SJ, Mehigan D, Keaveny TV (2001). Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. *The British journal of surgery* **88**(7): 945-950.
- Monaco C, Gregan SM, Navin TJ, Foxwell BM, Davies AH, Feldmann M (2009). Toll-like receptor-2 mediates inflammation and matrix degradation in human atherosclerosis. *Circulation* **120**(24): 2462-2469.
- Mora S, Ridker PM (2006). Justification for the Use of Statins in Primary Prevention: an Intervention Trial Evaluating Rosuvastatin (JUPITER)--can C-reactive protein be used to target statin therapy in primary prevention? *The American journal of cardiology* **97**(2A): 33A-41A.

- Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK, *et al.* (2004). Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation* **110**(14): 2032-2038.
- Morisada T, Kubota Y, Urano T, Suda T, Oike Y (2006a). Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis. *Endothelium : journal of endothelial cell research* **13**(2): 71-79.
- Morisada T, Kubota Y, Urano T, Suda T, Oike Y (2006b). Angiopoietins and angiopoietin-like proteins in angiogenesis. *Endothelium* **13**(2): 71-79.
- Mosse PR, Campbell GR, Campbell JH (1986). Smooth muscle phenotypic expression in human carotid arteries. II. Atherosclerosis-free diffuse intimal thickenings compared with the media. *Arteriosclerosis* **6**(6): 664-669.
- Moulton KS (2006). Angiogenesis in atherosclerosis: gathering evidence beyond speculation. *Current opinion in lipidology* **17**(5): 548-555.
- Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J (1999). Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **99**(13): 1726-1732.
- Moulton KS, Olsen BR, Sonn S, Fukai N, Zurakowski D, Zeng X (2004). Loss of collagen XVIII enhances neovascularization and vascular permeability in atherosclerosis. *Circulation* **110**(10): 1330-1336.
- Moulton KS, Vakili K, Zurakowski D, Soliman M, Butterfield C, Sylvan E, *et al.* (2003). Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(8): 4736-4741.
- Moura R, Tjwa M, Vandervoort P, Van Kerckhoven S, Holvoet P, Hoylaerts MF (2008). Thrombospondin-1 deficiency accelerates atherosclerotic plaque maturation in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *Circulation research* **103**(10): 1181-1189.
- Muramoto A, Tsushita K, Kato A, Ozaki N, Tabata M, Endo M, *et al.* (2011). Angiopoietin-like protein 2 sensitively responds to weight reduction induced by lifestyle intervention on overweight Japanese men. *Nutrition & diabetes* **1**: e20.
- Nabel EG, Yang ZY, Plautz G, Fough R, Zhan X, Haudenschild CC, *et al.* (1993). Recombinant fibroblast growth factor-1 promotes intimal hyperplasia and angiogenesis in arteries in vivo. *Nature* **362**(6423): 844-846.

- Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, *et al.* (2003a). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II. *Circulation* **108**(15): 1772-1778.
- Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, *et al.* (2003b). From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* **108**(14): 1664-1672.
- Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF (2008). Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* **11**(2): 109-119.
- Nakagawa K, Shibata A, Saito T, Sookwong P, Kato S, Tsuduki T, *et al.* (2011). Phosphatidylcholine hydroperoxide promotes VEGF-induced angiogenesis in endothelial cells and rat aorta ring cultures. *Biochimica et biophysica acta* **1810**(12): 1205-1211.
- Nakayama T, Hirakawa H, Shibata K, Nazneen A, Abe K, Nagayasu T, *et al.* (2011). Expression of angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) in human colorectal cancer: ANGPTL4 promotes venous invasion and distant metastasis. *Oncology reports* **25**(4): 929-935.
- Namiki A, Brogi E, Kearney M, Kim EA, Wu T, Couffignal T, *et al.* (1995). Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* **270**(52): 31189-31195.
- Nettleton JA, Volcik KA, Hoogeveen RC, Boerwinkle E (2009). Carbohydrate intake modifies associations between ANGPTL4[E40K] genotype and HDL-cholesterol concentrations in White men from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis* **203**(1): 214-220.
- Neufeld EJ, Mietus-Snyder M, Beiser AS, Baker AL, Newburger JW (1997). Passive cigarette smoking and reduced HDL cholesterol levels in children with high-risk lipid profiles. *Circulation* **96**(5): 1403-1407.
- Nicita-Mauro V, Lo Balbo C, Mento A, Nicita-Mauro C, Maltese G, Basile G (2008). Smoking, aging and the centenarians. *Exp Gerontol* **43**(2): 95-101.
- Nordskog BK, Blixt AD, Morgan WT, Fields WR, Hellmann GM (2003). Matrix-degrading and pro-inflammatory changes in human vascular endothelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *Cardiovasc Toxicol* **3**(2): 101-117.
- Nyunoya T, Monick M, Klingelhutz A, Yarovinsky T, Cagley J, Hunninghake G (2006). Cigarette smoke induces cellular senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**(6): 681-688.

- O'Brien ER, Garvin MR, Dev R, Stewart DK, Hinohara T, Simpson JB, *et al.* (1994). Angiogenesis in human coronary atherosclerotic plaques. *The American journal of pathology* **145**(4): 883-894.
- O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE (1996). Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* **93**(4): 672-682.
- O'Brien SF, Watts GF, Playford DA, Burke V, O'Neal DN, Best JD (1997). Low-density lipoprotein size, high-density lipoprotein concentration, and endothelial dysfunction in non-insulin-dependent diabetes. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association* **14**(11): 974-978.
- Oei HH, van der Meer IM, Hofman A, Koudstaal PJ, Stijnen T, Breteler MM, *et al.* (2005). Lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with risk of coronary heart disease and ischemic stroke: the Rotterdam Study. *Circulation* **111**(5): 570-575.
- Ogata A, Endo M, Aoi J, Takahashi O, Kadomatsu T, Miyata K, *et al.* (2012). The role of angiopoietin-like protein 2 in pathogenesis of dermatomyositis. *Biochemical and biophysical research communications* **418**(3): 494-499.
- Oike Y, Akao M, Kubota Y, Suda T (2005a). Angiopoietin-like proteins: potential new targets for metabolic syndrome therapy. *Trends in molecular medicine* **11**(10): 473-479.
- Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, Ito Y, *et al.* (2005b). Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nature medicine* **11**(4): 400-408.
- Oike Y, Ito Y, Maekawa H, Morisada T, Kubota Y, Akao M, *et al.* (2004a). Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood* **103**(10): 3760-3765.
- Oike Y, Tabata M (2009a). Angiopoietin-like proteins. *Circ J* **73**(12): 2192-2197.
- Oike Y, Tabata M (2009b). Angiopoietin-like proteins--potential therapeutic targets for metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **73**(12): 2192-2197.
- Oike Y, Yasunaga K, Ito Y, Matsumoto S, Maekawa H, Morisada T, *et al.* (2003). Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(16): 9494-9499.

- Oike Y, Yasunaga K, Suda T (2004b). Angiopoietin-related/angiopoietin-like proteins regulate angiogenesis. *International journal of hematology* **80**(1): 21-28.
- Okada T, Tsukano H, Endo M, Tabata M, Miyata K, Kadomatsu T, *et al.* (2010). Synoviocyte-derived angiopoietin-like protein 2 contributes to synovial chronic inflammation in rheumatoid arthritis. *The American journal of pathology* **176**(5): 2309-2319.
- Okazaki H, Hirakawa S, Shudou M, Nakaoka Y, Shirakata Y, Miyata K, *et al.* (2012). Targeted overexpression of Angptl6/angiopoietin-related growth factor in the skin promotes angiogenesis and lymphatic vessel enlargement in response to ultraviolet B. *The Journal of dermatology* **39**(4): 366-374.
- Olivecrona G, Olivecrona T (2010). Triglyceride lipases and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* **21**(5): 409-415.
- Owuor ED, Kong AN (2002). Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochemical pharmacology* **64**(5-6): 765-770.
- Padua D, Zhang XH, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR, *et al.* (2008). TGFbeta primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4. *Cell* **133**(1): 66-77.
- Paffen E, DeMaat MP (2006). C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? *Cardiovascular research* **71**(1): 30-39.
- Palozza P, Simone RE, Catalano A, Saraceni F, Celleno L, Mele MC, *et al.* (2012). Modulation of mmp-9 pathway by lycopene in macrophages and fibroblasts exposed to cigarette smoke. *Inflamm Allergy Drug Targets* **11**(1): 36-47.
- Pan S (2009). Molecular mechanisms responsible for the atheroprotective effects of laminar shear stress. *Antioxidants & redox signaling* **11**(7): 1669-1682.
- Pandita T (2002). ATM function and telomere stability. *Oncogene* **21**(4): 611-618.
- Panza JA, Quyyumi AA, Brush JE, Jr., Epstein SE (1990). Abnormal endothelium-dependent vascular relaxation in patients with essential hypertension. *The New England journal of medicine* **323**(1): 22-27.
- Parney IF (2012). Basic concepts in glioma immunology. *Advances in experimental medicine and biology* **746**: 42-52.
- Pasceri V, Cheng JS, Willerson JT, Yeh ET (2001). Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* **103**(21): 2531-2534.
- Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET (2000). Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation* **102**(18): 2165-2168.

- Paterson JC, Mills J, Moffatt T (1957). Vascularization of early atherosclerotic plaques. *A.M.A. archives of pathology* **64**(2): 129-136.
- Paulus P, Jennewein C, Zacharowski K (2011). Biomarkers of endothelial dysfunction: can they help us deciphering systemic inflammation and sepsis? *Biomarkers* **16 Suppl 1**: S11-S21.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, *et al.* (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* **22**(2): 153-183.
- Pellacani A, Wiesel P, Sharma A, Foster LC, Huggins GS, Yet SF, *et al.* (1998). Induction of heme oxygenase-1 during endotoxemia is downregulated by transforming growth factor-beta1. *Circulation research* **83**(4): 396-403.
- Peluffo G, Calcerrada P, Piacenza L, Pizzano N, Radi R (2009). Superoxide-mediated inactivation of nitric oxide and peroxynitrite formation by tobacco smoke in vascular endothelium: studies in cultured cells and smokers. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **296**(6): H1781-1792.
- Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, *et al.* (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**(5392): 1281-1284.
- Phillips JW, Barringhaus KG, Sanders JM, Hesselbacher SE, Czarnik AC, Manka D, *et al.* (2003). Single injection of P-selectin or P-selectin glycoprotein ligand-1 monoclonal antibody blocks neointima formation after arterial injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* **107**(17): 2244-2249.
- Pipe AL, Papadakis S, Reid RD (2010). The role of smoking cessation in the prevention of coronary artery disease. *Current atherosclerosis reports* **12**(2): 145-150.
- Pisciotta L, Favari E, Magnolo L, Simonelli S, Adorni MP, Sallo R, *et al.* (2012). Characterization of three kindreds with familial combined hypolipidemia caused by loss-of-function mutations of ANGPTL3. *Circulation. Cardiovascular genetics* **5**(1): 42-50.
- Post S, Peeters W, Busser E, Lamers D, Sluijter JP, Goumans MJ, *et al.* (2008). Balance between angiotensin-1 and angiotensin-2 is in favor of angiotensin-2 in atherosclerotic plaques with high microvessel density. *Journal of vascular research* **45**(3): 244-250.
- Price DT, Loscalzo J (1999). Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *The American journal of medicine* **107**(1): 85-97.



- Pries AR, Kuebler WM (2006). Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*(176 Pt 1): 1-40.
- Puga J (1995). The use of the internal mammary artery for revascularization of the left anterior descending coronary artery. *Eur Heart J* **16 Suppl E**(21-5).
- Purushothaman KR, Meerarani P, Moreno PR (2007). Inflammation and neovascularization in diabetic atherosclerosis. *Indian journal of experimental biology* **45**(1): 93-102.
- Qamirani E, Ren Y, Kuo L, Hein TW (2005). C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**(5): 995-1001.
- Quagliarini F, Wang Y, Kozlitina J, Grishin NV, Hyde R, Boerwinkle E, *et al.* (2012). Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**(48): 19751-19756.
- Rajj L, DeMaster EG, Jaimes EA (2001). Cigarette smoke-induced endothelium dysfunction: role of superoxide anion. *Journal of hypertension* **19**(5): 891-897.
- Raines EW, Ross R (1993). Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *British heart journal* **69**(1 Suppl): S30-37.
- Raj T, Kanellakis P, Pomilio G, Jennings G, Bobik A, Agrotis A (2006). Inhibition of fibroblast growth factor receptor signaling attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **26**(8): 1845-1851.
- Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling* **24**(5): 981-990.
- Rekhter MD (1999). Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovascular research* **41**(2): 376-384.
- Ren B, Yee KO, Lawler J, Khosravi-Far R (2006). Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochimica et biophysica acta* **1765**(2): 178-188.
- Resnick N, Yahav H, Schubert S, Wolfvovitz E, Shay A (2000). Signalling pathways in vascular endothelium activated by shear stress: relevance to atherosclerosis. *Current opinion in lipidology* **11**(2): 167-177.
- Reynaert NL, Ckless K, Korn SH, Vos N, Guala AS, Wouters EF, *et al.* (2004). Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(24): 8945-8950.

- Ribatti D, Levi-Schaffer F, Kovanen PT (2008). Inflammatory angiogenesis in atherogenesis--a double-edged sword. *Annals of medicine* **40**(8): 606-621.
- Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, Rifai N, Rose LM, McCabe CH, *et al.* (2005). C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *The New England journal of medicine* **352**(1): 20-28.
- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Jr., Kastelein JJ, *et al.* (2008). Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *The New England journal of medicine* **359**(21): 2195-2207.
- 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. *The New England journal of medicine* **342**(12): 836-843.
- Ridley AJ (2001). Rho GTPases and cell migration. *Journal of cell science* **114**(Pt 15): 2713-2722.
- Riessen R, Kearney M, Lawler J, Isner JM (1998). Immunolocalization of thrombospondin-1 in human atherosclerotic and restenotic arteries. *American heart journal* **135**(2 Pt 1): 357-364.
- Rivera-Nieves J, Gorfu G, Ley K (2008). Leukocyte adhesion molecules in animal models of inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases* **14**(12): 1715-1735.
- Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, *et al.* (2007). Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nature genetics* **39**(4): 513-516.
- Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Hobbs HH, *et al.* (2009). Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *The Journal of clinical investigation* **119**(1): 70-79.
- Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Lipton BA, Ord VA, Witztum JL, Steinberg D (1992). Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *The American journal of pathology* **140**(2): 291-300.
- Ross R (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine* **340**(2): 115-126.
- Ross R (1986). The pathogenesis of atherosclerosis--an update. *The New England journal of medicine* **314**(8): 488-500.

- Ross R (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**(6423): 801-809.
- Ross R, Glomset JA (1976 a). The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *The New England journal of medicine* **295**(7): 369-377.
- Ross R, Glomset JA (1976 b). The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *The New England journal of medicine* **295**(8): 420-425.
- Roubille F, Kritikou EA, Roubille C, Tardif JC (2013). Emerging Anti-Inflammatory Therapies For Atherosclerosis. *Current pharmaceutical design*.
- Saba L, Caddeo G, Sanfilippo R, Montisci R, Mallarini G (2007). CT and ultrasound in the study of ulcerated carotid plaque compared with surgical results: potentialities and advantages of multidetector row CT angiography. *AJNR Am J Neuroradiol* **28**(6): 1061-1066.
- Satoh T, Okamoto SI, Cui J, Watanabe Y, Furuta K, Suzuki M, *et al.* (2006). Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophillic] phase II inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(3): 768-773.
- Schjoldager KT, Vester-Christensen MB, Bennett EP, Lavery SB, Schwientek T, Yin W, *et al.* (2010). O-glycosylation modulates proprotein convertase activation of angiopoietin-like protein 3: possible role of polypeptide GalNAc-transferase-2 in regulation of concentrations of plasma lipids. *The Journal of biological chemistry* **285**(47): 36293-36303.
- Schwartz SM, Benditt EP (1977). Aortic endothelial cell replication. I. Effects of age and hypertension in the rat. *Circulation research* **41**(2): 248-255.
- Schwarz N, Pruessmeyer J, Hess FM, Dreymueller D, Pantaler E, Koelsch A, *et al.* (2010). Requirements for leukocyte transmigration via the transmembrane chemokine CX3CL1. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **67**(24): 4233-4248.
- Seigneur M, Dufourcq P, Conri C, Constans J, Mercie P, Pruvost A, *et al.* (1993). Levels of plasma thrombomodulin are increased in atheromatous arterial disease. *Thromb Res* **71**(6): 423-431.
- Shan L, Yu XC, Liu Z, Hu Y, Sturgis LT, Miranda ML, *et al.* (2009). The angiopoietin-like proteins ANGPTL3 and ANGPTL4 inhibit lipoprotein lipase activity through distinct mechanisms. *The Journal of biological chemistry* **284**(3): 1419-1424.
- Sharma S, Dwivedi S, Prabhu K, Singh G, Kumar N, Lal M (2002). Coronary risk variables in young asymptomatic smokers. *Indian J Med Res* **122**: 205-210.

- Shashkin P, Dragulev B, Ley K (2005). Macrophage differentiation to foam cells. *Current pharmaceutical design* **11**(23): 3061-3072.
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, *et al.* (1995). Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *The New England journal of medicine* **333**(20): 1301-1307.
- Shimamura M, Matsuda M, Kobayashi S, Ando Y, Ono M, Koishi R, *et al.* (2003). Angiopoietin-like protein 3, a hepatic secretory factor, activates lipolysis in adipocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **301**(2): 604-609.
- Shimamura M, Matsuda M, Yasumo H, Okazaki M, Fujimoto K, Kono K, *et al.* (2007). Angiopoietin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **27**(2): 366-372.
- Shimizugawa T, Ono M, Shimamura M, Yoshida K, Ando Y, Koishi R, *et al.* (2002). ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase. *The Journal of biological chemistry* **277**(37): 33742-33748.
- Shimokawa H, Vanhoutte PM (1989). Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation research* **64**(5): 900-914.
- Shinkai Y, Kaji T (2012). Cellular defense mechanisms against lead toxicity in the vascular system. *Biological & pharmaceutical bulletin* **35**(11): 1885-1891.
- Shoji T, Hatsuda S, Tsuchikura S, Kimoto E, Kakiya R, Tahara H, *et al.* (2009). Plasma angiopoietin-like protein 3 (ANGPTL3) concentration is associated with uremic dyslipidemia. *Atherosclerosis* **207**(2): 579-584.
- Siegel D, Devaraj S, Mitra A, Raychaudhuri SP, Raychaudhuri SK, Jialal I (2013). Inflammation, Atherosclerosis, and Psoriasis. *Clinical reviews in allergy & immunology* **44**(2): 194-204.
- Simionescu M, Simionescu N (1993). Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **7**(14): 1359-1366.

- Singh S, Vrishni S, Singh BK, Rahman I, Kakkar P (2010). Nrf2-ARE stress response mechanism: a control point in oxidative stress-mediated dysfunctions and chronic inflammatory diseases. *Free radical research* **44**(11): 1267-1288.
- Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, *et al.* (2010). From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev* **9**(12): 830-834.
- Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, Hulten LM, Wiklund O, Innerarity TL, *et al.* (2002). Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. *Nature* **417**(6890): 750-754.
- Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI (1994). Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *American journal of human genetics* **55**(5): 876-882.
- Slevin M, Krupinski J, Badimon L (2009). Controlling the angiogenic switch in developing atherosclerotic plaques: possible targets for therapeutic intervention. *Journal of angiogenesis research* **1**: 4.
- Smart-Halajko MC, Robciuc MR, Cooper JA, Jauhiainen M, Kumari M, Kivimaki M, *et al.* (2010). The relationship between plasma angiopoietin-like protein 4 levels, angiopoietin-like protein 4 genotype, and coronary heart disease risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **30**(11): 2277-2282.
- Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(18): 8264-8268.
- Song M, Cho S (2009). TAngiopoietin-like 3 (ANGPTL3) Stimulates Human Umbilical Vein Endothelial Cell. Tube Formation and Vascular Endothelial Growth Factor Production. *Bull. Korean Chem. Soc.* **30**(3): 707-709.
- Springer TA (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**(6283): 425-434.
- Stafforini DM, Elstad MR, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1990). Human macrophages secrete platelet-activating factor acetylhydrolase. *The Journal of biological chemistry* **265**(17): 9682-9687.
- Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME, Prescott SM (1987). Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *The Journal of biological chemistry* **262**(9): 4215-4222.

- Staiger H, Machicao F, Werner R, Guirguis A, Weisser M, Stefan N, *et al.* (2008). Genetic variation within the ANGPTL4 gene is not associated with metabolic traits in white subjects at an increased risk for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism: clinical and experimental* **57**(5): 637-643.
- Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., *et al.* (1995). A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **92**(5): 1355-1374.
- Stein JV, Rot A, Luo Y, Narasimhaswamy M, Nakano H, Gunn MD, *et al.* (2000). The CC chemokine thymus-derived chemotactic agent 4 (TCA-4, secondary lymphoid tissue chemokine, 6Ckine, exodus-2) triggers lymphocyte function-associated antigen 1-mediated arrest of rolling T lymphocytes in peripheral lymph node high endothelial venules. *The Journal of experimental medicine* **191**(1): 61-76.
- Stejskal D, Karpisek M, Reutova H, Humenanska V, Petzel M, Kusnierova P, *et al.* (2008). Angiopoietin-like protein 4: development, analytical characterization, and clinical testing of a new ELISA. *General physiology and biophysics* **27**(1): 59-63.
- Stocker R, Keaney JF, Jr. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological reviews* **84**(4): 1381-1478.
- Stocker R, Perrella MA (2006). Heme oxygenase-1: a novel drug target for atherosclerotic diseases? *Circulation* **114**(20): 2178-2189.
- Strachan GD, Ostrow LA, Jordan-Sciutto KL (2005). Expression of the fetal Alz-50 clone 1 protein induces apoptotic cell death. *Biochemical and biophysical research communications* **336**(2): 490-495.
- Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G (2006). Angiopoietin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(46): 17450-17455.
- Sun H, Zheng J, Chen S, Zeng C, Liu Z, Li L (2007). Enhanced expression of ANGPTL2 in the microvascular lesions of diabetic glomerulopathy. *Nephron Exp Nephrol* **105**(4): e117-123.
- Sun ZK, Yang HQ, Pan J, Zhen H, Wang ZQ, Chen SD, *et al.* (2008). Protective effects of erythropoietin on tau phosphorylation induced by beta-amyloid. *Journal of neuroscience research* **86**(13): 3018-3027.

- Tabas I, Glass CK (2013). Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science* **339**(6116): 166-172.
- Tabas I, Williams KJ, Boren J (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation* **116**(16): 1832-1844.
- Tabata M, Kadomatsu T, Fukuhara S, Miyata K, Ito Y, Endo M, *et al.* (2009). Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance. *Cell metabolism* **10**(3): 178-188.
- Tabit CE, Holbrook M, Shenouda SM, Dohadwala MM, Widlansky ME, Frame AA, *et al.* (2012). Effect of sulfasalazine on inflammation and endothelial function in patients with established coronary artery disease. *Vasc Med* **17**(2): 101-107.
- Tabuchi A, Sano K, Oh E, Tsuchiya T, Tsuda M (1994). Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS letters* **351**(1): 123-127.
- Takaya N, Yuan C, Chu B, Saam T, Polissar NL, Jarvik GP, *et al.* (2005). Presence of intraplaque hemorrhage stimulates progression of carotid atherosclerotic plaques: a high-resolution magnetic resonance imaging study. *Circulation* **111**(21): 2768-2775.
- Talmud PJ, Smart M, Presswood E, Cooper JA, Nicaud V, Drenos F, *et al.* (2008). ANGPTL4 E40K and T266M: effects on plasma triglyceride and HDL levels, postprandial responses, and CHD risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**(12): 2319-2325.
- Tan W, Palmby TR, Gavard J, Amornphimoltham P, Zheng Y, Gutkind JS (2008). An essential role for Rac1 in endothelial cell function and vascular development. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **22**(6): 1829-1838.
- Tardif JC, L'Allier P L, Ibrahim R, Gregoire JC, Nozza A, Cossette M, *et al.* (2010). Treatment with 5-lipoxygenase inhibitor VIA-2291 (Atreleuton) in patients with recent acute coronary syndrome. *Circulation. Cardiovascular imaging* **3**(3): 298-307.
- Taylor FB, Jr., Toh CH, Hoots WK, Wada H, Levi M (2001). Towards definition, clinical and laboratory criteria, and a scoring system for disseminated intravascular coagulation. *Thrombosis and haemostasis* **86**(5): 1327-1330.

- Taylor KE, Glagov S, Zarins CK (1989). Preservation and structural adaptation of endothelium over experimental foam cell lesions. Quantitative ultrastructural study. *Arteriosclerosis* **9**(6): 881-894.
- Tazume H, Miyata K, Tian Z, Endo M, Horiguchi H, Takahashi O, *et al.* (2012). Macrophage-derived angiopoietin-like protein 2 accelerates development of abdominal aortic aneurysm. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **32**(6): 1400-1409.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **279**(6): L1005-1028.
- Thimmulappa RK, Mai KH, Srisuma S, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer research* **62**(18): 5196-5203.
- Thimmulappa RK, Scollick C, Traore K, Yates M, Trush MA, Liby KT, *et al.* (2006). Nrf2-dependent protection from LPS induced inflammatory response and mortality by CDDO-Imidazole. *Biochemical and biophysical research communications* **351**(4): 883-889.
- Thorin-Trescases N, Voghel G, Farhat N, Drouin A, Gendron ME, Thorin E (2010). [Age-dependent oxidative stress: toward an irreversible failure in endothelial maintenance]. *Medecine sciences : M/S* **26**(10): 875-880.
- Tobias PS, Curtiss LK (2007). Toll-like receptors in atherosclerosis. *Biochemical Society transactions* **35**(Pt 6): 1453-1455.
- Topper JN, Gimbrone MA, Jr. (1999). Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype. *Mol Med Today* **5**(1): 40-46.
- Trollope AF, Golledge J (2011). Angiopoietins, abdominal aortic aneurysm and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **214**(2): 237-243.
- Tsuchiya M, Asada A, Kasahara E, Sato EF, Shindo M, Inoue M (2002). Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma. *Circulation* **105**(10): 1155-1157.
- Tsuji T, Aoshiba K, Nagai A (2006). Alveolar cell senescence in patients with pulmonary emphysema. *Am J Respir Crit Care Med* **174**(8): 886-893.
- Ueno H, Pradhan S, Schlessel D, Hirasawa H, Sumpio BE (2006). Nicotine enhances human vascular endothelial cell expression of ICAM-1 and VCAM-1 via protein kinase C, p38 mitogen-activated protein kinase, NF-kappaB, and AP-1. *Cardiovasc Toxicol* **6**(1): 39-50.



- Urano T, Ito Y, Akao M, Sawa T, Miyata K, Tabata M, *et al.* (2008). Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**(5): 827-834.
- Ushio-Fukai M (2006). Redox signaling in angiogenesis: role of NADPH oxidase. *Cardiovascular research* **71**(2): 226-235.
- Valdes A, Andrew T, Gardner J, Kimura M, Oelsner E, Cherkas L, *et al.* (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* **366**(9486): 662-664.
- Valenzuela DM, Griffiths JA, Rojas J, Aldrich TH, Jones PF, Zhou H, *et al.* (1999). Angiopoietins 3 and 4: diverging gene counterparts in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**(5): 1904-1909.
- Valgimigli M, Merli E, Malagutti P, Soukhomovskaia O, Cicchitelli G, Macri G, *et al.* (2003). Endothelial dysfunction in acute and chronic coronary syndromes: evidence for a pathogenetic role of oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* **420**(2): 255-261.
- van Buul JD, Hordijk PL (2009). Endothelial adapter proteins in leukocyte transmigration. *Thrombosis and haemostasis* **101**(4): 649-655.
- van Horsen J, Drexhage JA, Flor T, Gerritsen W, van der Valk P, de Vries HE (2010). Nrf2 and DJ1 are consistently upregulated in inflammatory multiple sclerosis lesions. *Free radical biology & medicine* **49**(8): 1283-1289.
- Vanhoutte PM (2003). Endothelial control of vasomotor function: from health to coronary disease. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **67**(7): 572-575.
- Vanhoutte PM (2009). Endothelial dysfunction: the first step toward coronary arteriosclerosis. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **73**(4): 595-601.
- Vanhoutte PM (2010). Regeneration of the endothelium in vascular injury. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* **24**(4): 299-303.
- Vanhoutte PM (2000). Say NO to ET. *J Auton Nerv Syst* **81**(1-3): 271-277.
- Velichkova M, Hasson T (2005). Keap1 regulates the oxidation-sensitive shuttling of Nrf2 into and out of the nucleus via a Crm1-dependent nuclear export mechanism. *Molecular and cellular biology* **25**(11): 4501-4513.

- Villacorta L, Zhang J, Garcia-Barrio MT, Chen XL, Freeman BA, Chen YE, *et al.* (2007). Nitro-linoleic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via the Keap1/Nrf2 signaling pathway. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **293**(1): H770-776.
- Virani SS, Polsani VR, Nambi V (2008). Novel markers of inflammation in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports* **10**(2): 164-170.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM (2000). Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **20**(5): 1262-1275.
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, *et al.* (2005). Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**(10): 2054-2061.
- Vita JA, Keaney JF, Jr. (2002). Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk? *Circulation* **106**(6): 640-642.
- Vladimirova-Kitova L, Deneva T, Angelova E, Nikolov F, Marinov B, Mateva N (2008). Relationship of asymmetric dimethylarginine with flow-mediated dilatation in subjects with newly detected severe hypercholesterolemia. *Clinical physiology and functional imaging* **28**(6): 417-425.
- Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi A, Villeneuve L, Fortier A, *et al.* (2008a). Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mech Ageing Dev* **129**(5): 261-270.
- Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Mamarbachi AM, Villeneuve L, Fortier A, *et al.* (2008b). Chronic treatment with N-acetyl-cystein delays cellular senescence in endothelial cells isolated from a subgroup of atherosclerotic patients. *Mechanisms of ageing and development* **129**(5): 261-270.
- Voghel G, Thorin-Trescases N, Farhat N, Nguyen A, Villeneuve L, Mamarbachi AM, *et al.* (2007). Cellular senescence in endothelial cells from atherosclerotic patients is accelerated by oxidative stress associated with cardiovascular risk factors. *Mech Ageing Dev* **128**(11-12): 662-671.
- Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C (2009). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese* **50**(5): 402-409.

- von Andrian UH, Mackay CR (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England journal of medicine* **343**(14): 1020-1034.
- Von Zglinicki T (2003). Replicative senescence and the art of counting. *Experimental gerontology* **38**(11-12): 1259-1264.
- von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagagna F, Jackson SP (2005). Human cell senescence as a DNA damage response. *Mechanisms of ageing and development* **126**(1): 111-117.
- Vuorio T, Jauhainen S, Yla-Herttuala S (2012). Pro- and anti-angiogenic therapy and atherosclerosis with special emphasis on vascular endothelial growth factors. *Expert opinion on biological therapy* **12**(1): 79-92.
- Walldius G, Jungner I (2004). Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. *Journal of internal medicine* **255**(2): 188-205.
- Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E (2001). High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* **358**(9298): 2026-2033.
- Wannamethee S, Lowe G, Shaper A, Rumley A, Lennon L, Whincup P (2005). Associations between cigarette smoking, pipe/cigar smoking, and smoking cessation, and haemostatic and inflammatory markers for cardiovascular disease. *Eur Heart J* **26**(17): 1765-1773.
- Weber C (2003). Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J Mol Med (Berl)* **81**(1): 4-19.
- Weerapana E, Imperiali B (2006). Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology* **16**(6): 91R-101R.
- Wilhelmi MH, Leyh RG, Wilhelmi M, Haverich A (2005). Upregulation of endothelial adhesion molecules in hearts with congestive and ischemic cardiomyopathy: immunohistochemical evaluation of inflammatory endothelial cell activation. *Eur J Cardiothorac Surg* **27**(1): 122-127.
- Xiao HB, Sun ZL, Lu XY, Li DZ, Xu JP, Hu YP (2008). Beneficial effect of 3,4,5,6-tetrahydroxyxanthone on dyslipidemia in apolipoprotein E-deficient mice. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **86**(12): 815-826.
- Xu A, Lam MC, Chan KW, Wang Y, Zhang J, Hoo RL, et al. (2005). Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces

- hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(17): 6086-6091.
- Yang YH, Wang Y, Lam KS, Yau MH, Cheng KK, Zhang J, *et al.* (2008). Suppression of the Raf/MEK/ERK signaling cascade and inhibition of angiogenesis by the carboxyl terminus of angiotensin-like protein 4. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **28**(5): 835-840.
- Yao SK, Ober JC, Krishnaswami A, Ferguson JJ, Anderson HV, Golino P, *et al.* (1992). Endogenous nitric oxide protects against platelet aggregation and cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries. *Circulation* **86**(4): 1302-1309.
- Yin W, Romeo S, Chang S, Grishin NV, Hobbs HH, Cohen JC (2009). Genetic variation in ANGPTL4 provides insights into protein processing and function. *The Journal of biological chemistry* **284**(19): 13213-13222.
- Yoh K, Itoh K, Enomoto A, Hirayama A, Yamaguchi N, Kobayashi M, *et al.* (2001). Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis. *Kidney international* **60**(4): 1343-1353.
- Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, Furukawa H (2002). Angiotensin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *Journal of lipid research* **43**(11): 1770-1772.
- Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, *et al.* (2004). Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* **364**(9438): 937-952.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003). Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **60**(1): 6-20.
- Zakkar M, Van der Heiden K, Luong le A, Chaudhury H, Cuhlmann S, Hamdulay SS, *et al.* (2009). Activation of Nrf2 in endothelial cells protects arteries from exhibiting a proinflammatory state. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **29**(11): 1851-1857.
- Zeng L, Dai J, Ying K, Zhao E, Jin W, Ye Y, *et al.* (2003). Identification of a novel human angiotensin-like gene expressed mainly in heart. *Journal of human genetics* **48**(3): 159-162.
- Zhang C (2008). The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic research in cardiology* **103**(5): 398-406.

- Zhang CC, Kaba M, Ge G, Xie K, Tong W, Hug C, *et al.* (2006a). Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nature medicine* **12**(2): 240-245.
- Zhang Y, Hu X, Tian R, Wei W, Hu W, Chen X, *et al.* (2006b). Angiopoietin-related growth factor (AGF) supports adhesion, spreading, and migration of keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells through interaction with RGD-binding integrins. *Biochemical and biophysical research communications* **347**(1): 100-108.
- Zhao Q, Egashira K, Hiasa K, Ishibashi M, Inoue S, Ohtani K, *et al.* (2004). Essential role of vascular endothelial growth factor and Flt-1 signals in neointimal formation after periadventitial injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **24**(12): 2284-2289.
- Zheng J, Umikawa M, Cui C, Li J, Chen X, Zhang C, *et al.* (2012a). Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature* **485**(7400): 656-660.
- Zheng J, Umikawa M, Cui C, Li J, Chen X, Zhang C, *et al.* (2012b). Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature* **485**(7400): 656-660.
- Zheng JY, Zou JJ, Wang WZ, Feng XY, Shi YY, Zhao Y, *et al.* (2011). Tumor necrosis factor-alpha increases angiopoietin-like protein 2 gene expression by activating Foxo1 in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and cellular endocrinology* **339**(1-2): 120-129.
- Zhu P, Goh YY, Chin HF, Kersten S, Tan NS (2012). Angiopoietin-like 4: a decade of research. *Bioscience reports* **32**(3): 211-219.
- Zwaka TP, Hombach V, Torzewski J (2001). C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis. *Circulation* **103**(9): 1194-1197.