

Université de Montréal

**Développement d'une sonde fluorescente bioactivable pour l'étude du rôle
in vitro et *in vivo* des protéases dégradant l'apolipoprotéine A-I.**

Par
Foued Maafi

Département des Sciences biomédicales
Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Sciences biomédicales
Option générale

Avril, 2015

© Foued Maafi, 2015

Université de Montréal
Faculté des études Supérieures

Ce mémoire est intitulé:

**Développement d'une sonde fluorescente bioactivable pour l'étude du rôle
in vitro et *in vivo* des protéases dégradant l'apolipoprotéine A-I.**

Présenté par :

Foued Maafi

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr, Pedro D'Orléans Juste, président-rapporteur

Dr Jean-Claude Tardif, directeur de recherche

Dr Eric Rhéaume, co-directeur

Dr, Réjean Couture, membre du jury

Résumé

Les effets bénéfiques des lipoprotéines de haute densité (HDL) contre l'athérosclérose ont été attribués, en grande partie, à leur composante protéique majeure, l'apolipoprotéine A-I (apoA-I). Cependant, il y a des indications que l'apoA-I peut être dégradée par des protéases localisées dans les plaques athérosclérotiques humaines, ce qui pourrait réduire l'efficacité des thérapies basées sur les HDL sous certaines conditions. Nous décrivons ici le développement et l'utilisation d'une nouvelle sonde bioactivable fluorescente dans le proche infrarouge, apoA-I-Cy5.5, pour l'évaluation des activités protéolytiques spécifiques qui dégradent l'apoA-I *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*. La fluorescence basale de la sonde est inhibée par la saturation du fluorophore Cy5.5 sur la protéine apoA-I, et la fluorescence émise par le Cy5.5 (proche infrarouge) est révélée après clivage de la sonde. La protéolyse *in vitro* de l'apoA-I par des protéases a montré une augmentation de la fluorescence allant jusqu'à 11 fois ($n=5$, $P \leq 0.05$). En utilisant notre nouvelle sonde apoA-I-Cy5.5 nous avons pu quantifier les activités protéolytiques d'une grande variété de protéases, incluant des sérines (chymase), des cystéines (cathepsine S), et des métalloprotéases (MMP-12). En outre, nous avons pu détecter l'activation de la sonde apoA-I-Cy5.5 sur des sections d'aorte de souris athérosclérotiques par zymographie *in situ* et avons observé qu'en présence d'inhibiteurs de protéases à large spectre, la sonde pourrait être protégée des activités protéolytiques des protéases (-54%, $n=6$, $P \leq 0,001$). L'infusion *in vivo* de la sonde apoA-I-Cy5.5 dans les souris athérosclérotiques (*Ldlr*^{-/-}-Tg (apoB humaine)) a résulté en utilisant un système d'imagerie moléculaire combinant la fluorescence moléculaire tomographique et la résonance magnétique, en un signal de fluorescence dans l'aorte plus important que celui dans les aortes des souris de type sauvage C57Bl/6J (CTL). Les mesures *in vivo* ont été confirmées par l'imagerie *ex vivo* de l'aorte qui a indiqué une augmentation de 5 fois du signal fluorescent dans l'aorte des souris ATX ($n=5$) par rapport à l'aorte des souris ($n=3$) CTL ($P \leq 0,05$). L'utilisation de cette sonde pourrait conduire à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent le développement et la progression de l'athérosclérose et l'amélioration des stratégies thérapeutiques à base de HDL.

Mots-clés : Athérosclérose, HDL, apoA-I, sonde fluorescente bioactivable, imagerie NIRF, FMT, IRM, protéases, apoA-I protéolyse.

Abstract

The beneficial effects of high-density lipoprotein (HDL) against atherosclerosis have been largely attributed to its major protein component, the apolipoprotein A-I (apoA-I). However, there are indications that apoA-I can be degraded by proteases localized in human atherosclerotic plaques, which could reduce the effectiveness of HDL-based therapies under certain conditions. Here we describe the development and use of a new bioactivatable full-length near-infrared apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe for specific assessment of proteolytic activities that degrade apoA-I *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo*. The probe is quenched by saturation of Cy5.5 fluorophore on the protein, and fluorescence emitted by Cy5.5 (near-infrared) is revealed after its apoA-I cleavage. *In vitro* proteolysis of the apoA-I probe showed up to 11-fold increase of near-infrared fluorescence (n=5, $P \leq 0.05$). We were able to quantify proteolytic activities from a wide range of proteases such as serine (chymase) and cysteine (cathepsin S) proteases and metalloproteases (MMP-12). Also, we detected activation of the apoA-I-Cy5.5 probe on aortic cryosections from *Ldlr*^{-/-};Tg(human apoB) atherosclerotic (ATX) mice using an *in situ* zymography assay and observed that broad-spectrum protease inhibitors protected the probe from protease activities, as shown by decreased fluorescence compared to conditions without protease inhibitors (-54%, n= 6 per group, $P \leq 0.001$). *In vivo*, using a combined fluorescence molecular tomography-magnetic resonance imaging system, the injected probe exhibited a trend for increased fluorescence in the aorta when infused in ATX mice compared to C57BL/6J wild-type mice. *Ex vivo* imaging of these aortas showed a 10-fold increase of fluorescence in ATX (n=5) mice compared to CTL (n=3) mice ($P \leq 0.05$). The use of this probe could lead to improved understanding of the molecular mechanisms underlying the development and progression of atherosclerosis and improved HDL-based therapeutic strategies.

Keywords : Atherosclerosis, HDL, apoA-I, bioactivatable fluorescent probe, NIRF imaging, FMT, MRI, Proteases, apoA-I proteolysis.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste de sigles et abréviations	x
Remerciements.....	xvii
Introduction.....	1
1. L'athérosclérose.....	1
1.1. Facteurs de risque.....	1
1.2. Progression et événements moléculaires.....	1
1.2.1. Histologies des artères.	1
1.2.2. Initiation de la lésion d'athérome	2
1.2.3. Recrutement et transformation des cellules inflammatoires.....	3
1.2.4. Formation de la chape fibreuse et stabilisation de la plaque	5
1.2.5. Complication de la plaque et incidents associés.....	5
1.3. Modèle animal d'athérosclérose	7
1.3.1. Souris <i>ApoE</i> ^{-/-}	7
1.3.2. Souris ATX (<i>Lldr</i> ^{-/-} <i>APOB</i> ^{+/+}).....	7
2. Protéases et athérosclérose	9
2.1. Les classes de protéases et leurs structures	10
2.1.1. Les métalloprotéinases (MMPs).....	12
2.1.1.1. Rôle physiologique des MMP	15
2.1.1.2. Rôle des MMP en athérosclérose.....	15
2.1.2. Les protéases à sérines.....	16
2.1.2.1. Rôle physiologique des protéases à sérines	18
2.1.2.2. Rôle des protéases à sérines en athérosclérose	19
2.1.3. Les protéases à cystéines	21
2.1.3.1. Rôle physiologique des protéases à cystéines.....	22

2.1.3.2. Rôle des protéases à cystéines en athérosclérose.....	23
3. Métabolisme et fonction des lipoprotéines de haute densité	24
3.1. Le cholestérol	24
3.2. Les transporteurs du cholestérol (lipoprotéines)	25
3.3. Structure et classification des lipoprotéines de haute densité	26
3.3.1. Caractérisation de la composante majeure des HDL (l'apoA-I)	26
3.3.2. Les modèles structuraux de l'apoA-I libre et associée aux HDL	27
3.3.2.1. Modèle en super-hélice double des HDL naissantes	27
3.3.2.2. Modèle solar-flares des HDL discoïdales naissantes	28
3.4. Le transport à rebours du cholestérol (RCT).....	29
3.4.1. Efflux du cholestérol cellulaire : étape 1 du RCT	29
3.4.2. La clairance hépatique du cholestérol : étape 2 du RCT	30
4. Fonctions athéroprotectrices des HDL	31
4.1. Fonction anti-inflammatoire.....	32
4.2. Fonctions anti-oxydantes	32
4.2.1. Sources du stress oxydant	32
4.2.2. Effet des HDL sur le stress oxydant	33
4.3. Fonctions diverses des HDL	34
5. Les thérapies basées sur l'utilisation des HDL	34
5.1. Les thérapies visant l'augmentation des HDL endogènes	35
5.2. Les stratégies thérapeutiques par infusion d'HDL et de l'apoA-I.....	37
6. Le concept des HDL dysfonctionnels.....	38
6.1. Oxydation de l'apoA-I par la MPO et dysfonction des HDL	39
6.2. Protéolyse de l'apoA-I et dysfonction des HDL.....	40
6.2.1. Facteurs favorisant l'activité protéolytique dégradant l'apoA-I.....	42
6.2.2. Protéolyse de l'apoA-I par les protéases mastocytaires	43
6.2.2.1. Impact de la CMA sur la fonction de l'apoA-I et des HDL	44
6.2.2.2. Impact de la CPA sur la fonction de l'apoA-I et des HDL.....	45
6.2.2.3. Impact de la tryptase sur la fonction de l'apoA-I et des HDL.....	45
6.2.3. Protéolyse de l'apoA-I par les protéases des macrophages.....	46
6.2.3.1. Protéolyse de l'apoA-I par les cathepsines	46

6.2.3.2. Protéolyse de l'apoA-I par les MMP	46
6.2.4. Autres protéases qui dégradent l'apoA-I.....	47
7. Profilage de l'activité des protéases	49
8. Développements de substrats fluorescents activables par protéolyse	50
8.1. Mécanisme de base d'émission de la lumière fluorescente	50
8.2. Mesure de la luminosité (brillance) du fluorophore.....	51
8.3. Gamme de la lumière fluorescente.....	51
8.4. Principe d'auto-inhibition de la fluorescence (quenching).....	52
8.5. Classes et caractéristiques des fluorophores	55
8.5.1. Fluorophores organiques.....	55
8.5.1.1. Fluorophores organiques synthétiques.....	55
8.5.1.1.1. Les fluorophores de type cyanines (Cy).....	58
8.5.1.2. Protéines fluorescentes.....	59
8.6. Principe de synthèse des sondes bioactivables.....	59
8.6.1. Types de réaction de conjugaison.....	61
8.6.1.1. Dérivés réactifs ciblant les fonctions amines primaires.....	61
8.6.1.2. Les dérivés réactifs au sulfhydryle (thiol).....	62
9. Les réactions enzymatiques (principes et méthodes d'analyse).....	65
9.1. Caractérisation des modèles de cinétiques enzymatiques.....	65
9.1.1. Modèle de base de la cinétique enzymatique.....	65
9.1.2. Modèle de cinétique Michaélienne	66
9.1.2.1. Influence de [E] sur la vitesse de la réaction enzymatique	68
9.1.3. Modèle de Briggs-Haldane	68
9.2. Mesure de l'activité enzymatique par la méthode de cinétique.....	69
10. Techniques d'analyse de l'activité protéasique en athérosclérose.....	69
10.1. Les techniques de zymographie	70
10.1.1. La technique de zymographie <i>in situ</i> (ISZ)	70
10.1.2. La technique de la zymographie sur gel	71
10.2. Les techniques <i>in vivo</i> par imagerie moléculaire fluorescente.....	72
10.2.1. Systèmes d'imagerie <i>in vivo</i> à fluorescence de type microscopique.....	73
10.2.2. Systèmes d'imagerie à fluorescence macroscopique	74

10.2.2.1. Systèmes d'imagerie de fluorescence par réflectance (IFR)	74
10.2.2.2. Systèmes d'imagerie de fluorescence tomographique.....	74
10.2.2.3. Systèmes d'imagerie tomographique divers.....	75
Objectifs du mémoire.....	77
Article	78
Contribution de l'étudiant.....	78
Development of a bioactivatable fluorescent probe for the study of the proteolytic activities degrading the apolipoprotein A-I <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	79
Abstract.....	80
1. Introduction	81
2. Experimental procedures	83
2.1. Animal model.....	83
2.2. Generation of apoA-I-Cy5.5 activatable probe.....	83
2.3. <i>In vitro</i> activation and characterization of apoA-I-Cy5.5 probe	84
2.4. <i>In situ</i> zymography.....	85
2.5. Hybrid FMT-MRI for <i>in vivo</i> imaging of apoA-I-Cy5.5 activation	85
2.6. <i>Ex vivo</i> imaging using apoA-I-Cy5.5 probe.....	86
2.7. Validation of <i>ex vivo</i> imaging results by confocal microscopy	86
2.8. Statistical analysis	86
3. Results	87
3.1. Generation of an apoA-I-Cy5.5 activatable probe	87
3.2. <i>In vitro</i> characterization and activation of the apoA-I-Cy5.5 probe by chymase	87
3.3. <i>In vitro</i> assessment of proteolytic activities using the apoA-I-Cy5.5 probe.....	91
3.4. <i>In vitro</i> measurement of proteolytic activities degrading the apoA-I-Cy5.5 probe	91
3.5. <i>In situ</i> detection of proteolytic activities degrading the apoA-I-Cy5.5 probe.....	97
3.6. <i>In vivo</i> and <i>ex vivo</i> detection of proteolytic activities degrading the apoA-I-Cy5.5 probe.....	99
4. Discussion.....	103
5. Conclusion	109
6. Acknowledgements	109
7. Funding.....	109

8. References.....	110
9. Supplementary figures.....	115
10. Supplementary methods	120
Discussion.....	126
Bibliographie.....	139
Annexe 1	159

Liste des tableaux

Tableau 1. Exemples de souris génétiquement modifiées utilisées en athérosclérose..	9
Tableau 2. Classification des familles de protéases.	11
Tableau 3. Les classes d'inhibiteurs des métalloprotéinases (MMPs).	12
Tableau 4. Classification des MMPs en fonction de leurs structures et leurs spécificités aux substrats.	15
Tableau 5. Classification et propriétés générales des protéases à sérines.	17
Tableau 6. Classes des protéases ayant la capacité de dégrader les composantes des particules HDL.	42
Tableau 7. Caractéristiques spectrales des fluorophores de la famille des cyanines.	58
Tableau 8. Corrélation entre la variation de l'activité protéolytique durant l'activation in vitro de la sonde apoA-I-Cy5.5 et la fluorescence totale émise à la fin de la réaction.	160

Liste des figures

Figure 1. Structure histologique des artères saines,	2
Figure 2. Les étapes de progression des lésions d'athéroscléroses.	6
Figure 3. Les modèles structuraux de l'apoA-I libre et associée aux particules HDL.	28
Figure 4. Représentation schématique de la voie du transport à rebours du cholestérol (RCT) et de l'efflux de cholestérol.	31
Figure 5. Fonctions athéroprotectrices des HDL.	34
Figure 6. Modèle montrant comment l'inactivation protéolytique de particules Pré- β -HDL et de l'apoA-I en athérosclérose peut affecter la fonction du transport inverse du cholestérol. ...	48
Figure 7. Schéma représentatif du diagramme de Jablonski.....	51
Figure 8. Le spectre électromagnétique de la lumière.	52
Figure 9. Les mécanismes d'inhibition de la fluorescence.....	54
Figure 10. Principaux fluorophores organiques.....	57
Figure 11. Principe de synthèse des sondes bioactivables.....	60
Figure 12. Type de groupements réactifs chimiques de synthèse.....	62
Figure 13. Types de réaction de conjugaison entre protéine et fluorophore.....	64
Figure 14. Illustration de la stratégie visant à développer des modèles de dosages d'activités enzymatiques.....	66
Figure 15. Modèle théorique pour les mesures des paramètres de cinétiques enzymatiques selon le modèle Michaélien.	67
Figure 16. Modèle théorique de l'impact de la concentration de l'enzyme sur la vitesse de la réaction enzymatique.	68
Figure 17. Exemple de techniques d'imagerie non invasives et invasives, à haute résolution pour l'analyse des lésions d'athéroscléroses.....	73
Figure 18. Profil de la dégradation de l'apoA-I (protéine native recombinante humaine) par l'activité protéolytique.....	159

Liste de sigles et abréviations

ABCA1: transporteur ABC de classe A de type 1

ABCG1: transporteur ABC de classe G de type 1

ACCELERATE: Assessment of Clinical Effects of Cholesteryl Ester Transfer Protein Inhibition with Evacetrapib in Patients at a High-Risk for Vascular Outcomes

ACE: enzyme de conversion de l'angiotensine I

ADP: adénosine diphosphate

AIM-HIGH: Atherothrombosis Intervention in Metabolic Syndrome With Low HDL/High Triglycerides: Impact on Global Health Outcomes

APC: cellules présentatrices d'antigène professionnelles

ApoA-I: apolipoprotéine A-I

ApoA-II: apolipoprotéines A-II

ApoA-IV: apolipoprotéines A-IV

ApoB: apolipoprotéine B

ApoB-100: apolipoprotéine B-100

ApoB-48: apolipoprotéine B-48

ApoBEC: apolipoprotein B mRNA editing enzyme

ApoC-I: apolipoprotéine C-I

ApoC-II: apolipoprotéine C-II

ApoC-III: apolipoprotéine C-III

ApoD: apolipoprotéine D

ApoE : apolipoprotéine E

ApoF: apolipoprotéine F

ApoH: apolipoprotéine H

ApoJ: apolipoprotéine J

Arg : arginine

ARNm: acide ribonucléique messenger

ASSURE: Synthèse Stimulation et Ultrasons intravasculaires pour Évaluation de la Régression de l'athérome des artères coronaires

ATP: adénosine triphosphate

ATX: souris athérosclérotique
BSA: albumine de sérum bovin
CAD : maladie coronarienne athérosclérotique
CCL-3: chemokine (C-C motif) ligand 3
CCL-5: chemokine (C-C motif) ligand 5
CD: cellules dendritiques
CD8+: cluster of differentiation type 8 positif
CETP: Cholesteryl ester transfer protein
CETP: protéine de transfert du cholestérol estérifié
CF: cathepsine F
CHI-SQUARE: Can HDL Infusions Significantly Quicken Atherosclerosis Regression
Cl-: ions chlorure
CMA: chymase mastocytaire
CMH-II: complexe d'immunohistocompatibilité de type II
CMMP: matrice métalloprotéinase de poulet
CMLV: cellule du muscle lisse vasculaire
COX: cyclo-oxygénase
CPA: carboxypeptidases A
CS: cathepsine S
CT: computed tomography
Cy5.5: cyanine de type 5.5
Cy5.5-NHS-ester: Cyanine-5.5-N-hydroxysuccinimides-esters
dal-OUTCOMES: clinical trial of effects of dalcetrapib in patients with a recent acute coronary
DPPI: dipeptidyl peptidase de type I
DTC: dispositifs à transfert de charge
E: Enzyme
EC: Cellules endothéliales
ECM: Matrice extracellulaire
eNOS : oxyde nitrique synthétase endothéliale
ERASE: Effect of Reconstituted HDL on Atherosclerosis Safety and Efficacy

ES : Complexe Enzyme Substrat
E-sélectine: Sélectine endothéliales
ETC-642: Esperion Therapeutics C-642
FGF: facteurs de croissance des fibroblastes
FITC: Isothiocyanate de fluorescéine
FMT: fluorescent molecular tomography
FRET : Transfert d'énergie par résonance de type Förster
GFP : Protéine fluorescente verte
GM-CSF : Facteur de stimulation de colonie des granulocytes/macrophages
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HDL : lipoprotéines de haute densité
HDL-C : Cholestérol associé aux HDL
His: histidine
HL: lipase hépatique
HMG-CoA: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HPS2: THRIVE: Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events
HUVEC : Cellules endothéliales ombilicale vasculaires humaine
ICAM-1: molécule d'adhésion intercellulaire 1
i-CETP: inhibiteur de la CETP
ICG: indocyanine green
IFR: imagerie de fluorescence par réflectance
IgE: immunoglobulines de type E
IGF-BP: insulin-like growth factor binding protein
IGF-BP: protéine de liaison des facteurs de type insulinique
IL-1: interleukine-1
ILLUMINATE: Study Examining Torcetrapib/Atorvastatin And Atorvastatin. Effects On Clinical Cardiovascular Events In Patients With Heart Disease
IR: Infrarouge
IRM: imagerie par résonance magnétique
ISZ: zymographie in situ
IVUS: sonde d'imagerie intravasculaire par ultrasons

Kcat: constante catalytique
Km: constante de Michaelis
LCAT: lécithine cholestérol acyle transférase
LDL: lipoprotéines à faible densité
LDL-C: cholestérol associé aux lipoprotéines à faible densité
LDLr: récepteur de lipoprotéine à faible densité
LPL: lipoprotéine lipase
LPO: lipoxygénase
Lys: lysine
mAC: anticorps monoclonal
MCP-1: peptide chimiottractant de monocyte 1
M-CSF: facteur de stimulation de colonie des macrophages
MIC: microscopie confocale intravitale
mMCP-4: mouse mastcell chymase protease 4
MMI: microscopie multiphotonique intravitale
MMP: matrice métalloprotéinase
MPO: myéloperoxydase
MT-1-MMP: métalloprotéinase transmembranaire de type 1
NADPH : nicotinamide-adénine-dinucléotide phosphate
NE: neutrophile élastase
N-fMLP: N-formylméthionyl-leucyl phénylalanine
NH₂: fonction amine
NHS-ester: N-hydroxysuccinimides-ester
NK: Cellules tueuses naturelles
NIRF: Near infrared fluorescence
NO: monoxyde d'azote
OCT: Tomographie par cohérence optique
OH⁻: anions hydroxyl
ONOO⁻: peroxydinitrite
oxLDL: LDL oxydées
P: produit

P2Y12: purinergic receptor P2Y, G protein coupled, 13
P2Y13: purinergic receptor P2Y, G protein coupled, 13
PAF-AH: acétylhydrolase du facteur d'activation des plaquettes
PAR-1: proteinase activated receptor-1
PCR: réaction en chaîne par polymérase
PDGF: facteur de croissance dérivé des plaquettes
PET: Positron-emission tomography
Phe: phénylalanine
PLTP: protéine plasmatique de transfert des phospholipides
PMA: Phorbol myristate acétate
pm-ApoA-I: peptide mimétique de l'apoA-I
PMN: polymorphonucléaire
PON-1: paraoxonase de type 1
P-sélectine : Sélectine Plaquettaires
RCT: transport à rebours du cholestérol
r-HDL: HDL reconstitué
ROS: espèces réactives à l'oxygène
RT-qPCR: PCR quantitative en temps réel
RVX: Resverlogix
S: substrat
SAA: sérum amyloïde A
SANS: Small Angle Neutron Scattering
Ser: sérine
SH: sulfhydryle
SBS : sonde basé sur le substrat
SBA: sonde basé sur l'activité
SPECT: single photon emission computed tomography
sPLA2: Phospholipase A2 sécrétée
SR-BI: récepteur éboueur de classe BI
TDM: tomodensitométrie
TEMP: tomoscintigraphie par émission monophotonique

TEP: tomographie par émission de positrons
TGF- β 1: facteur de croissance tumorale de type β 1
TIMP-1: inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinase de type 1
TIMP-2: inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinase de type 2
TIMP-3: inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinase de type 3
TIMP-4: inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinase de type 4
TMF Tomographie moléculaire de fluorescence
TNF- α : facteur de nécrose tumorale α
TODF: tomographie optique diffuse de fluorescence
t-PA: activateur du plasminogène tissulaire
TRITC: tétraméthyl rhodamine isothiocyanate
u-PA: plasminogène de type urokinase
UV: ultraviolet
 V_0 : vitesse initiale
VCAM-1: molécules d'adhésion des cellules vasculaires de type 1
VEGF: facteur vasculaire de croissance endothélial
VLDL: lipoprotéines à très faible densité en lipoprotéine
XMMP: métalloprotéinase du xenopus
XO: xantin
Zn: ion zinc

*À ma chère famille, mon père, ma mère, mon
frère et ma sœur ainsi que ma tendre conjointe
pour le support dans ce travail.*

Remerciements

En premier, je tiens à remercier mon superviseur direct, le Docteur Éric Rhéaume qui a joué un rôle primordial pendant toutes les étapes de ma maîtrise, pour m'appuyer et me montrer le bon chemin pour la réalisation du projet. Sa vision, sa patience et surtout ses conseils m'ont beaucoup appris sur le projet mais aussi sur ma personne et m'ont permis de réaliser ce projet dans les meilleures circonstances, avec une excellente expertise et un bon esprit scientifique. Également, je remercie mon directeur de recherche le Docteur Jean-Claude Tardif de nous avoir transmis sa passion et son expérience en recherche, ainsi que pour son soutien et son aide à la réalisation de cette étude.

Un grand merci à l'ensemble des membres du laboratoire pour leur encouragement et leur soutien au cours de ma maîtrise et plus particulièrement à Walid, Mathieu, Daniel Mélanie et Téodora, Gèneviève et Gabriel pour leur aide et leur implication directe dans le projet. Je remercie Dr David Rhainds pour ses conseils et aussi son intérêt pour le projet. Je n'oublie surtout pas de remercier Dr Frédérique Lesage et Dr Baoqiang Li qui m'ont aussi directement aidé et appuyé dans la réalisation de la partie imagerie du projet.

Et les plus grands remerciements vont à ma famille, ma mère et mon père, ma sœur Amira, mon frère Mouhamed et ma conjointe Mathilde, pour leur grand appui et leur infini soutien tout au long de mes études.

Introduction

1. L'athérosclérose

1.1. Facteurs de risque

L'athérosclérose, tirée du mot grec 'sclerosis' qui veut dire durcissement et 'athere' qui signifie gruaux (accumulation de lipide), est une maladie multifactorielle impliquant l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux[1]. Elle est la principale cause de décès dans le monde occidental. Les facteurs de risques associés à cette maladie sont nombreux, tels le niveau de cholestérol, l'obésité, la pression artérielle, le diabète, la sédentarité, le stress mental, le tabagisme et la consommation accrue d'alcool, qui sont généralement des facteurs attribués en grande partie à notre hygiène de vie et peuvent donc être contrôlables. Par contre, les réactions inflammatoires, la résistance à l'insuline, l'intolérance au glucose, le stress oxydatif, l'oxydation des lipides, l'hypertrophie ventriculaire et l'hypertension constituent des facteurs de risques qui nécessitent une prévention thérapeutique et peuvent donc ultimement être modifiables. Finalement, le sexe, l'âge et l'origine raciale sont des facteurs de risques qui sont incontrôlables et pas clairement compris mais qui expliquent statistiquement pourquoi certaines personnes plus que d'autres développent l'athérosclérose. Par exemple, les hommes sont plus à risque versus les femmes comme les caucasiens le sont versus les noirs [2, 3]. La complexité de l'athérosclérose revient au fait de l'interaction entre les différents facteurs de risques qui l'engendrent. Par exemple, il subsiste une corrélation directe entre la complication des effets de l'hypertension artérielle sur le syndrome coronarien et l'augmentation des niveaux de cholestérol et donc ces deux facteurs de risques ne sont pas totalement indépendants[4].

1.2. Progression et événements moléculaires

1.2.1. Histologies des artères.

La paroi d'une artère normale est formée de trois tuniques tissulaires : l'intima, la média et l'adventicia (Figure 1). L'intima regroupe l'endothélium et l'espace sous endothélial et une limitante élastique interne qui détermine la frontière entre l'intima et la média. La média regroupe une couche de cellules musculaires lisses ainsi qu'une limitante élastique

externe qui la sépare de la dernière couche tissulaire, l'adventicia, qui est un tissu conjonctif, joue un rôle important dans l'apport des nutriments et de l'oxygène aux cellules constituant l'artère, via un réseau de capillaires local nommé le *vasa vasorum* [5].

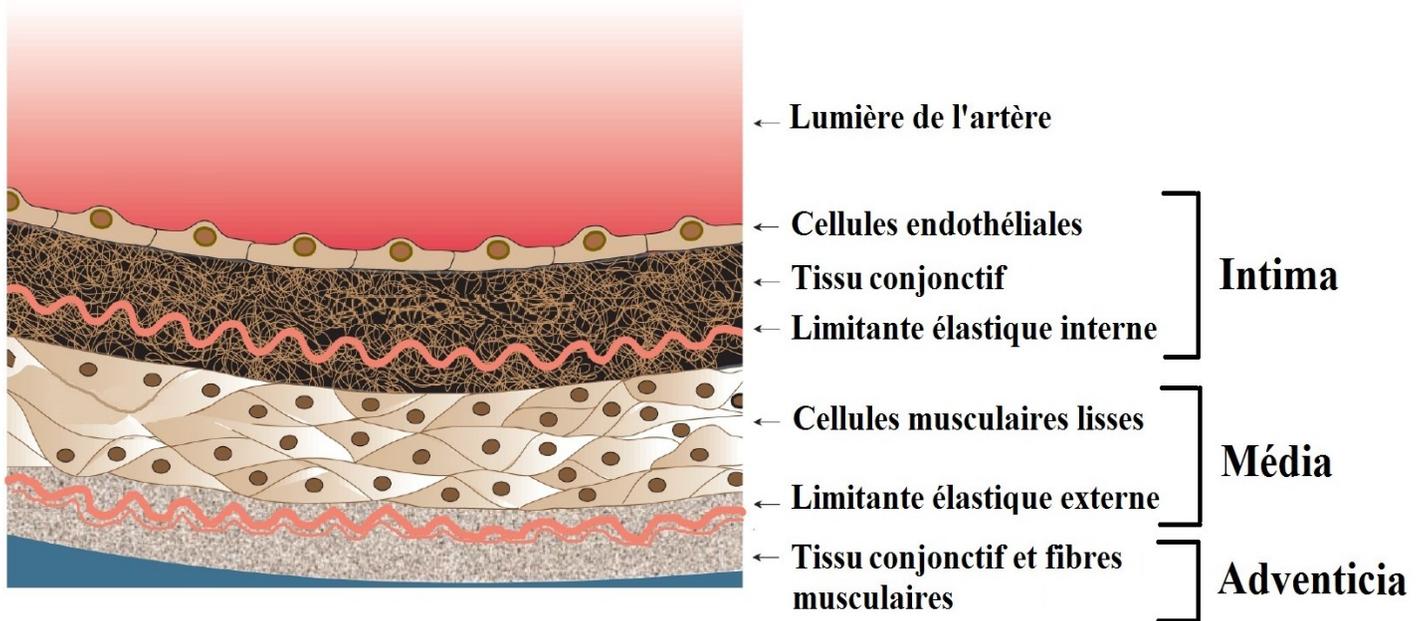


Figure 1. Structure histologique des artères saines, modifié de [6]

1.2.2. Initiation de la lésion d'athérome

L'athérosclérose peut commencer très tôt dans la vie comme le montre certaines études sur des modèles d'hypercholestérolémie maternelle (humain et souris) qui était associée à une formation de stries lipidiques dans les artères de leur fœtus et potentiellement le début de développement de lésions d'athérosclérose [7, 8]. Ces lésions commenceraient au niveau de l'aorte pour s'accélérer durant l'enfance et atteindre les artères coronaires puis les artères cérébrales plus tardivement. Elles sont plus susceptibles à se développer au niveau des points de connections des artères, contrairement aux parties proximales où le développement des plaques est moins fréquent [9, 10]. Ce phénomène est surtout lié à la perméabilité importante des cellules endothéliales de Au cours de la vie, certaines de ces lésions régressent tandis que formes polygonales bordant les artères au niveau des embranchements [11, 12].d'autres vont se compliquer.

La progression de l'athérosclérose se fait à travers plusieurs étapes évolutives et successives (Figure 2) qui se caractérisent par la formation d'une strie lipidique, des lésions fibreuses et des réactions inflammatoires complexes [13-15]. Ces étapes font intervenir différents acteurs jouant un rôle central dans la formation de la plaque d'athérome, dont les plus importants sont: les lipoprotéines de faible densité (LDL) et quatre types cellulaires: les cellules endothéliales (*EC*), les macrophages, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et les lymphocytes [16, 17].

La quantité de cholestérol associé aux LDL (LDL-C) circulant est un élément déterminant et initiateur de la formation des plaques d'athérosclérose [2,18,19]. L'augmentation du LDL-C circulant va causer une accumulation; par diffusion passive à travers les jonctions endothéliales (Figure 2), des particules de LDL au niveau de la matrice sous-endothéliale de l'intima [20, 21]. Cette phase d'infiltration lipidique est facilitée par les interactions entre les protéoglycanes de la matrice sous-endothéliale et l'apolipoprotéine B (apoB); le constituant protéique majeur des LDL [22, 23]. En plus des LDL, d'autres lipoprotéines contenant de l'apoB nommées lipoprotéines (a), peuvent aussi s'accumuler au niveau de l'intima et participer dans la formation de la plaque d'athérome [24-26].

Suite à ces événements, les particules de LDL accumulées dans l'espace intimal vont subir différentes modifications, par exemple, de type oxydatives, qui peuvent impliquer des mécanismes enzymatiques (ex: MPO) [27, 28] et non enzymatiques (ex: ROS) [29] ou de type protéolytique impliquant certains types de protéases comme la chymase et la cathepsine S [30]. L'oxydation des LDL leur procure un caractère athérogène indispensable à la formation de la plaque [31]. En effet, dans un premier temps, l'activation des macrophages dans la paroi vasculaire semble être liée à la présence de LDL oxydées. Dans un deuxième temps, les LDL oxydées causent la libération de cytokines pro-inflammatoires; par exemple, l'interleukine-1 (IL-1) par les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les leucocytes résidentes dans l'intima [32].

1.2.3. Recrutement et transformation des cellules inflammatoires

L'endothélium normal est très sélectif envers les particules qui peuvent le traverser, mais aussi envers les cellules qui peuvent s'y adhérer et l'infiltrer [33-36]. Cependant, l'activation ou la dysfonction endothéliale qui peut être causée, entre autres, par les LDL

oxydées durant les premières phases de la progression de l'athérosclérose fait en sorte que les monocytes circulant vont s'infiltrer vers l'espace intimal via la surface de l'endothélium après s'y être adhérents à celui-ci [37] (Figure 2).

L'étape d'adhésion des monocytes à l'endothélium sera possible par le biais de l'interaction des ligands de la famille des intégrines exprimés à la surface des monocytes avec les molécules d'adhésion des cellules vasculaires de type 1 (VCAM-1 : *vascular cell adhesion molecule*) ou ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*), E-sélectine et P-sélectine, exprimées à la surface des cellules endothéliales (Figure 2). Après s'être adhérents, les monocytes pénètrent dans l'espace sous-endothélial où ils vont se différencier en macrophages et proliférer [38-40]. Ces étapes sont sous le contrôle de plusieurs facteurs sécrétés par les cellules endothéliales et musculaires lisses localement activées, entre autres, par les LDL oxydées, comme la chémokine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) nécessaire à l'infiltration [41, 42] et le facteur de stimulation de colonie des macrophages M-CSF (*monocyte-colony stimulating factor*) nécessaire à la différenciation et la prolifération des macrophages. Les macrophages ainsi différenciés vont ensuite se transformer en cellules dites spumeuses en captant les LDL oxydées par l'intermédiaire de leurs récepteurs « scavengers » [43-45].

Entre temps et sous l'influence du M-CSF, mais aussi du facteur de stimulation de colonie des granulocytes/macrophages (GM-CSF), les macrophages vont entretenir des réactions inflammatoires chroniques qui joueront un rôle capital dans la croissance de la plaque; un véritable phénomène d'auto-amplification caractérisé par la production d'autres types de cytokines inflammatoires comme le TNF-alpha, des chémokines, O_2^- , les ROS, des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF) et aussi différentes protéases appartenant à plusieurs types de familles de protéases comme les métalloprotéinases (MMP), les cystéines protéinases et les protéinases à sérines [1, 46-48]. Ces événements auront un rôle important, notamment dans la dysfonction endothéliale, le remodelage de la matrice extracellulaire, le recrutement et l'accumulation d'autres cellules inflammatoires (leucocytes) ainsi que la migration des cellules musculaires lisses depuis la média vers l'intima à travers la limitante élastique interne [1, 49].

Les cellules musculaires lisses, présentes alors dans l'intima, vont être responsables, avec les macrophages et les cellules fibroblastes, de l'accumulation de la matrice

extracellulaire riche en collagène, élastine et protéoglycanes et aura un impact important sur la croissance de la plaque athéromateuse (fibrose) [1, 50, 51].

1.2.4. Formation de la chape fibreuse et stabilisation de la plaque

Durant les premiers stades de la progression de la plaque athéromateuse, les lipides captés (cholestérol modifié, ex 7-cétocholestérol ou cholestérol oxydé) par les macrophages sont essentiellement intracellulaires [52]. Puis, au fur et à mesure que la plaque gagne en densité (cellulaire et matricielle), ces lipides vont apparaître dans le milieu extracellulaire, l'apoptose des cellules gorgées de lipides sera un des phénomènes responsables de cette transition [53, 54]. À ce stade, un amas nommé cœur lipidique se formera [52, 55]. Le cœur lipidique sera alors enrobé par les cellules musculaires lisses migrantes et va être isolé de la lumière vasculaire. C'est ainsi que la chape fibreuse se forme et sera composée essentiellement de cellules musculaires lisses mais aussi de protéines de la matrice extracellulaire [50] (Figure 2). L'intégrité de la chape fibreuse est un facteur déterminant de la stabilité des plaques d'athérosclérose mais aussi caractérise l'âge de la plaque [56, 57] (Figure 2).

1.2.5. Complication de la plaque et incidents associés

Au tout début de la progression de la plaque, un mécanisme compensatoire faisant intervenir un remodelage vasculaire se met en place afin de maintenir le flux sanguin à l'état normal [49, 58]. Toutefois, ce mécanisme ne sera plus efficace avec le temps. Ceci est dû à la sévérité de la plaque qui progresse et à une réduction de la lumière de l'artère perturbant ainsi le flux sanguin ce qui peut, entre autres, perturber sérieusement la fonction cardiaque.

Aussi, une fragilisation de la chape fibreuse qui peut être le résultat d'une augmentation de l'activité des protéases présentes dans la plaque peut mener vers une rupture de celle-ci [59, 60], déversant alors son contenu directement dans le sang, ce qui va induire le phénomène de thrombose qui impliquera les plaquettes et le système de coagulation [61, 62]. Ces phénomènes finissent, souvent par une artère bloquée. Les risques qui en découleront seront alors; en fonction de la position de la plaque; soit l'infarctus du myocarde soit l'accident cérébro-vasculaire (ACV) [63].

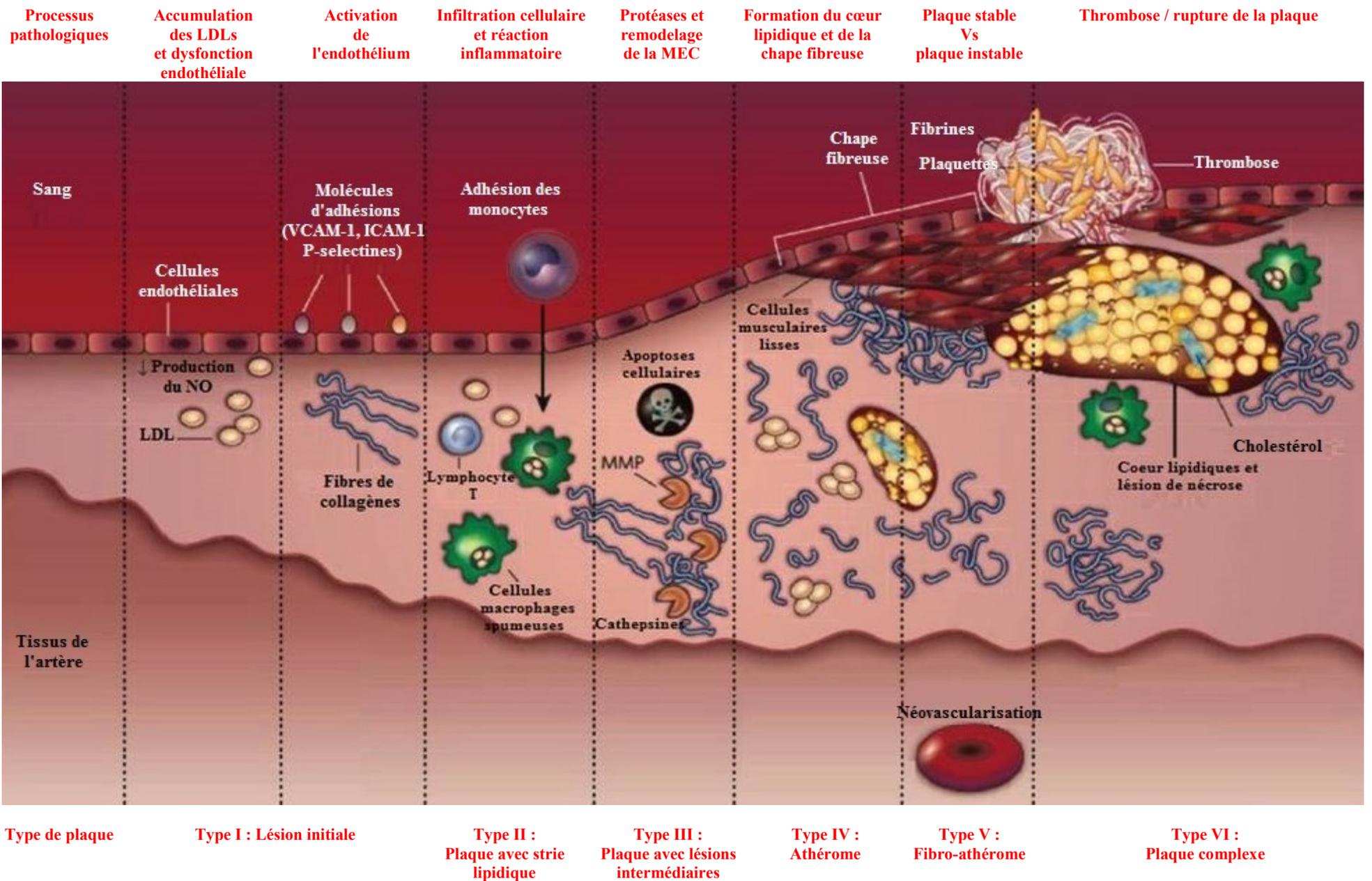


Figure 2. Les étapes de progression des lésions d'athéroscléroses. Adapté de [64]

1.3. Modèle animal d'athérosclérose

Les premiers modèles expérimentaux pour l'étude de l'athérosclérose sont apparus il y a près d'un siècle. Depuis, des progrès importants ont été réalisés dans leur développement pour l'induction des lésions athérosclérotiques, y compris les rongeurs (souris, rats, hamsters, lapins et cochons d'inde), des modèles aviaires (poules, pigeons), porc, les carnivores (chiens, chats), et les primates non humains [65]. Les limites et les avantages de chaque modèle animal ont été bien décrits [65, 66]. La survenue de modèles transgéniques et d'inactivation génique ont en plus amélioré grandement notre compréhension scientifique sur la progression de l'athérosclérose, notamment par la caractérisation de mécanismes de l'athérosclérose autres que le cholestérol plasmatique tels que l'implication de l'inflammation, le stress oxydatif et d'autres facteurs émergents [65, 67, 68].

Pour notre étude, présentée dans ce mémoire, nous nous sommes concentrés davantage sur l'utilisation d'un modèle d'athérosclérose de souris, plus spécifiquement les souris athérosclérotiques (ATX) qui sont décrites plus loin dans cette section.

1.3.1. Souris *ApoE*^{-/-}:

Les souris *ApoE*^{-/-} sont déficientes pour le gène de l'apolipoprotéine E (*ApoE*). L'apoE est une lipoprotéine qui compose les particules de très faible densité en cholestérol (VLDL) et des chylomicrons. Par son interaction avec le récepteur cellulaire des LDL (LDLr), elle permet la captation et la clairance des particules lipidiques au niveau hépatique par les hépatocytes. L'absence de cette protéine cause donc une élévation marquée du niveau de cholestérol plasmatique. Ce modèle animal a été utilisé intensivement dans les études d'athérosclérose, en raison du type de lésions que ces souris développent sous une diète riche en gras. En effet, dès l'âge de 10 semaines, des lésions d'inflammation et d'accumulation lipidique vasculaire peuvent être observées. L'ajout des diètes riches en gras dans ce modèle permet, entre autres, le développement de lésions athérosclérotiques complexes et sévères [69-71] (Tableau 1).

1.3.2. Souris ATX (*Ldlr*^{-/-} *APOB*^{+/+})

Chez l'homme, l'hypercholestérolémie familiale est une pathologie résultante d'une mutation au niveau du récepteur à LDL (LDLr) et se traduit souvent par des lésions

d'athérosclérose sévères. Les souris ATX transgéniques (Tableau 1), représentent un bon modèle d'hypercholestérolémie familiale et par conséquent, très utilisées comme modèle d'étude en athérosclérose. Ceci est expliqué par leur déficience pour le gène du *Ldlr* et donc n'expriment pas ce récepteur à la surface cellulaire qui, normalement, permet la clairance des particules LDL par les cellules qui métabolisent le cholestérol, principalement les hépatocytes [69]. D'une manière générale, les souris normales sont résistantes au développement de lésions athéromateuses. Ceci est expliqué par la présence de l'isoforme d'apolipoprotéine B dite apoB-48 sur leurs particules LDL, ce qui leur permet d'éliminer les excès de LDL cholestérol circulant par des voies indépendantes au récepteur à LDL. Chez l'humain on ne retrouve que l'isoforme apoB-100 sur les particules LDL [72]. Cette apoB-100 joue un rôle majeur dans la synthèse des particules de LDL et leur interaction avec le LDLr pour leur captation cellulaire. La surexpression de l'ApoB-100 humaine chez les souris ATX transgéniques augmente la synthèse de LDL par le foie et par conséquent, la combinaison du phénotype LDLr^{-/-} ; apoB^{+/+} permet d'atteindre des niveaux pathologiques de LDL circulant, surpassant les capacités de clairance induite par l'apoB-48 endogène [71, 73].

Les souris ATX se distinguent par le développement de lésions athéromateuses sous une diète standard qui s'amplifie et se complexifie sous une diète riche en gras [70]. Ces lésions peuvent apparaître progressivement dès 4 mois d'âge au niveau de l'aorte et deviennent très évidentes à partir de 6 mois avec une détection d'activité des protéases impliquées dans le développement de ces lésions. Ceci représente un important avantage et justifie notre intérêt pour ce modèle comparativement au modèle ApoE^{-/-}. Bien que les souris ApoE^{-/-} soient très utilisées et développent des lésions athéromateuses sévères sous une diète riche en gras; leur plus grand désavantage est que les lésions développées sont davantage causées par des niveaux élevés de VLDL (lipoprotéines de très faible densité en cholestérol mais riches en triglycérides) plutôt que de LDL, ce qui n'est pas tout à fait conforme au phénotype des patients atteints d'hypercholestérolémie [67, 73].

Souches animales	Caractéristiques des modèles	Références
Ldlr^{-/-}	Clairance des LDL diminuée Hypercholestérolémie Développe l'athérosclérose	(1 et 2)
apoE^{-/-}	Hypercholestérolémie Hypertriglycéridémie Développe l'athérosclérose	(3)
apoE Leiden (E3L)	Portent un transgène humain muté (apoE3) Hypercholestérolémie induite sous HG. Risque d'athérosclérose accru	(4)
apoB100 x Ldlr^{-/-}	Sévèrement hypercholestérolémique Athérosclérose sévère	(5)
apoBEC-1^{-/-} x Ldlr^{-/-}	Sévère hypercholestérolémie et des lésions d'athérosclérose (apoBEC : enzyme qui contrôle l'ARNm de l'apoB100)	(6)
apoA-I^{-/-}	HDL diminués Athérosclérose faible	(7)

Tableau 1. Exemples de souris génétiquement modifiées utilisées en athérosclérose.
Adapté de [74]. Correspondance des références : (1, 2): [73, 75], (3): [76], (4): [77], (5): [73], (6): [78], (7): [79].

2. Protéases et athérosclérose

Tel que discuté auparavant dans l'introduction sur l'athérosclérose, les protéases sécrétées par les cellules inflammatoires localisées dans la plaque athéromateuse, jouent un rôle primordial durant les phases de progression de la plaque, soit durant les premières étapes de l'apparition des lésions ou encore pendant les phases chroniques. Aussi, les protéases auront un rôle majeur quant à l'intégrité de la plaque et vont être souvent responsables des étapes de complication de la plaque allant jusqu'à la rupture de la chape fibreuse menant à la thrombose[80]. C'est ce que nous allons voir plus en détail dans cette section dédiée aux principales protéases impliquées dans les lésions d'athérosclérose.

2.1. Les classes de protéases et leurs structures

Le séquençage du génome humain montre que plus de 2% des gènes humains expriment des protéases ou des inhibiteurs de protéases, ce qui indique leur importance dans la biologie humaine [81]. Le dégradome humain est constitué d'au moins 561 gènes de protéases et de leurs homologues. Il existe 5 grands types de protéases classées selon leur mécanisme d'action ou l'acide aminé impliqué au site actif et ainsi on retrouve 186 gènes pour les métalloprotéases, 178 pour les protéases à sérine, 21 pour les protéases à aspartate, 148 pour les protéases à cystéine et 28 pour les protéases à thréonine [82]. Selon le Comité de l'Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire, les protéases sont distribuées, soit comme endo-peptidases ou exo-peptidases, dans différentes familles selon des critères de structures tridimensionnelles, spécificité de substrat, la nature du site actif et le mécanisme catalytique, le pH optimal et la nature de leurs séquences en acides aminés (protéases acides, neutres ou alcalines), la température optimale et des profils de stabilité responsables entre autres de leur nature d'activité. Elles peuvent aussi être classées selon leurs critères d'évolution et leurs sources (animales, végétales, microbiennes incluant bactériennes et fongiques). Suivant cette nomenclature, on classe les protéases dans le sous-groupe des enzymes de type hydrolases, soit: les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les métallo-protéinases et les protéases à aspartate (Tableau 2) [83].

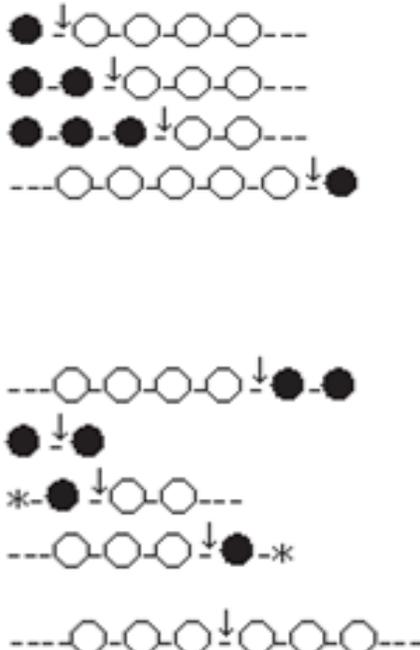
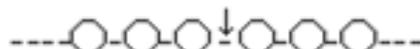
Classes	Mode d'action catalytique
Exopeptidases Amino-peptidases Dipeptidyl peptidase Tripeptidyl peptidase Carboxypeptidases Types protéases à sérine Types métalloprotéinases Types protéases à cystéine Peptidyle dipeptidase Dipeptidase Oméga peptidases	 <p>The diagram shows several examples of exopeptidase action:</p> <ul style="list-style-type: none"> Amino-peptidases: Three examples showing the removal of one, two, or three amino acids from the N-terminus of a chain. Carboxypeptidases: Two examples showing the removal of amino acids from the C-terminus. One shows a terminal amino acid being removed, and the other shows a blocked C-terminus (marked with an asterisk) being removed. Peptidyle dipeptidase: An example showing the removal of a dipeptide from the C-terminus. Dipeptidase: An example showing the removal of a dipeptide from the N-terminus. Oméga peptidases: An example showing the removal of an amino acid from the C-terminus of a chain with a blocked end.
Endopeptidases Protéases à sérine Protéases à cystéine Protéases à aspartate Les métalloprotéinases	 <p>The diagram shows an endopeptidase acting on a polypeptide chain by cleaving it at an internal site, indicated by a downward arrow between two amino acids.</p>

Tableau 2. Classification des familles de protéases. Les cercles vides représentent des résidus d'acides aminés dans la chaîne polypeptidique. Les cercles pleins indiquent les acides aminés terminaux, et les astérisques signifient les terminaisons qui sont bloquées. Les flèches indiquent les sites d'action de l'enzyme. Adapté de [83]

2.1.1. Les métalloprotéinases (MMPs)

Les métalloprotéinases matricielles (matrixines ou MMP) font partie de la famille des endopeptidases [84]. Elles sont structurellement et fonctionnellement apparentées [85]. Les MMP sont collectivement capables de dégrader presque toutes les composantes de la matrice extracellulaire tels que les collagènes (I, II, III, IV...), la gélatine (collagène dénaturé), les protéoglycanes, la fibronectine, les laminines, l'élastine et autres, mais peuvent aussi cliver de nombreuses protéines non-matricielles, comme des facteurs de croissance et des ligands [86]. Toutes les MMP sont synthétisées sous la forme de prépro-enzymes et sont activées lors de leur transport à la surface cellulaire ou après la sécrétion. Les MMPs activées sont généralement constituées d'un domaine catalytique de 170 résidus N-terminaux liés de façon covalente et connectés à un domaine C-terminal de 195 résidus analogue à l'hémopexine [87].

Le critère qui caractérise le plus les MMP c'est la présence d'un ion zinc (Zn^{2+}) au niveau de leur site catalytique [88, 89]. Elles sont inhibées par des inhibiteurs non spécifiques comme les $\alpha_{1,2}$ macroglobulines et par des inhibiteurs spécifiques d'origine tissulaire appelés TIMPs (pour « Tissue Inhibitor of Metalloproteinases » ou inhibiteurs tissulaires de métalloprotéinase) [89]. Quatre types (TIMP-1 à 4) sont connus et chaque type de TIMP est spécifique à un groupe de MMP [89, 90] (Tableau 3).

Inhibiteurs	Protéases ciblées
TIMP-1	Toutes les MMPs sauf la MMP-2 et la MT-1 MMP
TIMP-2	La plupart des MMP sauf la MMP-9
TIMP-3	MMP-1, -2, -3, -9 et -13
TIMP-4	MMP-1, -3, -7, et -9
$\alpha 2$ Macroglobuline	Toutes les protéases (MMP, sérine, cystéine et aspartique)
$\alpha 1$ Macroglobuline	MMP-1

Tableau 3. Les classes d'inhibiteurs des métalloprotéinases (MMPs). Adapté de [89] Selon leurs propriétés structurelles et fonctionnelles, on connaît actuellement au moins 22 MMP humaines [91] qui forment 6 sous-familles (Voir le Tableau 4) :

1. Les matrilysines (MMP-7, 23 et 26) qui sont dépourvues du domaine analogue à l'hémopexine. Ce dernier est remplacé par un domaine riche en cystéines dans les cas de la MMP-7 et MMP-26 et par un domaine analogue aux immunoglobulines, en ce qui concerne la MMP-23 [92, 93].
2. Les collagénases (MMP-1, 8, 13 et 18) capables de dégrader les collagènes interstitiels triple-hélice de type I et III, en raison de leur domaine hémopexine [92, 94].
3. Les gélatinases A et B (MMP-2, -9, respectivement) possédant une insertion supplémentaire de trois motifs de 58 résidus répétés dans leur domaine catalytique formant ainsi un domaine analogue à la fibronectine de type II. Ce dernier est important pour la reconnaissance et la dégradation de la gélatine (collagène dénaturé) [87, 92].
4. Les stromélysines 1 et 2 (MMP-3, -10); elles ressemblent beaucoup aux groupes des collagénases sur le plan structural. Cependant, aucune de ces protéases n'est capable de dégrader le collagène de type I et II. Elles sont aussi impliquées dans l'activation d'autre MMP (MMP-1 et MMP-9) [90, 95].
5. Les MMP transmembranaires (MT1-MMP à MT6-MMP) sont les seuls types de MMP qui sont liées à la membrane plasmique cellulaire grâce à leur domaine hydrophobe transmembranaire en position C-terminal [95, 96]. Elles sont capables de dégrader plusieurs substrats incluant des composantes de la matrice extracellulaire (collagènes I, II et III, caséines, protéoglycans, fibronectines et autres), certains facteurs de croissance, etc [92]. Outre leur rôle dans la dégradation directe de la matrice extracellulaire, ces MMP interviennent aussi dans l'activation protéolytique d'autres MMP, en particulier la MT1-MMP qui est l'un des activateurs principaux de la MMP-2 [91].
6. Le dernier groupe est hétérogène et comprend la MMP-11, MMP-12, MMP-19, MMP-20 et MMP-28 dont les substrats et les rôles exacts sont encore mal connus [91, 97, 98]. L'une d'entre elles, La MMP-12 pour laquelle nous portons un grand intérêt dans cette étude, est essentiellement sécrétée par les macrophages et connue surtout sous le nom de macrophage métalloélastase. La MMP-12 se caractérise par sa capacité de dégrader plusieurs substrats qui composent la matrice extracellulaire et plus particulièrement l'élastine. Le caractère particulier de la MMP-12 est sa capacité de s'auto-activer par autocatalyse durant laquelle il y aura perte de son domaine hémopexine (nécessaire à son interaction avec l'élastine) mais qui ne lui fait pas perdre sa capacité élastinolytique. Outre

l'élastine, la MMP-12 est très active contre des composantes de la membrane basale comme les fibronectines, les laminines, ainsi que les protéoglycanes et le collagène de type IV, d'où son importance dans la capacité des macrophages à s'infiltrer et migrer à travers la membrane basale et la matrice extracellulaire [99, 100].

Classe	Numéros	Classe selon structure	Substrats
Collagénases			
Collagénase 1 (interstitiel)	MMP-1	Simple domaine analogue à l'hémopexine	Collagènes (I–III, VII, VIII, and X), gélatine, les agrécans, L-sélectine IL-1 β , protéoglycans, entactine, ovostatine, MMP-2, MMP-9
Collagénase 2 (neutrophile)	MMP-8	Simple domaine analogue à l'hémopexine	Collagènes (I–III, V, VII, VIII, and X), gélatine, les agrécans, fibronectine
Collagénase 3	MMP-13	Simple domaine analogue à l'hémopexine	Collagènes (I–IV, IX, X, and XIV), gélatine, plasminogène, les agrécans perlécane, fibronectine, ostéonectine, MMP-9
Collagénase 4 (<i>Xenopus</i>)	MMP-18	Simple domaine analogue à l'hémopexine	Collagène (I)
Gélatinases			
Gélatinase A	MMP-2	Domaine de liaison à la gélatine	Gélatine, collagène (IV–VI, X), élastine, fibronectine, laminine
Gélatinase B	MMP-9	Domaine de liaison à la gélatine	Collagènes (IV, V, VII, X, and XIV), gélatine, entactine, les agrécans élastine, fibronectine, ostéonectine, plasminogène, MBP, IL-1 β
Stromélysines			
Stromélysine 1	MMP-3	Simple domaine analogue à l'hémopexine	Collagènes (III–V, and IX), gélatine, les agrécans, perlécane, décorine laminine, élastine, Caséine, ostéonectin, ovostatine, entactine, plasminogène IL-1 β , MMP-2/TIMP-2, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-13
Stromélysine 2	MMP-10	Simple domaine analogue à l'hémopexine	Collagènes (III–V), gélatine, caséine, les agrécans, élastine, MMP-1, MMP-8
MMP Transmembranaires (MT-MMP)			
MT1-MMP	MMP-14	Domaine transmembranaire	Collagènes (I–III), gélatine, Caséine, fibronectine, laminine, vitronectine, entactine, protéoglycans, MMP-2, MMP-13
MT2-MMP	MMP-15	Domaine transmembranaire	Fibronectine, entactine, laminine, les agrécans, perlécans, MMP-2
MT3-MMP	MMP-16	Domaine transmembranaire	Collagen III, gélatine, Caséine, fibronectine, MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	Domaine glycosylphosphatidylinositol (GPI)	Inconnus
MT5-MMP	MMP-24	Domaine transmembranaire	Fibronectine, mais pas le collagène de type I ou les laminines
MMP divers			
Matrilysine (PUMP)	MMP-7	Structure minimale (pas de domaine spécifique)	Collagènes (IV, X), gélatine, les agrécans, décorine, fibronectine, laminine élastine, caséine, transferrine, plasminogène, β 4-intégrine, MMP-1, MMP-2 MMP-9, MMP-9/TIMP-1
Matrilysine 2	MMP-26	Structure minimale (pas de domaine spécifique)	Collagène (IV), fibronectine, fibrinogène, gélatine, α 1-protéinase inhibiteur
Stromélysine 3	MMP-11	Domaine furine	Collagène (IV), gélatine, fibronectine, laminine, les agrécans α 1-protéinase inhibiteur, α 2-macroglobuline
Metalloélastase	MMP-12	Simple domaine analogue à l'hémopexine	Collagène (IV), gélatine, élastine, caséine, fibronectine, vitronectine, laminine entactine, fibrinogène, fibrine, plasminogène
	MMP-19	Simple domaine analogue à l'hémopexine	collagène (I), gélatine, ténascine C, les agrécans
Enamelysine	MMP-20	Simple domaine analogue à l'hémopexine	Amélogénine, les agrécans
XMMP (xenopus)	MMP-21	Domaine analogue à la vitronectine	Inconnus
CMMP (poulet)	MMP-22	Simple domaine analogue à l'hémopexine	Caséine, gélatine
	MMP-23	Domaine transmembranaire de type II	Autoprotéolyse (pro-MMP23)
Epilysine	MMP-28	Domaine furine	Inconnus

Tableau 4. Classification des MMPs en fonction de leurs structures et leurs spécificités aux substrats. Adapté de [84, 101]

2.1.1.1. Rôle physiologique des MMP

Les MMP sont surtout impliquées dans les processus de remodelage du tissu conjonctif associés au développement embryonnaire, la grossesse, la croissance et la guérison des plaies. Elles peuvent aussi intervenir sans doute dans d'autres fonctions ; par exemple, elles peuvent moduler l'activité de certains facteurs de croissance (ex: FGF, IGF-BP) [102, 103]. Cependant, l'augmentation en quantité et en activité des MMP combinée avec toute perturbation de l'équilibre général avec leurs inhibiteurs physiologiques (TIMP), peuvent engendrer l'apparition de situations pathologiques comme la polyarthrite rhumatoïde et l'arthrose, l'athérosclérose, la croissance tumorale, les métastases, l'emphysème, la fibrose et d'autres pathologies liées aux métalloprotéinases [84, 86, 101].

2.1.1.2. Rôle des MMP en athérosclérose

Au court de la progression de la plaque athéromateuse, nous notons une augmentation de l'expression et de l'activité de nombreuses MMP dont la source provient essentiellement des cellules macrophages infiltrées dans la plaque ainsi que des cellules résidentes comme les cellules endothéliales, les CMLV et les fibroblastes [104, 105]. La principale cause de cette dérégulation dans l'expression des MMP reste mal interprétée, mais des évidences mettant en jeu des médiateurs pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1, les radicaux libres et les LDL oxydées ainsi que la perte de l'équilibre entre les TIMP et la quantité de MMP présentes [80]. Les MMP vont contribuer dès les premiers stades de la progression de l'athérosclérose à travers des mécanismes complexes [106].

Le remodelage contrôlé de la matrice extracellulaire par les MMP, favorise non seulement l'infiltration des cellules monocytes, mais aussi la migration des CMLV. D'ailleurs, des études ont montré que les fragments libérés par la dégradation des laminines de type 5 (une composante de la lame basale sous endothéliale) par la MMP-2, stimulent la migration et l'infiltration cellulaire dans la plaque [107, 108]. Un autre exemple concernant la MMP-1 qui va favoriser la croissance et l'invasion des cellules macrophages et des CMLV en se liant à leur récepteur PAR-1 (proteinase activated receptor-1) [109]. De plus, les souris déficientes en MMP-2, -9, -12 et 8 ont montré une diminution significative des phénomènes d'infiltration et de migration cellulaires dans la plaque [80, 110]. Les MMP comme la MMP-2, 9, 13 et 14

peuvent causer également la libération et l'activation des facteurs de croissance liés au protéoglycane de la matrice extracellulaire, tels que le facteur de croissance tissulaire β (TGF- β) et le facteur vasculaire de croissance endothélial (VEGF). L'augmentation de la biodisponibilité de ces facteurs peut influencer la néovascularisation au niveau de la plaque ou encore la fibrose par accumulation des fibres de collagènes produites par les cellules fibroblastes et CMLV en réponse à ces facteurs de croissance [80].

Par ailleurs, il existe un certain paradoxe quant aux effets des MMPs et qui pourrait expliquer que certaines MMP sont pro-athérotrombotiques et d'autres protectrices. Par exemple, l'impact de la migration des CMLV va contribuer à la formation de la chape fibreuse qui est une étape importante dans la stabilisation de la plaque. D'ailleurs, le phénotype des plaques chez des souris déficientes en MMP-9 et MMP-3 était de type instable contrairement à celui observé chez des souris déficientes en MMP-12 [111]. L'instabilité de la plaque pourrait évoluer jusqu'à la rupture avec des conséquences graves comme la thrombose. D'autres rôles peuvent être attribués aux MMPs dans l'athérosclérose, parmi eux : la promotion de l'apoptose cellulaire, les lésions hémorragiques et de calcification dans les cas de plaque complexe [100].

2.1.2. Les protéases à sérines

Le nom de la famille sérine protéase provient du résidu nucléophile sérine situé dans le site actif de la protéase et qui est stabilisé par les résidus asparagine et histidine pour former la triade catalytique (Asp, His, Ser) responsable de l'attaque nucléophile du fragment carbonyle de la liaison peptidique du substrat afin de former un intermédiaire acyl-enzyme [112]. Beaucoup de sérine protéases emploient un mécanisme de dyade simple où les lysines ou histidines sont jumelées avec la sérine au niveau du site catalytique. D'autres utilisent seulement une paire de résidus histidines combinés avec une sérine nucléophile [113, 114]. Les sérines-protéases sont généralement des endopeptidases. Elles catalysent l'hydrolyse de la liaison peptidique dans le milieu d'une chaîne polypeptidique. Généralement, les protéases à sérines sont synthétisées en pro-enzyme, leur activation nécessite le clivage d'un peptide signal [115]. Barrett et ses collègues ont mis au point un système de classification (base de données MEROPS) basé sur des similitudes dans l'ordre et la structure de toutes les enzymes protéolytiques connues. Selon la classification avec cette base de données, la famille des

protéases à sérines est la plus abondante et la plus diversifiée fonctionnellement de toutes les familles de protéases et est largement distribuée dans la nature et trouvée dans tous les règnes de la vie cellulaire ainsi que de nombreux génomes viraux [116]. La famille des protéases à sérines comprend un tiers de toutes les enzymes protéolytiques connues et regroupe 13 clans et 40 familles (Tableau 5). Le clan des protéases à sérines PA est le plus important. Il regroupe au moins 301 membres de protéases à sérine dont la spécificité pour le substrat est très diversifié [114]. Selon leur spécificité au substrat, les protéases à sérines les plus abondantes sont les protéases de type trypsine et analogues aux trypsines ainsi que les chymotrypsines et les analogues aux chymotrypsines. Respectivement, leurs cibles sont généralement déterminées par la nature de l'acide aminé en position dite P1 du substrat où elles favorisent le clivage des résidus chargés positivement comme les Lys/Arg et des résidus hydrophobes aromatiques comme la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane [114].

Clan	Nombre de Famille	Membre représentatif	Résidus catalytiques	Spécificité primaire (P1)
PA	12 (301 membres)	Trypsine/chymotrypsine	His, Asp, Ser	A, E, F, G, K, Q, R, W, Y
SB	2 (91 membres)	Subtilisine	Asp, His, Ser	F, W, Y
SC	2 (64 membres)	Prolyl oligopeptidase	Ser, Asp, His	G, P
SE	6 (16 membres)	D-alanine carboxypeptidase A	Ser, Lys	D-A
SF	3 (24 membres)	LexA peptidase	Ser, Lys/His	A
SH	2 (7 membres)	Cytomégalovirus assembleine	His, Ser, His	A
SJ	1	Lon peptidase	Ser, Lys	K, L, M, R, S
SK	2 (14 membres)	Clp peptidase	Ser, His, Asp	A
SP	3	Nucléoporine	His, Ser	F
SQ	1	Amino peptidase DmpA	Ser	A, G, K, R
SR	1	Lactoferrine	Lys, Ser	K,R
SS	1	L,D-carboxypeptidase	Ser, Glu, His	K
ST	5	Rhomboïde	His, Ser	D,E

Tableau 5. Classification et propriétés générales des protéases à sérines. Plusieurs membres de chaque clan peuvent donner lieu à une grande variété de spécificités primaires, tel que documenté par les clans PA, SJ, et SQ. Adapté de [114, 115]

Vu le nombre important de protéases à sérines, nous avons limité notre étude aux membres des familles ayant un impact important dans les maladies cardiovasculaires comme la famille des protéases à sérines analogues à la chymotrypsine.

2.1.2.1. Rôle physiologique des protéases à sérines Les protéases à sérines peuvent être trouvées partout dans la nature, chez les eucaryotes, les procaryotes, les virus et les archées, ce qui explique leur rôle physiologique important. Les protéases de type chymotrypsine et trypsine sont impliquées dans de nombreux procédés physiologiques critiques, y compris: la digestion des protéines alimentaires par l'activation des enzymes digestives (trypsine) [117], l'hémostase, la transduction du signal d'apoptose (granzymes), la croissance et la différenciation cellulaire (kallikréine), la reproduction, et la réponse immunitaire (chymase, tryptase, neutrophile élastase, les granzymes, etc.) [118, 119]. Aussi, les cascades de l'activation séquentielle des protéases à sérines entraînent la coagulation du sang, la fixation du complément, et la fibrinolyse [119]. Les protéases à sérines sont aussi impliquées dans la régulation de la pression sanguine via la génération de l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I (chymase) [120, 121]. D'autres actions des protéases à sérines semblent être impliquées dans le développement, le remodelage physiologique de la matrice extra cellulaire, et des mécanismes impliqués dans la guérison des plaies.

D'une manière plus spécifique, certaines des protéases à sérines sont associées à des fonctions physiologiques primordiales au sein du système immunitaire. Pour n'en citer que quelques-unes, les chymases (CMA), les tryptases, les carboxypeptidases A (CPA) des cellules mastocytaires ainsi que les neutrophiles élastases (NE) exprimées entre autres par les cellules neutrophiles, les monocytes, les éosinophiles et les cellules mastocytaires [119]. Notamment le rôle de la CPA dans la dégradation et la clairance de certains peptides toxiques comme l'endothéline 1, exprimée en grande quantité lors des infections bactériennes [122]. Le rôle dans la défense antiparasitaire de l'hôte par la tryptase et la chymase associées par exemple au infections par le *Trichinella spiralis* ou le *Nippostrongylus brasiliensis*, respectivement [119]. Les actions antibactériennes par la tryptase, la chymase et la NE, comme par exemple contre les infections intrapéritonéale de la *Klebsiella pneumoniae* (Tryptase) [119].

De plus, un rôle protecteur est joué par la chymase dans la limitation des réactions allergiques via la dégradation des immunoglobulines de type E (IgE) mais aussi des réactions inflammatoires des voies respiratoires, dont rapportent en 2009 Ida *Waern* et ses collègues dans leur étude concernant la mMCP-4 (la chymase de souris homologue à la chymase humaine) [123, 124]. Les chymases par leur capacité à dégrader plusieurs types de cytokines et chemokines pro-inflammatoires (ex: IL-5, IL-6, IL-13, CCL3 et CCL5) et la NE (IL-6, IL-8, TNF- α ..), ont une action régulatrice via l'inactivation des réactions inflammatoires [125, 126].

Le maintien de l'homéostasie tissulaire est un phénomène primordial, ainsi la chymase, la tryptase et la NE y jouent un rôle important via le recyclage des fibres de fibronectine d'une façon directe ou encore indirecte via leur capacité dans l'activation de plusieurs membres de la famille des MMP, qui participent dans le remodelage physiologique des tissus [127].

2.1.2.2. Rôle des protéases à sérines en athérosclérose

Au cours de la progression de la plaque athéromateuse, nous notons une augmentation de l'expression et de l'activité de nombreuses protéases à sérines, dont la source provient essentiellement des cellules neutrophiles, mastocytaires et des cellules tueuses naturelles (NK) infiltrées dans la plaque [110].

Les protéases à sérines les plus étudiées dans l'athérosclérose appartiennent à la cascade fibrinolytique, où l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) et l'activateur du plasminogène tissulaire (t-PA) activent le plasminogène en plasmine qui, à son tour, dégrade la fibrine et ainsi jouent un rôle majeur dans les réactions de fibrinolyse [110]. Cependant, dans les tissus d'aortes athérosclérotiques, le tPA et l'uPA sont synthétisés dans la couche de l'intima par les cellules CMLV et les cellules spumeuses dérivées des macrophages et celles localisées au niveau du noyau nécrotique [128]. L'augmentation de la tPA et uPA dans la plaque, est associée au processus de l'angiogénèse et donc la néovascularisation au sein de la plaque. Les protéases à sérines jouent aussi un rôle important dans le remodelage de la matrice extracellulaire via la dégradation de ces différentes composantes comme par la plasmine, qui contrairement à certains MMP, ne dégrade pas directement les constituants de la matrice extracellulaire comme le collagène ou la gélatine, mais peut dégrader les laminines, la fibronectine et les protéoglycanes [80]. Les chymases et les tryptases peuvent dégrader le

collagène de type IV et la fibronectine et activer également les MMP (MMP-1, -2 et -9) ce qui amplifie le processus de remodelage de l'ECM [129]. D'autres peuvent dégrader les fibres d'élastine comme les neutrophiles élastase et la protéinase-3 pour faciliter les mouvements des cellules neutrophiles, par exemple, et probablement aussi la migration des cellules CMLV. La NE peut aussi avoir un impact dans la progression de la plaque via l'activation des MMP et l'inactivation du TIMP-1 [130].

L'une des protéases à sérines ayant un impact des plus importants quant à la progression de la plaque athéroscléreuse est la chymase mastocytaire. La chymase serait impliquée dans une panoplie d'événements, l'un des plus important est la potentialisation de l'accumulation des particules LDL (modifiées ou non) au sein de la matrice extracellulaire de l'intima. En effet, des études ont montré que la chymase avait la capacité de dégrader les particules LDL liées à la matrice extracellulaire. Cette action conduit à une modification des LDL qui augmente leur capacité d'ancrage au protéoglycane de la matrice extracellulaire et ainsi la promotion du caractère pro-athérogène des particules LDL [30, 131].

La chymase est aussi impliquée dans l'activation de la pro-MMP-9 et du TGF- β qui peut être associé aux lésions de fibrose durant la progression de la plaque athéromateuse [132, 133]. Elle joue aussi un rôle important dans la promotion et l'activation des cytokines pro-inflammatoires (ex l'IL-1 β), des chémokines et dans la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II. La chymase est aussi capable de modifier le métabolisme lipidique et d'endommager la matrice extracellulaire [134].

À l'état physiologique, le rôle de la chymase au niveau cardiaque est mal connu. Par contre, à l'état pathologique, elle peut être sécrétée et avoir des effets importants sur le cœur. Ceci a été très bien documenté dans les modèles animaux de cardiomyopathie, d'hypertension et d'infarctus du myocarde, où l'ARNm et l'activité de la chymase étaient augmentés dans le cœur. Ces observations ont porté l'intérêt de cibler la chymase par des inhibiteurs spécifiques et ont montré que cela pourrait être bénéfique dans le traitement des maladies cardiaques ainsi que dans la stabilisation de la plaque. Par ailleurs, des modèles animaux d'athérosclérose traités avec des inhibiteurs de chymase ou encore des stabilisateurs des cellules mastocytaires, ont montré une diminution de la taille de la plaque avec une meilleure stabilisation et une baisse des lésions hémorragiques intra-plaque [134, 135].

2.1.3. Les protéases à cystéines

Les protéases à cystéines sont présentes dans tous les organismes vivants. Jusqu'à présent, au moins 21 familles ont été découvertes, dont la moitié est exprimé chez les virus [136]. Les protéases à cystéines peuvent aussi être regroupées au sein de deux superfamilles: la superfamille d'enzymes de conversion de l'interleukine-1 β (ICE), et la superfamille des papaïnes qui comprend le groupe des calpaïnes protéases (cytoplasmique) et le groupe des analogues à la papaïne qui contient entre autres, les papaïnes protéases et les cathepsines protéases (endosomales/lysosomales). On compte plusieurs différences évolutives et structurelles importantes qui distinguent les deux superfamilles, et cela malgré le fait que chaque superfamille de ces enzymes emploie la dyade histidine/cystéine au niveau de leur site actif pour l'attaque nucléophile de la liaison peptidique au niveau de son substrat. Toutefois, au sein de la superfamille des papaïnes, la seule différence marquante se trouve entre le groupe des calpaïnes et les papaïnes, qui consiste à la dépendance au calcium des calpaïnes pour leurs activités catalytiques [137, 138]. Dans ce chapitre nous ne discuterons que de la famille des cystéines protéases de types cathepsines.

Chez les mammifères et les humains, les protéases à cystéines les plus importantes sont les calpaïnes cytoplasmiques et les cathepsines lysosomales. Onze cathepsines sont exprimées au sein du génome humain (les cathepsines B, L, K, S, V, F, W, H, X, C et O) dont la plupart sont des endopeptidases et quelques-unes des exopeptidases comme c'est le cas pour la cathepsine C [139]. Toutefois, le génome de la souris contient dix orthologues de cathepsines humaines, à défaut de la cathepsine V, et huit cathepsines supplémentaires dans le placenta. Ce qui fait des souris un bon modèle animal pour générer des knock-out pour les cathepsines protéases afin d'analyser les fonctions *in vivo* de ces protéases [140, 141].

La synthèse des cathepsines se fait toujours sous forme pré-pro-enzymes. Après l'élimination de leur peptide signal, pendant le passage dans le réticulum endoplasmique, la pro-enzyme est glycosylée et subit une protéolyse de son pro-peptide pour être activée. Le pro-peptide agit comme un échafaudage, son repliement sur le domaine catalytique fait en sorte de maintenir la protéase dans un état non actif; il agit aussi comme une protéine chaperon impliquée dans le transport de la pro-enzyme vers les compartiments endosomal et lysosomal [142].

Les protéases à cystéines de type cathepsines ont besoin, pour leur activité optimale, d'un environnement réducteur avec un pH légèrement acide (comme celui des compartiments endosomal/lysosomal) et sont pour la plupart instables à un pH neutre. Lorsque les cathepsines sont en dehors du lysosome ou dans le milieu extracellulaire, elles peuvent être rapidement inactivées d'une façon irréversible à pH neutre. Une exception concerne la cathepsine S, qui est stable à un pH proche de la neutralité (6,5 à 7), et conserve ainsi la majeure partie de son activité [142, 143].

L'activation des cathepsines se fait via différents mécanismes allant de l'autocatalyse à l'implication d'autres familles de protéases; par exemple, les cathepsines endopeptidases, telles que les cathepsines B, K, L et S, peuvent être activées de manière autocatalytique ou par d'autres protéases telles que la cathepsine D (sérine protéase) et la pepsine, alors que les exopeptidases telle que la cathepsine C exigent d'autres protéases, y compris des membres de la famille des cathepsines endopeptidases, pour leur activation [144]. Il existe plusieurs inhibiteurs endogènes qui ciblent et régulent l'activité des cathepsines protéases, les plus connus sont les cystatines (type I ou stéfines, type II ou cystatines et type III ou kininogènes) et les tyropines ainsi que d'autres types qui sont généralement analogues à ceux cités ici [136].

2.1.3.1. Rôle physiologique des protéases à cystéines

La majorité des cathepsines telles que les cathepsines B, H, L, C, X, F, O et V, sont exprimées de manière ubiquitaire dans les tissus humains au sein des compartiments lysosomaux des cellules [145]. On a longtemps associé la localisation lysosomale des cathepsines à une fonction de recyclage et de dégradation des protéines cellulaires normales pour leurs renouvellements. Aujourd'hui, il est bien établi que les cathepsines participent à de nombreuses fonctions spécifiques, importantes pour les procédés physiologiques, tels que la présentation des antigènes du CMH-II, le remodelage physiologique des os, la différenciation des kératinocytes, l'activation des prohormones, l'angiogénèse, la réponse immunitaire, le développement embryonnaire et autres. Les cathepsines sont aussi impliquées dans de nombreux mécanismes et processus normaux de signalisation cellulaire et de remodelage physiologique de la matrice extracellulaire [137, 143]. En revanche, d'autres cathepsines telles que les cathepsines K, W et S sont exprimées d'une manière plus contrôlée et spécifique au type de cellules et type de tissu qui les exprime, ce qui leur procure des rôles plus

spécifiques [145]. Par exemple, la cathepsine K est fortement exprimée dans les ostéoclastes, dans la plupart des cellules épithéliales et elle est la seule enzyme pour laquelle un rôle essentiel dans la résorption osseuse a été attribué chez les souris et les humains [146, 147]. La cathepsine W est principalement exprimée dans les lymphocytes CD8⁺ et les cellules tueuses naturelles (NK) ce qui suggère un rôle dans la réponse immunitaire [148]. La cathepsine C est également exprimée dans les cellules liées au système immunitaire. La fonction de la cathepsine C (DPPI) est probablement l'activation des diverses protéines précurseurs telles que les zymogènes, mais aussi l'activation d'autres protéases comme des protéases à sérines (chymase) et des granzymes [149, 150].

La cathepsine S est principalement exprimée par les macrophages mais aussi dans les cellules présentatrices d'antigène professionnelles (APC), comme les cellules dendritiques (CD) et les cellules lymphocytes B et joue un rôle primordial dans le traitement et la présentation de l'antigène [151].

Des études récentes ont montré que les cathepsines actives sont également localisées dans d'autres compartiments cellulaires autres que le lysosome/endosome, tels que le noyau, le cytoplasme et la membrane plasmique. Comme entre autres, le cas de la cathepsine L et F, qui par leur localisation nucléaire suggèrent un rôle dans la régulation des histones et dans la progression du cycle cellulaire, ouvrant ainsi un nouveau rôle pour ces protéases [152, 153].

2.1.3.2. Rôle des protéases à cystéines en athérosclérose

Les protéases à cystéines de type cathepsines contribuent significativement à la progression des maladies cardio-vasculaires comprenant l'athérosclérose, la formation de néointima et d'anévrismes et cela à travers de processus telles que la dégradation des composantes de l'ECM, l'altération du métabolisme lipidique, la promotion de l'inflammation et de l'apoptose cellulaires [138]. Cependant, elles interviennent aussi dans d'autres conditions pathologiques, y compris le cancer, le remodelage osseux pathologique et les pathologies neurologiques et des voies respiratoires [143]. La conséquence de la dégradation des composantes de l'ECM est surtout provoquée par l'activité élastinolytique et collagénolytique (collagène II, IX, XI) des cathepsines K, V, S, F, B, L [142]. L'intérêt à comprendre l'implication de ces protéases en athérosclérose a mis en avant plusieurs études sur leur profil

d'expression en ARNm et en protéines. L'expression des cathepsines augmente significativement surtout dans les cellules macrophages, CMLV et EC, dans les modèles d'athéroscléroses expérimentaux (souris apoE^{-/-}) et chez l'humain [154, 155].

Plusieurs études confirment ces observations surtout en ce qui concerne les cathepsines K, V, L, B et S [156]. Par ailleurs, dans les modèles de souris sous une diète riche en lipides (ApoE^{-/-} et Ldlr^{-/-}) et déficientes pour le gène de la cathepsine S ou K, une réduction de la surface de la plaque d'athérome de 60 et 42 %, respectivement, accompagnée d'une amélioration de la stabilité de la plaque, ont été rapportées. Ces résultats ont été associés à une diminution de la dégradation de l'ECM, à une réduction de la teneur en lipides et des macrophages, mais ils sont aussi associés à une augmentation des voies de signalisation du TGF-β [157, 158]. Également, les modèles expérimentaux d'athérosclérose avec une déficience de la cystatine C (inhibiteurs de cathepsines) montrent des effets opposés sur la taille de la plaque d'athérome et la dégradation des fibres d'élastines [159]. Ce qui montre le rôle important joué par les protéases de cette famille dans la progression de l'athérosclérose.

D'autres mécanismes impliquent les cathepsines en athérosclérose. En effet, il a été montré que l'augmentation et l'accumulation des niveaux de LDL oxydés au sein de la plaque, conduisent à l'endommagement de la membrane des lysosomes au sein des cellules macrophages, essentiellement après leur captation par ces dernières. Ce processus a pour conséquence de déplacer les cathepsines du lysosome vers le cytoplasme qui peuvent être ainsi responsables directement ou indirectement de l'activation des voies cellulaires de l'apoptose au sein de la plaque [160, 161]. Finalement, des études *in vitro* ont montré que la cathepsine F recombinante possède la capacité de dégrader l'apoB-100, ce qui suggère un rôle dans l'altération des voies de clairance des particules LDL qui peut avoir un impact négatif sur la progression de l'athérosclérose [162].

3. Métabolisme et fonction des lipoprotéines de haute densité

3.1. Le cholestérol

Le cholestérol est un composant essentiel des membranes cellulaires et un précurseur des acides biliaires et des hormones stéroïdiennes. Les cellules peuvent le synthétiser *de novo* dans le foie, ou l'extraire du milieu exogène, représenté par l'alimentation et/ou par la

réabsorption via les entérocytes au cours de la voie entéro-hépatique. Le cholestérol sous forme libre ou estérifié n'est pas soluble dans l'eau; il est essentiellement associé à des triacylglycérols sur des particules cargos, les lipoprotéines plasmatiques [163].

3.2. Les transporteurs du cholestérol (lipoprotéines)

Les cellules ne peuvent pas décomposer le cholestérol, elles ne peuvent que le modifier, par exemple en ester de cholestérol, ou le transporter grâce à des transporteurs spécialisés. Le transport du cholestérol dans l'organisme est pris en charge par les lipoprotéines. Les lipoprotéines sont des particules sphériques de tailles variables. Elles sont composées d'un noyau de lipides apolaires (esters de cholestérols et triglycérides) entouré d'une couche de surface de phospholipides qui permet leur solubilité plasmatique. Sur la surface des lipoprotéines, les phospholipides sont associés à des molécules de cholestérol libre et de protéines : les apolipoprotéines. Les apolipoprotéines sont responsables des interactions entre les lipoprotéines et des enzymes plasmatiques ou des récepteurs membranaires. Les lipoprotéines sont caractérisées par leur densité qui reflète le rapport protéine/lipide (plus ce dernier est élevé et plus la lipoprotéine est dense) ainsi que par la nature de la (ou des) apolipoprotéine (s) qui les compose(nt) [164]. Le rôle des différentes lipoprotéines a pu être caractérisé.

Les chylomicrons sont les particules les plus grosses en taille, les moins denses, les plus riches en lipides et les plus pauvres en apolipoprotéines. Les chylomicrons sont impliqués dans le transport du cholestérol et des triglycérides alimentaires vers les tissus adipeux et musculaires. Les lipoprotéines à faible et à très faible densité respectivement (LDL et VLDL) sont en charge du transport antérograde du cholestérol entre le foie et les tissus périphériques et les lipoprotéines de haute densité (HDL) qui assurent le transport rétrograde du cholestérol des tissus périphériques vers le foie dans une voie appelée le « transport inverse du cholestérol » [165]. Les lipoprotéines interagissent entre elles dans plusieurs contextes

complexes et variés. Nous allons nous concentrer sur les particules de HDL qui sont impliquées dans le transport inverse du cholestérol et dans l'athérosclérose.

3.3. Structure et classification des lipoprotéines de haute densité

Les HDL sont des lipoprotéines de taille moléculaire comprise entre 5 à 12 nm, composés essentiellement d'apolipoprotéines, de lipides chargés et de lipides neutres. Au moins sept apolipoprotéines (APO) composent les HDL dont l'apoA-I (70%), l'apoA-II (20%) et plus faiblement l'apoA-IV, E, CI, CII et CIII [166]. On retrouve aussi des enzymes importantes associées aux HDL, pour le transport inverse du cholestérol, comme la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT), la protéine plasmatique de transfert des phospholipides (PLTP), la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP), ainsi que d'autres protéines comme l'apoD, apoF, apoH, et l'apoJ, le sérum amyloïde A (SAA), la paraoxonase (PON-1) et la protéine de liaison des lipopolysaccharides [167]. Deux sous-population majeures composent les HDL, les α -HDL et les pré β -HDL [168]. Les α -HDL ont une structure globulaire et sont divisées en trois sous-classes selon un ordre croissant de taille : HDL₃, HDL_{2a}, HDL_{2b}. Les pré β -HDL, qui contiennent 4 à 14% de l'apo-AI plasmatique, ont une structure discoïdale, constituée d'une ou de deux molécules d'apo-AI associées à des phospholipides et au cholestérol. Les pré β -HDL sont les accepteurs initiaux du cholestérol cellulaire et sont aussi sous-divisées en trois sous-classes selon un ordre de taille croissant de 1 à 3 [169].

3.3.1. Caractérisation de la composante majeure des HDL (l'apoA-I)

L'apoA-I est la composante protéique structurelle et fonctionnelle majeure des HDL. Dans sa forme mature, l'apoA-I est une protéine de 243 acides aminés avec un poids moléculaire de 28 kDa. L'apoA-I est constituée principalement de segments répétitifs de 11 et 22 acides aminés regroupés en 10 hélices α amphipathiques, espacées par des résidus de proline. La mobilité conformationnelle des hélices α joue un rôle primordial dans la formation et la taille des particules HDL [170]. Des études portant sur l'analyse structurelle et fonctionnelle de l'apoA-I, suggèrent que la région comprenant les hélices 5 et 6 (entre les résidus 99 et 143) régule la conformation soluble ou liée aux lipides de l'apoA-I [170]. La région C-terminale de l'apoA-I (résidus au-delà de la position 187) est la région avec la plus

forte affinité pour les lipides et constitue un site important pour l'ancrage de l'apoA-I à la particule de HDL ainsi que dans l'induction de l'efflux de cholestérol à partir des transporteurs ABCA-1. D'autres actions de l'apoA-I sont associées à sa fonction au sein des HDL, notamment par son rôle dans l'activation de la LCAT. Les régions entre les résidus 150 et 180 de l'apoA-I, surtout la tyrosine 166, sont impliquées dans cette fonction [171].

3.3.2. Les modèles structuraux de l'apoA-I libre et associée aux HDL

La compréhension des modèles structuraux de l'apoA-I peut constituer un point important dans l'intégration des rôles qui impliquent les protéases dans la fonction des HDL. Plusieurs études ont suggéré qu'à partir de deux molécules d'apoA-I on commence à observer différentes organisations structurales de la protéine, ainsi plusieurs modèles d'organisation des apolipoprotéines A-I ont été proposés. Le modèle le plus célèbre est celui de la double ceinture (double belt), qui a été proposé en se basant sur des données cristallographiques et de diffraction des rayons X. Dans ce modèle, l'apoA-I y serait arrangé sous forme de deux torsades antiparallèles (Figure 3) [172, 173]. Basé sur des techniques de transfert d'énergie par résonance, le modèle des piquets de clôture (*picket fence*) autour d'une bicouche de phospholipides, a été proposé ensuite [174]. Toutefois, il a été rapporté que des particules de HDL discoïdales pouvaient être composées de 3 molécules d'apoA-I, ce qui ne correspondait pas avec les données du modèle de la double ceinture qui accommode seulement 2 molécules d'apoA-I. Un troisième modèle a ainsi été proposé, celui de l'épingle à cheveux où 2 molécules d'apoA-I adopteraient une structure en épingle à cheveux. Le point intéressant au sein de ces différents modèles, c'est l'orientation de certaines régions de l'apoA-I, où dépendamment de la nature des acides aminés qui composent ces régions, on a pu décrire parfois la formation de plusieurs boucles exposées saillantes [175].

3.3.2.1. Modèle en super-hélice double des HDL naissantes

Les nouvelles applications techniques comme la technique du SANS (*Small Angle Neutron Scattering*) ont été profitables pour décrire l'organisation de l'apoA-I sur les particules de pré β -HDL (HDL naissantes). Les résultats obtenus décrivent une forme hélicoïdale ouverte de l'apoA-I enroulé autour d'un ellipsoïde central de lipide (Figure 3). C'est le modèle de la double super-hélice antiparallèle enroulé autour d'un ellipsoïde de lipide. Ce nouveau modèle

suggère un arrangement structural inattendu de la protéine et des lipides dans les HDL naissantes [176].

3.3.2.2. Modèle solar-flares des HDL discoïdales naissantes

L'utilisation de la spectrométrie de masse à échange d'hydrogène-deutérium, a permis de décrire un autre modèle structural. Ce dernier implique deux molécules d'apoA-I disposées dans une structure de double-ceinture antiparallèles (Figure 3). Toutefois, ce modèle décrit aussi la conformation des résidus 159-180 de chaque apoA-I qui forme une boucle exposée saillante [175]. Au sein de cette boucle, la position Tyr166 de l'apoA-I sera ensuite bien décrite comme étant une cible attrayante pour des modifications d'oxydation spécifique, au cours de la progression de l'athérosclérose [177].

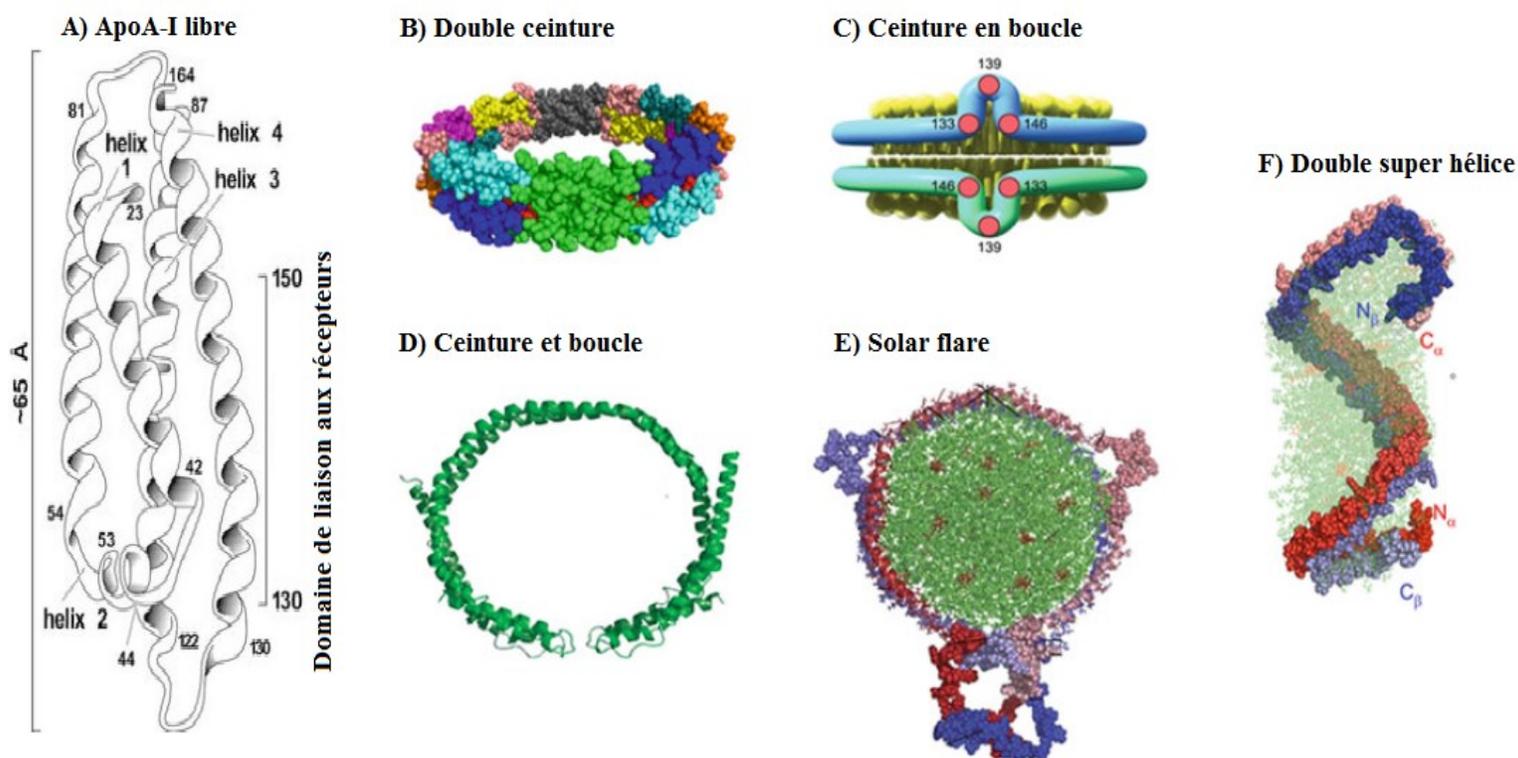


Figure 3. Les modèles structuraux de l'apoA-I libre et associée aux particules HDL. Adapté de [173, 175, 176].

3.4. Le transport à rebours du cholestérol (RCT)

Le métabolisme des lipoprotéines est axé sur trois voies principales, la voie entéro-hépatique qui permet le transfert des lipides de l'intestin vers le foie, la voie d'apport du cholestérol qui assure le transport centrifuge des lipides du foie vers les tissus périphériques et finalement la voie du transport à rebours du cholestérol (*Reverse Cholesterol Transport*, RCT), permettant le transport centripète du cholestérol des tissus périphériques vers le foie. Cette dernière voie permet de maintenir un équilibre de distribution du cholestérol, susceptible d'être en excès dans les tissus périphériques [178]. Les HDL sont les joueurs centraux de cette voie métabolique, ce qui leur attribue un rôle central en ce qui concerne les pathologies comme l'athérosclérose. Le transport à rebours du cholestérol s'effectue sur plusieurs étapes, l'efflux à partir des cellules des tissus périphériques suivis de l'acheminement du cholestérol vers le foie pour son excrétion dans les sels biliaires (Figure 4). Ces deux étapes se caractérisent par un remaniement continu des particules HDL, aussi connu sous le nom de remodelage des particules HDL [179].

3.4.1. Efflux du cholestérol cellulaire : étape 1 du RCT

Les pré β -HDL sont les accepteurs initiaux du cholestérol cellulaire. Elles sont produites soit directement à partir de la lipidation de l'apoA-I synthétisée par les hépatocytes et les entérocytes principalement, ou via les processus de remodelage intravasculaire des lipoprotéines, par catabolisme des chylomicrons à travers l'hydrolyse de leurs triglycérides relayées par la lipoprotéine lipase (LPL) (Figure 4). Les pré β -HDL peuvent aussi être générées secondairement au remodelage intravasculaire des particules α -HDL elles-mêmes. Ainsi, à travers le gain ou la perte des composantes de surface (phospholipides et apoA-I) sous l'action de la PLTP, ou des esters de cholestérol sous l'action de la CETP, de la lipase hépatique (HL) ou du récepteur éboueur de classe BI (SR-BI). Ces mécanismes contribuent significativement à la régénération de particules pré β -HDL et sont importants pour le bon fonctionnement des cycles de l'efflux de cholestérol [178, 180].

Au niveau cellulaire, l'efflux du cholestérol en excès fait intervenir plusieurs transporteurs membranaires. Le plus important est le transporteur ABCA1 (*ATP-binding cassette – A1*) dépendant de l'ATP, qui joue un rôle primordial dans l'efflux du cholestérol libre et des phospholipides des membranes vers les pré β -HDL (Figure 4). Ce transfert

nécessite une interaction du transporteur ABCA1 avec l'apoA-I de la pré β -HDL. Le transfert du cholestérol vers les pré β -HDL est suivi par une maturation de cette dernière en HDL-3 puis HDL-2 à travers l'enrichissement de leur centre hydrophobe avec des esters de cholestérol sous l'action de la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) [165, 178, 181].

Le récepteur SR-BI (*scavenger receptor B1*) peut contribuer à l'efflux du cholestérol cellulaire en favorisant l'ancrage des HDL à la membrane plasmique (Figure 4). Cependant, contrairement à ABCA1 qui s'adresse aux pré β -HDL faiblement lipidés, le récepteur SR-BI interagit surtout avec des HDL matures, laissant à ABCA1 l'exclusivité de la phase initiale d'efflux de cholestérol vers les pré β -HDL. Finalement, le transporteur ABCG1 possède aussi une spécificité pour les α -HDL matures de grande taille (figure 4). Son rôle est surtout attribué à la poursuite de l'enrichissement et la maturation des α -HDL en cholestérol[182].

3.4.2. La clairance hépatique du cholestérol : étape 2 du RCT

Après l'efflux du cholestérol à partir des cellules au niveau périphérique, vient la captation de ce cholestérol à partir des HDL par le foie (Figure 4), c'est l'étape finale du RCT. Le récepteur SR-BI entre autres, au niveau des hépatocytes, est la principale voie par laquelle le cholestérol des HDL peut être délivré au foie et ce, par un mécanisme nommé la captation sélective, où le cholestérol des HDL va être internalisé par la cellule sans endocytose et dégradation de la particule HDL. D'autres mécanismes d'acheminement du cholestérol des HDL vers le foie sont connus, notamment via des récepteurs à LDL (LDLr) qui vont capter le cholestérol à partir des particules HDL qui contiennent à leur surface une apo-E [180]. Finalement, les récepteurs purinergiques P2Y13 à la surface des hépatocytes peuvent aussi intervenir dans la captation du cholestérol des HDL, mais le mécanisme impliqué nécessite cette fois-ci l'endocytose de la particule HDL en entier [181, 183]. La formation d'ADP à partir de l'ATP ainsi que l'interaction de l'apoA-I avec la sous-unité bêta de l'ATP synthase mitochondriale à la surface des hépatocytes, constituent une étape cruciale dans ce type de transfert du cholestérol au niveau hépatique [181]. Le rôle de P2Y13 dans le métabolisme des HDL a été confirmé *in vivo*, puisque les souris déficientes pour P2Y13 ont une baisse significative de la captation hépatique du HDL cholestérol [184]. Le résultat final de l'ensemble de ces mécanismes au niveau du foie est l'élimination biliaire du cholestérol.

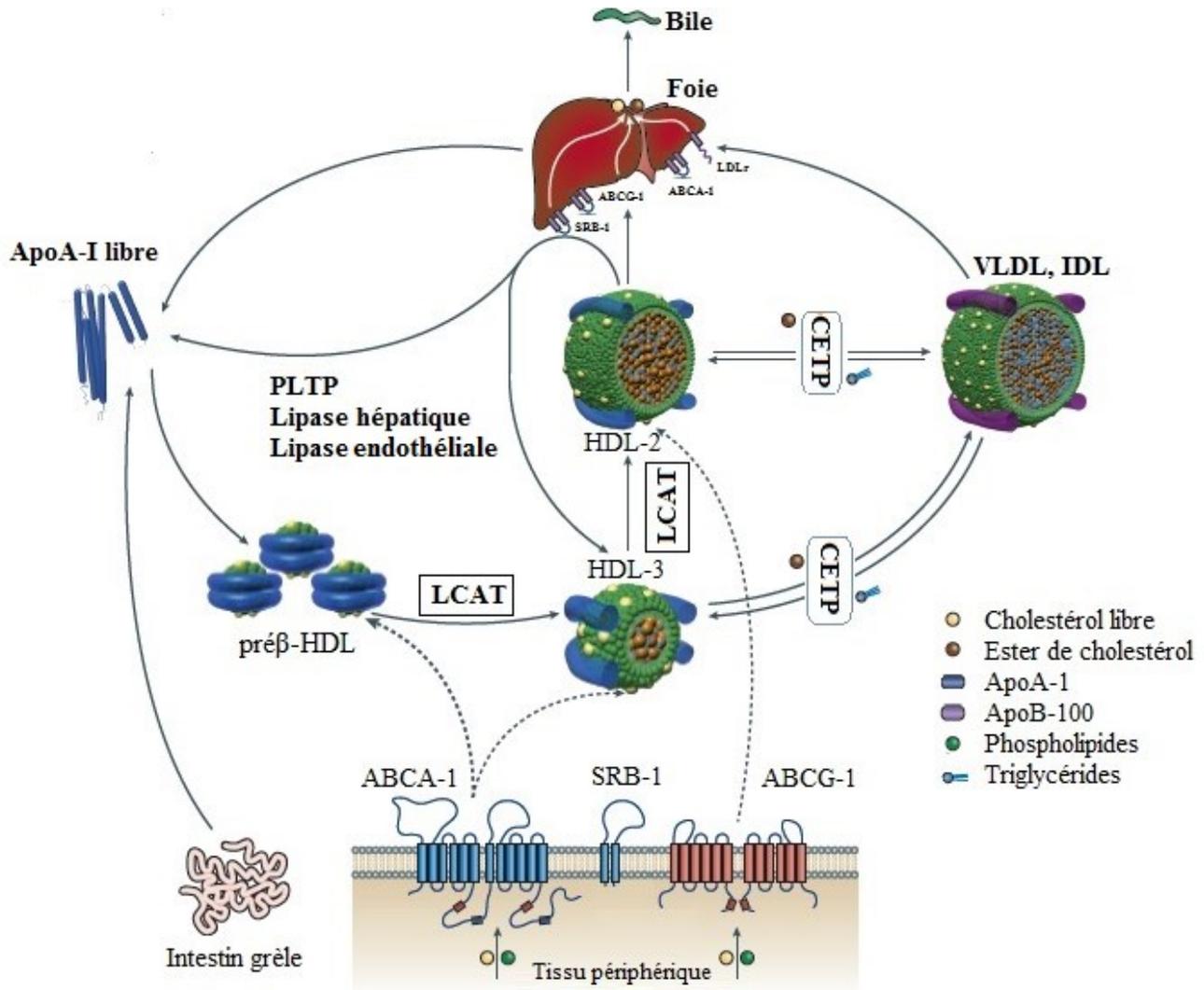


Figure 4. Représentation schématique de la voie de transport à rebours du cholestérol (RCT) et de l'efflux de cholestérol. Adapté de [185]

4. Fonctions athéroprotectrices des HDL

Plusieurs études épidémiologiques ont montré que le niveau du cholestérol HDL (HDL-C) est inversement corrélé avec les événements cliniques résultant de l'athérosclérose, alors que les niveaux de cholestérol LDL sont positivement corrélés avec la progression de ces événements. Toutefois, les effets bénéfiques des particules HDL ne sont pas seulement associés au niveau de HDL-C circulant, mais aussi au fait que les particules HDL jouent un rôle athéroprotecteur, principalement via leur capacité à faire baisser la charge lipidique au sein de la plaque athéromateuse et cela, par leur capacité d'effluer le cholestérol accumulé

dans les macrophages spumeux auparavant activés par les particules LDL modifiées et accumulées dans la plaque (Figure 5). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'efflux de cholestérol par les HDL ont déjà été bien décrits dans les sections précédentes. Toutefois, d'autres mécanismes sont impliqués dans les fonctions athéroprotectrices des HDL [186, 187].

4.1. Fonction anti-inflammatoire

Les HDL sont aussi athéroprotecteurs par leurs actions anti-inflammatoires en diminuant la production des cytokines pro-inflammatoires (par exemple : IL-1 β , TNF- α et autres), des chémokines (MCP-1) et de leurs récepteurs, en diminuant aussi l'expression des molécules d'adhésions cellulaires (VCAM-1, ICAM-1, P-sélectine and E-sélectine) (Figure 5). Ces actions sont soit directement au niveau des cellules endothéliales et des monocytes, ou résulteront indirectement de la diminution de la production et l'accumulation des LDL oxydées (Figure 5) relayées par les effets antioxydants des HDL [188]. La conséquence finale de ces mécanismes va être une diminution de l'infiltration et de l'activation des cellules pro-inflammatoires (monocyte-macrophage, lymphocyte, etc.) au sein de la plaque.

4.2. Fonctions anti-oxydantes

4.2.1. Sources du stress oxydant

Les espèces réactives à l'oxygène (ROS), qui comprennent l'anion superoxyde (O_2^-), l'anion hydroxyl (OH^-) et le peroxy-nitrite ($ONOO^-$), sont des sous-produits du métabolisme de l' O_2 hautement réactifs qui jouent un rôle majeur dans l'étiologie de l'athérosclérose. L'augmentation de la synthèse des ROS est attribuée à une activation accrue des enzymes comme la myéloperoxydase (MPO), la NADPH oxydase, la xanthine oxydase (XO), la lipoxygénase (LPO) et de la cyclo-oxygénase (COX) ainsi que le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les ROS seront impliquées dans plusieurs processus durant la progression des lésions athérosclérotiques, notamment la dysfonction endothéliale, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, l'augmentation de la prolifération, la migration des CMLV et une augmentation de l'oxydation des LDL. [189]

Normalement, le taux de production des ROS est équilibré par la vitesse d'élimination. Cependant, un déséquilibre entre la production d'oxydant et la capacité anti-oxydante, un

phénomène connu sous le nom de stress oxydatif, est associé à la lésion vasculaire observée dans l'athérosclérose [190].

4.2.2. Effet des HDL sur le stress oxydant

Plusieurs études suggèrent que les HDL ont des propriétés antioxydantes qui peuvent protéger contre les dommages oxydatifs causés par les ROS au cours de la progression de l'athérosclérose. Cet effet bénéfique a été attribué en grande majorité aux enzymes, telles que la PON1 (paraoxonase-1), la PAF-AH (acétylhydrolase du facteur d'activation des plaquettes) mais aussi à l'apoA-I, présentes sur la surface des HDL[191].

Les mécanismes moléculaires liés aux effets antioxydants des HDL sont souvent expliqués par leur capacité à diminuer l'activité des enzymes pro-oxydantes (MPO, NADPH oxydase par la PON-1), l'oxydation des LDL, l'augmentation de l'activité de la eNOS et la production du NO qui en résulte [188].

Les effets antioxydants impliquant l'apoA-I sont encore mal compris. Toutefois, des études ont suggéré l'implication de l'apoA-I, d'une manière directe ou indirecte, et pour n'en nommer que quelques-uns:

1. Par le biais des résidus méthionines spécifiques de apoA-I et de l'apoA-II, qui vont promouvoir la conversion des lipides en hydroperoxydes; acquis par les particules HDL durant le transfert du cholestérol et phospholipides cellulaires, ou qui sont le résultat de l'activité enzymatique pro-oxydante comme celle de la LPO; en hydroxydes lipidiques qui sont moins réactifs. Les particules HDL entièrement fonctionnelles peuvent promouvoir le métabolisme des hydroperoxydes lipidiques et leur absorption et clairance par le foie, ce qui serait protecteur [192, 193].
2. L'inhibition de la production de facteurs pro-oxydants par les neutrophiles, induite *in vitro* par le PMA ou le fMLP (N-formylméthionyl-leucyl phénylalanine) [194].
3. Indirectement, l'apoA-I agit sur l'activité de la PON, ceci a été montré par des études qui avaient révélé une augmentation de l'activité de la PON plasmatique chez des humains et des souris infusées avec l'apoA-I [195, 196].

4.3. Fonctions diverses des HDL

On connaît d'autres propriétés protectrices liées aux HDL en athérosclérose, ces propriétés sont surtout associées à leurs actions anti-thrombotiques (diminution de l'activation et agrégation plaquettaire), anti-fibrotiques, anti-apoptotiques (diminution des ROS et de l'activation des caspases), vaso-protectrices avec préservation de la fonction endothéliale (biodisponibilité du NO). Entre autres, ces observations sont principalement reflétées par les propriétés physico-chimiques distinctes de l'apoA-I, au niveau des HDL[182, 186].

La multitude des fonctions des HDL peut être également reflétée par la variété de lipoprotéines et de lipides qui les composent. Cette hétérogénéité de composition est compatible avec un niveau élevé d'hétérogénéité fonctionnelle des particules de HDL[186].

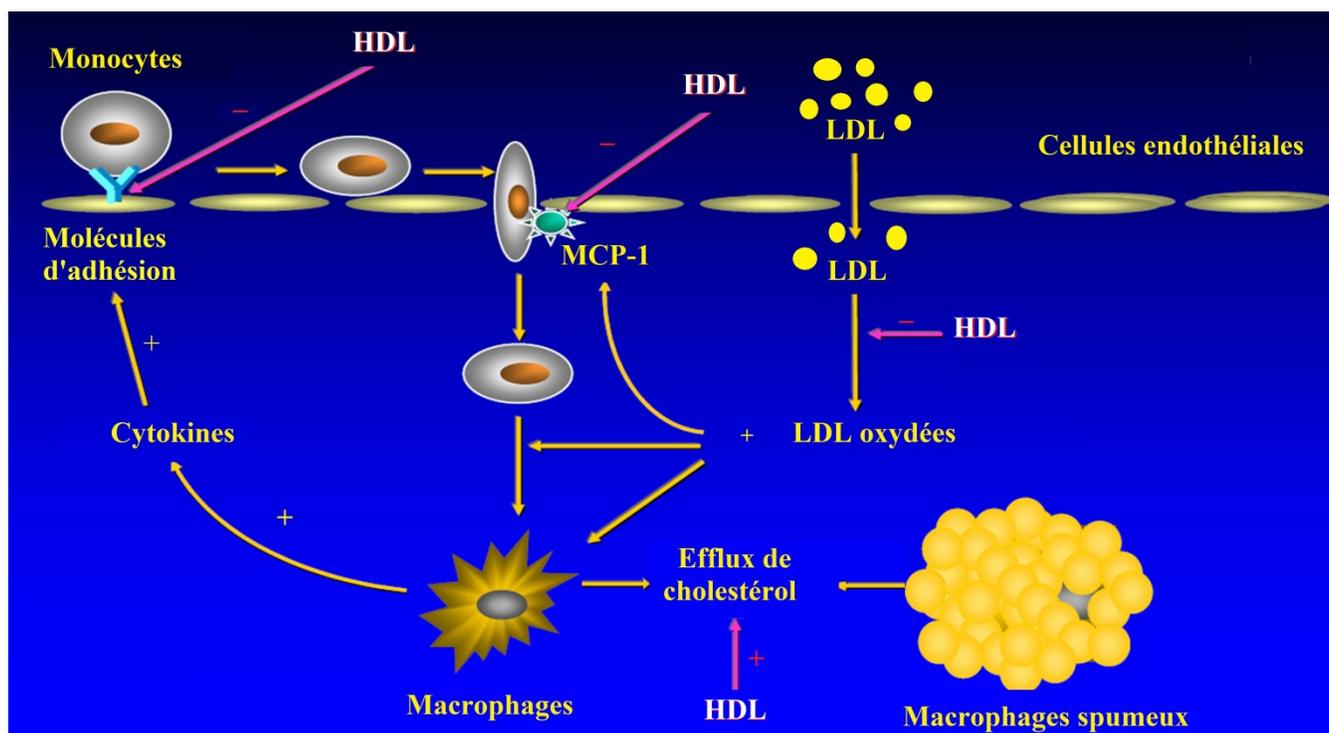


Figure 5. Fonctions athéroprotectrices des HDL. Adapté de [197]

5. Les thérapies basées sur l'utilisation des HDL

L'introduction des statines; inhibiteur de la HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A) réductase, l'enzyme limitante du métabolisme du cholestérol; au cours des années 80, a eu un impact positif sur la diminution des événements cardiovasculaires et aussi

dans la régression de la plaque athéroscléreuse. Les effets positifs des statines ont été associés entre autres à leurs actions anti-inflammatoires et leurs effets sur la HMG-CoA réductase, mais aussi à leurs capacité à réduire la synthèse et à augmenter la clairance des particules LDL ce qui a résulté en une baisse significative du niveau plasmatique du LDL-C, et ce jusqu'à 54% chez l'homme [198]. Dès lors, les statines (atorvastatin, rosuvastatin, etc.) sont devenues le traitement de choix pour la prévention contre les événements cardiovasculaires et pour la réduction du volume de la plaque athéromateuse surtout chez les patients avec des lésions athéromateuses des artères coronariennes. Cependant, ces observations sont associées à des baisses de l'ordre de 25% à 50% des événements cardiovasculaires, incitant ainsi au développement de nouveaux traitements afin d'atteindre une prévention optimale contre les risques cardiovasculaires et les lésions d'athérosclérose [199].

La corrélation inverse entre les niveaux de HDL-C et les risques cardiovasculaires combinée avec le rôle bénéfique des HDL sur l'athérosclérose expliquée par les mécanismes comme l'efflux de cholestérol, le transport inverse du cholestérol et les autres points discutés auparavant, ont mené vers le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation des HDL pour une protection optimale contre les événements cardiovasculaires et la régression de l'athérosclérose.

En combinaison avec les statines, plusieurs stratégies ont été mises en place et testées, incluant des stratégies visant à faire augmenter les niveaux du HDL-C circulant, soit par l'augmentation des niveaux de particules HDL endogènes ou par un apport exogène[190].

5.1. Les thérapies visant l'augmentation des HDL endogènes

Plusieurs stratégies ont été développées pour augmenter les niveaux de HDL endogènes. Les plus importantes sont:

1. Les niacines (acide nicotinique) :

Deux méta-analyses sur des essais publiés en 2010 avaient conclu que l'acide nicotinique réduit l'incidence des événements coronariens cliniques et réduit l'évolution de l'athérosclérose au niveau des artères coronariennes suite à une augmentation significative des niveaux de HDL-C relié par des mécanismes anti-lipolytiques et la promotion de la biogenèse des HDL dans le foie. Toutefois, l'absence d'effets bénéfiques significatifs [200] et

l'augmentation des effets indésirables graves (augmentation du taux de mortalité, développement de myopathie grave, trouble du système gastro-intestinal, hémorragies et autres) rapportées après l'arrêt de deux études cliniques (AIM-HIGH, HPS2-THRIVE), avaient entravé l'utilisation clinique de la niacine en athérosclérose [201, 202].

2. Les inhibiteurs de la CETP (i-CETP):

Les i-CETP sont des agents qui affectent à la fois le taux du LDL-C en le diminuant et le taux de HDL-C en l'augmentant. Les mécanismes associés aux effets des i-CETP sont expliqués par l'inhibition du transfert des esters de cholestérol à partir des HDL vers les LDL et VLDL impliquant la CETP. L'inhibition de la CETP se traduit par une augmentation du HDL-C et une baisse significative du LDL-C. Une augmentation de la génération des particules pre- β HDL était en plus observée avec l'i-CETP, dalcetrapib [203, 204].

Toutefois, deux études cliniques (ILLUMINATE et dal-OUTCOMES) conduites sur des patients présentant des lésions d'athérosclérose, traités respectivement avec les i-CETP, torcetrapib et dalcetrapib, ont été arrêtées en phase III. Les raisons de cet arrêt étaient principalement à cause de l'absence d'effet bénéfique sur les événements cardiovasculaires majeurs malgré la diminution du volume de la plaque athéromateuse et l'augmentation significative du HDL-C observé suite au traitement. Aussi, plusieurs effets secondaires liés au traitement (taux de mortalité élevé, toxicités et symptômes vasopresseurs dans le cas du torcetrapib) avaient été observés. Malgré ces résultats négatifs, l'avenir des i-CETP pour leur utilisation en clinique n'est pas encore scellé. En effet, deux autres i-CETP (anacetrapib et evacetrapib) administrés à des patients présentant des risques cardiovasculaire sévères, sont à l'essai présentement dans deux études cliniques, DEFINE et ACCELERATE (respectivement en phase III et II) [204].

3. Le RVX-208 de Resverlogix:

Le RVX-208 est un inducteur de la synthèse de l'apoA-I endogène, notamment dans le foie. Les effets du RVX-208 sont traduits par des mécanismes qui impliquent une action sur des protéines régulatrices de la transcription de l'apoA-I. Une étude sur des singes traités avec le RVX-208 avait révélé une augmentation significative de l'apoA-I (60%) et du HDL-C (97%) [205]. Cependant, les résultats obtenus lors d'études cliniques sur des patients avec des

maladies coronariennes (ASSURE: pour Synthèse Stimulation et Ultrasons intravasculaires pour Évaluation de la Régression de l'athérome des artères coronaires) n'ont pas permis d'atteindre les limites désignées comme significatives en ce qui concerne la régression du volume de la plaque (établis à $-0,6\%$, obtenus $-0,4\%$). Toutefois, les objectifs secondaires ont été significativement atteints, et ce en ce qui concerne l'augmentation de la synthèse de l'apoA-I et du HDL-C, ainsi que la régression du volume totale de la plaque athéromateuse ($-0,4\%$). D'autres méthodes pour le développement du RVX-208 sont en cours pour l'amélioration des résultats obtenus [206, 207].

5.2. Les stratégies thérapeutiques par infusion d'HDL et de l'apoA-I

Une autres manière pour augmenter le HDL-C a été développé et consiste à infuser à des patients soit des particules de HDL dite reconstituées (r-HDL) ou encore des peptides mimétiques de l'apoA-I (pm-apoA-I) [187]. Les particules de r-HDL sont soit issues d'une apoA-I humaine purifiée, comme le CSL-111, CSL-112 et l'ETC-216 ou d'une apoA-I recombinante comme le CER-001 [204]. Ces apoA-I sont ensuite complexées avec une bicouche de phospholipides. Toutefois, quelques différences subsistent entre ces particules de r-HDL, par exemple dans le cas de l'ETC-216, l'apoA-I utilisée dans sa synthèse est une apoA-I découverte chez une population italienne d'où son nom apoA-I Milano. Elle comprend une mutation naturelle en position arginine 173 qui est substituée par une cystéine. Cette mutation lui permet une résistance à la clairance rénale due à sa capacité à former des complexes d'apoA-I reliés par des ponts disulfure, ainsi que de meilleures propriétés anti-oxydantes et d'efflux de cholestérol [208].

Plusieurs études cliniques ont été menées basées sur l'utilisation des r-HDL. Notamment l'étude ERASE (pour Effect of Reconstituted HDL on Atherosclerosis Safety and Efficacy) avec le CSL-111 et l'étude CHI-SQUARE (Can HDL Infusions Significantly Quicken Atherosclerosis Regression) avec le CER-001. Une diminution significative au niveau du volume de l'athérome à la fin du traitement par rapport au début du traitement a été observée chez les patients des deux études. Toutefois, la significativité était perdue lorsque les résultats étaient comparés aux patients traités avec un placebo. Cependant, les effets du CSL-111 associés à des changements importants dans les indices de caractérisation de la plaque par IVUS étaient statistiquement significatifs par rapport au placebo [204, 209].

Les pm-apoA-I sont des complexes de peptides et phospholipides dont les peptides imitent la structure secondaire d'une hélice de l'apoA-I native, sans aucune homologie dans la séquence d'acides aminés primaires qui les composent. Les pm-ApoA-I sont plus petits qu'une apoA-I native et sont donc plus faciles et moins coûteux à produire, un facteur important dans le développement des médicaments [204]. L'utilisation des pm-apoA-I dans des modèles d'athérosclérose expérimentaux, ont montré des effets bénéfiques par la réduction significative du volume de la plaque athéroscléreuse et sur l'augmentation des niveaux des particules de pre β -HDL, ce qui favorise l'efflux de cholestérol [210].

D'autres effets bénéfiques leur sont associés comme des effets anti-inflammatoire et anti-oxydant, similaires à ceux de l'apoA-I native. Plusieurs composés ont été développés et testés, comme le D4-F, l'ETC-642, riche en résidus phénylalanine, alanine entre autres, pour augmenter l'affinité lipidique et les caractéristiques hydrophobes du peptide [211]. Toujours en phase de développement expérimental, les pm-apoA-I n'ont pas encore démontré leur plein potentiel dans des études cliniques. Toutefois, on peut citer l'exemple du D-4F, dont 4 doses différentes ont été administrées oralement à des patients présentant de gros risques cardiovasculaires. Certes, les premiers résultats de l'étude n'ont pas montré de changement dans le profil lipidique des patients. Par contre, une amélioration significative de l'indice anti-inflammatoire des particules HDL a été signalée. Cet indice est un reflet de la capacité des HDL à inhiber l'activité chimiotactique des monocytes induite par les particules LDL [212].

Malgré le fait que les stratégies basées sur les HDL avaient jusqu'à un certain point réussi à augmenter le niveau de HDL-C, les effets neutres observés dans les études cliniques ont mis en doute les effets bénéfiques des niveaux de HDL-C dans les maladies cardiovasculaires. Ces efforts ont mis en évidence qu'il ne suffisait pas juste d'augmenter les niveaux de HDL-C pour réduire le risque de développement de maladies cardiovasculaires et de faire régresser les lésions d'athérosclérose, mais qu'aussi, les paramètres de fonctionnalité des particules de HDL peuvent être des facteurs encore plus importants [213, 214].

6. Le concept des HDL dysfonctionnels

La nature hétérogène en taille et en composition des HDL ainsi que l'environnement hostile (pH, inflammation, activités protéolytiques, stress oxydant, etc) dans lequel les HDL se retrouvent durant la progression de l'athérosclérose, ont soulevé un questionnement sur le

potentiel protecteur des HDL contre l'athérosclérose [215]. En réponse à cette question, différents essais *in vitro* ont été développés et utilisés pour évaluer la fonction des HDL. On peut notamment citer les travaux sur l'activité anti-inflammatoire et antioxydante des HDL de Philip J. Barter et ses collègues [197]. Ces derniers avaient développé à cet effet un modèle de paroi artérielle reconstituée pour des tests cellulaires ainsi que d'autres modèles pour des tests non-cellulaires [216]. À travers ces études, il s'en défend l'idée que les HDL peuvent devenir dysfonctionnels dans différents cas. Par exemple, l'ajout de LDL aux cellules endothéliales en co-culture avec des cellules CMLV induit la sécrétion des facteurs chimiotactiques aux monocytes. Toutefois, ces mécanismes pro-inflammatoires sont entravés par l'ajout de HDL provenant de patients sains [217].

Cependant, les HDL issus de patients atteints de syndrome coronarien (CAD) aigu avaient bien au contraire aggravé ces mécanismes. Ce qui suggère un effet pro-inflammatoire promu par les HDL eux-mêmes chez certains patients [218]. Dans un autre test, les HDL/apoA-I purifiés, à partir de sujets atteints de septicémie, avaient une diminution dans leur capacité d'effluer le cholestérol à partir des macrophages, ce qui indique que la septicémie était associée à la dysfonction des HDL [219]. Finalement, des HDL isolés de patients diabétiques (type II) avaient des capacités vasoprotectrices amoindries [220].

Suite à ces évidences, plusieurs études ont suggéré que des mécanismes menant vers des changements dans la composition ou dans la nature des protéines à la surface des particules HDL, tels que le remodelage des lipoprotéines à la surface des HDL, l'enrichissement en SAA et/ou la sPLA₂ (phospholipase sécrétée A₂), les modifications post-traductionnelles comme l'oxydation, la glycation et la protéolyse; attribuables à l'infection, l'inflammation ou le diabète sont associés à une diminution de la fonction des HDL [219, 221, 222]. Nous allons maintenant faire un survol rapide des mécanismes menant à la production de particules de HDL dysfonctionnelles comme l'oxydation et la protéolyse, en nous concentrant toutefois sur les réactions de protéolyses des HDL et plus spécifiquement de l'apoA-I dans le cadre de l'athérosclérose.

6.1. Oxydation de l'apoA-I par la MPO et dysfonction des HDL

La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme produite dans les cellules neutrophiles et les monocytes macrophages. Son rôle important dans la défense de l'hôte contre les micro-

organismes est relayé par la génération d'un puissant agent antibactérien, l'acide hypochloreux. Le mécanisme de génération de l'acide hypochloreux par la MPO nécessite l'utilisation des ions chlorure (Cl^-) et le peroxyde d'hydrogène cellulaire (H_2O_2). Toutefois, la MPO peut aussi être néfaste pour les protéines endogènes du soi, en causant des modifications covalentes aux résidus d'acides aminés cystéines, méthionines, tyrosines, tryptophanes et lysines [219].

L'expression et l'activité de la MPO augmentent dans l'athérosclérose. Sa présence peut favoriser la progression des lésions athéromateuses en augmentant l'oxydation des LDL et en limitant la régression des plaques via l'altération des fonctions des HDL (apoAI / HDL), surtout la fonction du RCT [215]. L'apoA-I est une cible sélective pour des modifications oxydatives induites entre autres par la MPO et les dérivés du monoxyde d'azote au sein de la paroi artérielle (environ 500 fois plus comparativement à d'autres protéines) [223]. Des études ont montré l'existence de sites spécifiques pour la liaison directe de la MPO sur l'apoA-I, au niveau des régions situées entre les résidus 190 à 203 sur l'hélice 8 de l'apoA-I [224]. D'autres études parallèles, *in vitro* et *ex vivo* utilisant les particules de HDL ou d'apoA-I oxydées par le système $\text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-Cl}^- / \text{MPO-H}_2\text{O}_2\text{-NO}_2^-$ (oxydation par chlorination ou par nitration) ont montré des réductions marquées dans les fonctions d'efflux de cholestérol (dépendant d'ABCA1), la capacité à activer l'enzyme LCAT et même l'activité de cette dernière et les fonctions connexes comme les activités anti-apoptotiques et anti-inflammatoires [177].

Cependant, les mécanismes précis par lesquels la MPO rend l'apoA-I dysfonctionnelle restent controversés. Toutefois, des essais de fonctionnalité de l'apoA-I oxydée au niveau des résidus tyrosines 166 ont été associés à la perte de l'activation et l'activité de la LCAT [223]. La diminution, voir la perte totale, de la capacité d'effluer le cholestérol via ABCA1, a été attribuée à l'oxydation des tyrosines 192, tryptophane 72 et aussi aux trois résidus méthionine de l'apoA-I [223]. L'oxydation du résidu tryptophane 72 est aussi associée au profil pro-inflammatoire de l'apoA-I modifiée à ce niveau [219, 225].

6.2. Protéolyse de l'apoA-I et dysfonction des HDL

Les particules HDL peuvent subir une inactivation fonctionnelle autre que l'oxydation ou la glycation. Au cours de l'athérogenèse, différents types de cellules dans l'intima artérielle vont libérer une multitude d'enzymes et de protéases, potentiellement capables de provoquer des modifications structurelles et chimiques des composantes présentes à la surface des

particules de HDL. La protéolyse fait donc partie des événements qui peuvent modifier et inactiver certaines composantes des particules HDL, nuisant ainsi à leur fonctionnalité, surtout la fonction d'efflux de cholestérol à partir des macrophages spumeux au niveau de la plaque athéromateuse [222].

Les premières études sur la protéolyse des HDL ont montré qu'à l'inverse de l'oxydation, même un degré minimal de dégradation est suffisant pour modifier le spectre physiologique des particules HDL circulantes dans le plasma [222, 226]. Ces mécanismes seront associés à une clairance très rapide de la composante la plus petite, la pre β 1-HDL. Cette dernière représente la sous-population de HDL la plus efficace pour la médiation de l'efflux de cholestérol par la voie dépendant d'ABCA1 au niveau périphérique et par conséquent la première étape du RCT [227].

Tel que mentionné auparavant, les HDL sont composées d'une variété d'apolipoprotéines amphipathiques dont l'apoA-I comme composante majoritaire. Ces apolipoprotéines présentent des sensibilités différentes à la protéolyse. Ainsi, des tests *in vitro* effectués dans le plasma humain, ont montré que l'apoA-I, l'apoA-IV, et l'apoE sont les plus sensibles à la protéolyse, alors que l'apoA-II l'est moins [228, 229]. La forme et la taille des particules HDL déterminent également la susceptibilité à la protéolyse des apolipoprotéines comme l'apoA-I. L'apoA-I au niveau des α -HDL et HDL₂ matures est plus résistante à la protéolyse que celle à la surface des HDL₃ et surtout sur la pre β 1-HDL. Cela a été associé à la disposition des sites potentiellement clivables par les protéases suite aux différences dans la conformation de l'apoA-I selon la nature et la maturité des particules HDL qui la contiennent. [230, 231]

Le répertoire des protéases extracellulaires; dérivées entre autres des cellules macrophages, des CMLV, des mastocytes et les lymphocytes T présentes dans l'intima artérielle est très varié. Ces protéases sont potentiellement capables de dégrader l'apoA-I, mais aussi l'apoA-II et A-IV (Tableau 6). Pour n'en citer que quelques-unes, certains membres de la famille des MMP (MMP-1, -3, -7, et -12), la plasmine, la kallikréine, la cathepsine F et S, la neutrophile élastase, la tryptase et la chymase sont parmi les protéases pouvant causer la dégradation des HDL. En outre, l'augmentation de l'expression et l'implication de ces protéases dans la progression de l'athérosclérose est bien connue [222].

Protéases	Protéolyse des HDL	Cellules sécrétrices
Métalloprotéases		Macrophages surtout
MMP-3, -7, -12	Oui	
MMP-1	Modérément	
MMP-9	Non	
Cathepsines		Macrophages et cellules musculaires lisses
Cathepsines F	Oui	
Cathepsines S	Oui	
Cathepsines K	Non	
Chymase	Oui	Mastocytes
Tryptase	Oui	Mastocytes
Kallikréine	Oui	Cellules musculaire lisses, macrophages, EC, fibroblastes
Neutrophile elastase	Oui	Neutrophiles, mastocytes et macrophages
Plasmine	Oui	Cellules musculaires lisses

Tableau 6. Classes des protéases ayant la capacité de dégrader les composantes des particules HDL. Adapté de [222]

6.2.1. Facteurs favorisant l'activité protéolytique dégradant l'apoA-I

Plusieurs facteurs vont favoriser l'activité protéolytique des protéases et ainsi augmenter le risque de la dégradation de l'apoA-I dans le tissu de la paroi artérielle. Les conditions favorables comme le pH extracellulaire acide susceptible de se trouver dans les zones hypoxiques des lésions avancées (riches en macrophages) de la plaque athéromateuse peut faciliter l'activité protéolytique des cathepsines sécrétées par les macrophages [232]. Aussi, des conditions comme la diminution dans l'athérosclérose de l'expression des inhibiteurs de protéases endogènes telles que les α_2 -macroglobulines (inhibiteurs à large spectre) et les α_1 -antitrypsines (inhibiteurs naturels des protéases élastases), les TIMPs (inhibiteurs de MMP) ou encore les cystatines C (inhibiteurs de cathepsines) [80]. Entre autres, l'analyse protéomique d'échantillons de plasma de patients avec sténose valvulaire aortique; une pathologie dont les facteurs de risques et les mécanismes associés à sa progression ressemblent beaucoup à ceux de l'athérosclérose [233], a révélé une modulation des inhibiteurs de protéases et des protéases, tels que l'inhibiteur inter- α -trypsine, α_1 -antichymotrypsine, α_1 -antitrypsine, kininogène-1, la vitronectine et l'hémopexine [234].

D'autres protéases sont sécrétées sous une forme résistante à l'inhibition, comme dans le cas de la chymase et la tryptase issues de la dégranulation des cellules mastocytaires sous une forme active et liée à une protéoglycane, l'héparine. La conformation de la chymase ou de la tryptase combinée avec l'héparine engendre un encombrement stérique à la hauteur de leurs sites catalytiques [235, 236]. Ceci rend l'accès à des grosses protéines comme l'inhibiteur endogène α_2 -macroglobuline impossible tout en préservant l'activité protéolytique aux substrats, comme l'apoA-I entre autres, intacte.

Les analyses protéomiques des HDL ont montré que ces dernières sont capables d'inhiber l'activité protéolytique des protéases grâce à la présence d'inhibiteurs de protéases à leur surface, comme les α_1 -antitrypsines. Cependant, dans l'athérosclérose, la multitude des protéases potentiellement présentes dans l'intima constitue un défi important pour l'auto-défense des particules HDL contre ces dernières. En outre, il a été rapporté que la teneur en α_1 -antitrypsine est réduite à la surface des HDL isolées à partir de patients athéroscléreux, augmentant ainsi la susceptibilité à la protéolyse et par conséquent l'altération des fonctions anti-athérogéniques de ces derniers [237].

Dans cette section nous allons plus spécifiquement décrire les mécanismes de la dégradation de l'apoA-I et la dysfonction des particules HDL par les protéases mastocytaires dont la chymase et la tryptase, les métalloprotéinases issues des macrophages comme les MMP-1,3, 7 et 12, les cathepsines S et F issues des macrophages entre autres. L'importance et le rôle joué par ces protéases dans la progression de l'athérosclérose sont bien connus et ont été décrits auparavant dans l'introduction.

6.2.2. Protéolyse de l'apoA-I par les protéases mastocytaires

Des observations récentes montrent que le nombre de mastocytes dégranulés est plus élevé dans des régions de l'aorte et des artères coronaires humaines contenant des cellules macrophages spumeuses, ce qui laisse supposer que dans les parois artérielles athéromateuses, les protéases issues de la dégranulation des mastocytes peuvent; par leur impact sur les HDL et l'apoA-I; modifier l'équilibre délicat entre l'influx et l'efflux de cholestérol et ainsi contribuer à la progression de la plaque athéromateuse [238-240].

6.2.2.1. Impact de la CMA sur la fonction de l'apoA-I et des HDL

Les protéases neutres des cellules mastocytes peuvent être divisées en trois classes différentes: tryptases, chymases et les carboxypeptidases A (CPA) [241]. Les chymases (CMA-1) contenues dans les granules des cellules mastocytaires sont des protéases à sérines neutres, elles ont une spécificité de clivage de type chymotrypsine et favorisent le clivage des résidus aromatiques hydrophobes comme la phénylalanine, tyrosine et tryptophane, en position P1 du substrat [242]. On retrouve chez les rongeurs plusieurs sous-populations de chymases avec des activités différentes quant au substrat ciblé [243, 244]. Cependant, avec les données actuelles, nous ne connaissons que l'existence d'un seul type majeur de chymase chez l'homme, la CMA-1 [242, 245].

La chymase (CMA-1) peut cliver l'apoA-I native libre et/ou couplée avec des particules HDL faiblement lipidées (HDL reconstitué; apoA-I-rHDL). La caractérisation des sites de clivage de la chymase sur l'apoA-I-rHDL a révélé un site de clivage dans la partie C-terminale de l'apoA-I (Phe225) et deux autres dans la région N-terminale (Tyr18 et Phe33), ce qui a généré trois grands fragments protéolytiques [231]. La production de ces fragments est associée à la réduction de la capacité de l'apoA-I-rHDL de promouvoir l'efflux de cholestérol mesurée *in vitro* à partir de macrophages chargés en cholestérol [231]. En revanche, l'incubation des particules α -HDL matures avec la chymase n'avait pas d'effet, ni sur l'apoA-I présente dans ce type de particules HDL, ni sur la capacité d'efflux de cholestérol [229, 246].

Une autre étude avait aussi caractérisé deux autres sites potentiels de clivage par la chymase sur l'apoA-I native non-lipidée ou l'apoA-I composant les HDL₃. Ceci était possible par le développement d'un anticorps monoclonal (16-4mAC) spécifique qui reconnaît la partie C-terminale de l'apoA-I tronquée du côté carboxyle du résidu Phe225, mais ne reconnaît pas une apoA-I intacte [247]. Les nouveaux sites de clivage par la chymase ainsi caractérisés étaient au niveau C-terminal de l'apoA-I native non-lipidé, en particulier au niveau des résidus Phe229 et Tyr192. En revanche, dans la forme liée aux lipides (HDL₃), l'extrémité N-terminale de l'apoA-I; en particulier au niveau des résidus Phe33 était plus susceptible au clivage par la chymase [248]. De plus, en utilisant le même anticorps, des études ont validé la présence de l'apoA-I tronquée en position Phe225 et Phe229, après analyse de particules de HDL isolées à partir de sérum de patients sains. D'autres études ont montré l'altération de la fonction d'efflux

de cholestérol des particules de pré- β -HDL et de HDL₃ traitées avec la chymase. Cependant, la fonction d'activation de la LCAT par les HDL₃ était préservée. Ce qui suggère que l'altération de certaines fonctions des HDL ciblées par la chymase est liée à la nature et à la position des sites de clivage, spécifiques à la chymase sur l'apoA-I, mais aussi à la taille de la particule HDL [246].

6.2.2.2. Impact de la CPA sur la fonction de l'apoA-I et des HDL

La carboxypeptidase A (CPA) est une métalloexopeptidase qui hydrolyse la liaison peptidique adjacente à l'extrémité C-terminale d'une chaîne polypeptidique [249]. La CPA semble agir en collaboration avec la chymase dans les lésions athérosclérotiques. La colocalisation de la CPA avec la chymase, suite à une dégranulation des cellules mastocytes dans les lésions athéroscléroseuses sévères, a déjà été validée par des analyses histochimiques [248]. L'incubation *in vitro* de l'apoA-I (native) avec la CPA en présence de la chymase a révélé deux sites potentiellement clivés par la CPA en position C-terminale des résidus Ser224 et Ser228 [248]. Cependant, la mise en évidence de ces sites de clivage de la CPA sur l'apoA-I, n'était possible que suite à un clivage subséquent de l'apoA-I par la chymase en position C-terminale des résidus Phe225 et 229. Ce qui suggère un travail de collaboration entre les deux protéases. Toutefois, l'impact de la CPA toute seule sur la fonction d'efflux de cholestérol n'est pas encore connu [248].

6.2.2.3. Impact de la tryptase sur la fonction de l'apoA-I et des HDL

On retrouve aussi dans les granules cytoplasmiques sécrétoires des mastocytes la deuxième espèce de protéases à sérines neutres en plus de la chymase et la tryptase. Lors de l'activation des mastocytes, la tryptase est sécrétée sous une forme active. La tryptase est une sérine protéase unique qui n'est enzymatiquement active que sous une forme de tétramère et nécessite notamment les glycosaminoglycanes, les protéoglycanes d'héparine qui sont colocalisés avec la tryptase et co-sécrétés par les mêmes granules mastocytaires. Les protéoglycanes d'héparine des mastocytes ont tendance à empêcher la monomérisation de l'enzyme après sécrétion ainsi que son inhibition par les inhibiteurs endogènes, préservant ainsi son activité dans le milieu extracellulaire. De façon similaire aux observations avec la

chymase, l'apoA-I des particules de pre β -HDL et de HDL₃ est sensible à la dégradation par la tryptase. Cependant, l'apoA-I dans la fraction des α -HDL est résistante ou insensible au clivage par la tryptase [236]. Les positions de clivage de la tryptase sur l'apoA-I (lipidée ou non) sont encore inconnues. Toutefois, la fonction d'efflux de cholestérol est diminuée après exposition à la tryptase mais pas la capacité d'activer la LCAT [236].

6.2.3. Protéolyse de l'apoA-I par les protéases des macrophages

6.2.3.1. Protéolyse de l'apoA-I par les cathepsines

Sécrétées abondamment et majoritairement par les macrophages au cours de la progression des lésions d'athérosclérose, la cathepsine S (CS) et la cathepsine F (CF) sont des protéases de la famille des cystéines protéases [138]. Les études de profilage utilisant les bibliothèques de séquences peptidiques combinatoires pour la caractérisation de la spécificité fonctionnelle des cathepsines, montrent que les cathepsines S et F ont une spécificité de clivage analogue à celle de la trypsine et favorisent le clivage de la liaison peptidique en C-terminal des résidus lysine/arginine surtout, mais aussi, avec moins d'affinité par contre, les résidus thréonine/glutamine [250].

Selon sa séquence en acides aminés, l'apoA-I est constituée, entre autres, de 21 résidus de lysines, 16 arginines, 17 glutamines et 10 thréonines; ce qui suggère une multitude de sites potentiellement clivables par les protéases à cystéines. Les sites exacts de clivage de la CS et CF sur l'apoA-I sont encore inconnus. Cependant, l'incubation *in vitro* de l'apoA-I libre ou à la surface des particules de HDL (surtout HDL₃ et Pre β -HDL) avec la CS ou CF, a montré une altération de la capacité et de l'efficacité d'induction de l'efflux de cholestérol par l'apoA-I et HDL₃ à partir des macrophages spumeux, surtout par la CS [251].

6.2.3.2. Protéolyse de l'apoA-I par les MMP

La capacité de protéolyse des HDL et l'apoA-I par les MMP varie et dépend du type de MMP impliqué. Plusieurs membres de la famille des MMP sont capables de dégrader les HDL₃ et l'apoA-I humaine, d'autres non. Ainsi, lorsque les particules HDL₃ ont été traitées avec les MMP-3, 7 et 12, une forte réduction de leur capacité à induire l'efflux de cholestérol à partir des cellules macrophages spumeuses a été observée, tandis qu'une légère réduction avait

été notée après leur traitement avec la MMP-1[252]. Toutefois, dans le cas de la MMP-9, aucun effet sur les fonctions d'efflux des HDL ou de l'apoA-I n'a été observé [252]. Les analyses par spectrométrie de masse des fragments d'apoA-I générés par les MMP-3, 7 et 12 montrent que les sites de clivage se localisent surtout au niveau de la région C-terminale de l'apoA-I, alors que la MMP-1 et 9 ne dégradent l'apoA-I que légèrement ou pas du tout, respectivement [252]. Dans une autre étude, une analyse des fragments d'apoA-I générés après le traitement des particules HDL₃ avec un mélange de MMP issues de l'activation *in vitro* de différents types cellulaires (CMLV, HUVEC et PMN), suggère que des clivages en position N-terminale de l'apoA-I sont possibles, cependant l'implication sur la fonction de l'apoA-I est encore mal connue [230].

6.2.4. Autres protéases qui dégradent l'apoA-I

En plus des protéases impliquées d'une façon bien établie dans la progression de l'athérosclérose, d'autres types de protéases peuvent potentiellement dégrader l'apoA-I et nuire à sa fonction. On peut citer entre autres, la trypsine, la pronase, la chymotrypsine, des élastases comme la neutrophile élastase, la protéinase K et autres [230, 253-255].

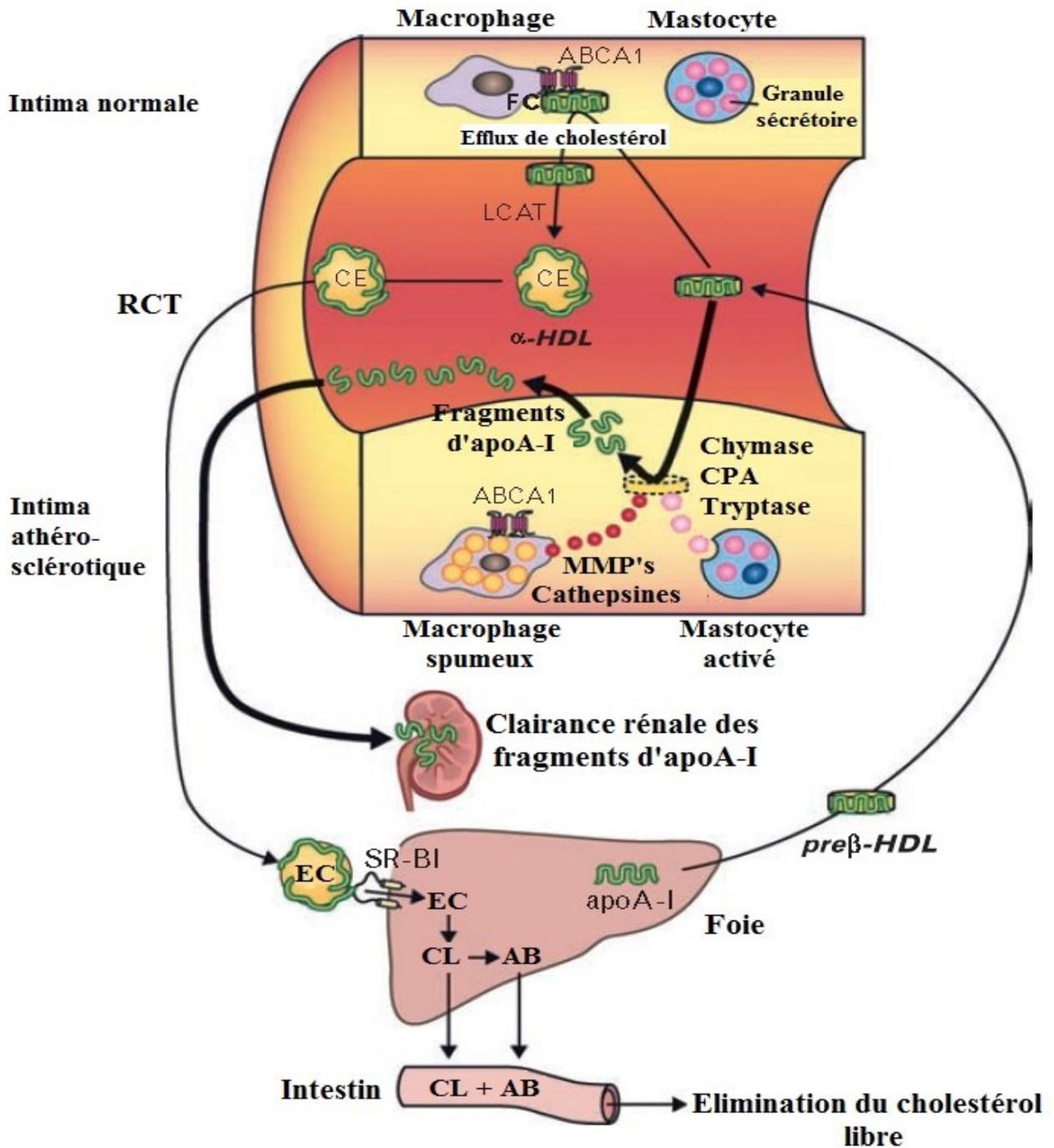


Figure 6. Modèle montrant comment l'inactivation protéolytique de particules Pré-β-HDL et de l'apoA-I en athérosclérose peut affecter la fonction du transport inverse du cholestérol. Adapté de [222]. EC: ester de cholestérol, AB: acide biliaire, CL: cholestérol libre.

7. Profilage de l'activité des protéases

L'implication des protéases dans les processus biologiques physiologiques et pathologiques fait de ces dernières des cibles de choix pour le développement de stratégies thérapeutiques comme les inhibiteurs spécifiques de protéases. Le développement d'inhibiteurs de protéases efficaces nécessite une bonne compréhension des fonctions biologiques, des niveaux d'activités des protéases d'intérêt et leurs substrats ciblés [256]. Bien que les progrès technologiques récents comme le criblage à haut débit (CHD), la biologie structurale, la modélisation computationnelle ou la chimie combinatoire aient permis la conception de puissants inhibiteurs de protéases, l'optimisation de leur efficacité reste un défi [257, 258]. En effet, la spécificité des inhibiteurs de protéases reste le principal obstacle à surmonter. Vu que les mécanismes d'action sont hautement conservés parmi chaque classe de protéases et que de nombreux membres de famille de protéases sont étroitement apparentés, il est difficile pour les inhibiteurs de protéases de cibler une seule protéase à la fois [256]. Cette inhibition non spécifique peut engendrer des effets secondaires indésirables. Compte tenu de la nécessité d'une meilleure compréhension des rôles complexes des protéases, plusieurs techniques ont été développées et améliorées pour identifier les cibles, la localisation, l'activité et les modes de régulation des protéases ainsi que l'efficacité et la spécificité des inhibiteurs développés. Ces techniques comprennent le développement des sondes fluorescentes protéiques qui représentent un substrat naturel des protéases ou des sondes peptidiques synthétiques fluorescentes activables (SBS pour sonde basée sur le substrat) qui se basent sur la capacité des protéases à les cliver pour les activer [259]. D'autres types de sondes synthétiques se basent sur l'état actif ou non-actif (SBA pour sonde basée sur l'activité) de la protéase ciblée. Le principe de ces sondes se base sur leur capacité à lier d'une manière spécifique et irréversible les sites catalytiques des protéases actives [258, 260].

Les SBS sont composés d'une séquence reconnue par le site catalytique de la protéase d'intérêt et un rapporteur comme le 7-amino-4-carbamoylmethylcoumarin (ACC) ou la p-nitroaniline (pNA) [259]. Les rapporteurs génèrent un signal mesurable lorsque la sonde est clivée. D'autres rapporteurs libèrent un signal après un transfert d'énergie lors du clivage du substrat. Pour en citer quelques exemples représentatifs à ce genre de sondes, on retrouve les gélatines-FITC, BSA-FITC [261], les peptides poly lysines-ACC [259].

Les SBA se caractérisent par une liaison covalente irréversible d'un électrophile présent sur la sonde et d'un nucléophile au niveau du site catalytique de la protéase [260]. De plus, seules les protéases dont le site catalytique est en configuration activée peuvent permettre ce genre de liaison. Comme avec les sondes à base de substrat, une séquence de reconnaissance confère une spécificité à la protéase cible. Les SBA utilisent aussi un rapporteur (généralement un fluorophore), ce qui permet une localisation précise et spécifique de la protéase ciblée. Aussi, contrairement au SBS dont le substrat est libéré après son clivage par la protéase, les SBA permettent l'isolation et l'identification de la protéase spécifiquement ciblée par la sonde, mais en revanche, elles ne permettent pas de dire si la protéase ciblée est capable d'hydrolyser le substrat [258, 260]. Pour citer quelques exemples représentatifs des SBA : *Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-chloromethylketone* [262], DCG-04, FP-Biotin [260]. Dans la section suivante nous allons plus spécifiquement décrire les sondes protéiques fluorescentes bioactivables et les concepts liés à la fluorescence dans le proche infrarouge.

8. Développements de substrats fluorescents activables par protéolyse

8.1. Mécanisme de base d'émission de la lumière fluorescente

Les molécules fluorescentes, également appelées fluorophores, sont des molécules sensibles à la lumière [263]. Les photons émis par une lumière d'excitation sont absorbés par les électrons des molécules fluorescentes. Ce phénomène augmente le niveau d'énergie de l'électron qui passe à un état dit excité (Figure 7). Pendant cette courte période d'excitation, une partie de l'énergie est transférée à une molécule fluorescente voisine ou dissipée par les collisions moléculaires. L'énergie résiduelle est alors émise par la molécule fluorescente sous forme d'un photon. La molécule fluorescente revient alors à son état dit relaxé (Figure 7). Le photon émis par la molécule fluorescente excitée, a une longueur d'onde plus longue et possède un niveau d'énergie plus faible que le photon d'excitation reçu. Par conséquent, la fluorescence émise peut être distinguée de la lumière d'excitation [264, 265]. L'excitation et l'émission de photons à partir d'un fluorophore est cyclique. Le fluorophore peut donc être excité plusieurs fois, jusqu'à son endommagement irréversible [264].

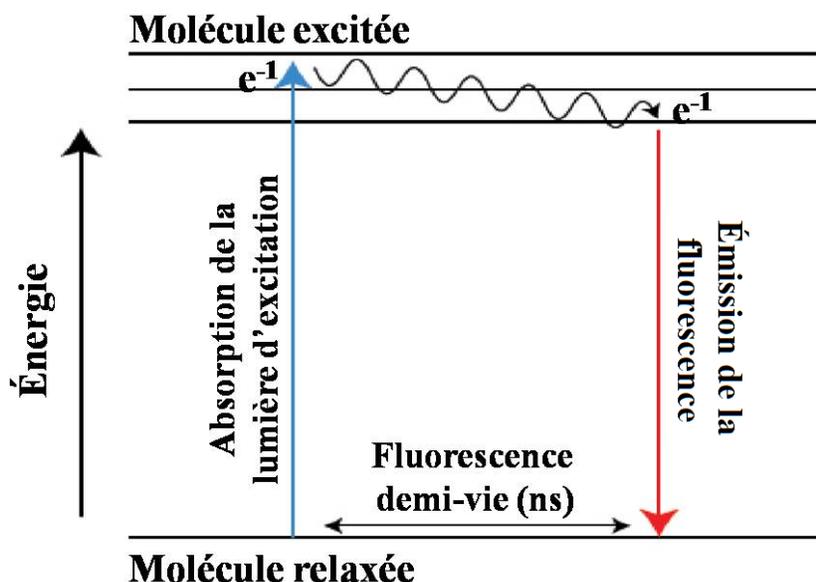


Figure 7. Schéma représentatif du diagramme de Jablonski décrivant l'état d'énergie d'une molécule et de sa transition électronique qui explique les mécanismes d'émission de la lumière fluorescente. Adapté de [265]

8.2. Mesure de la luminosité (brillance) du fluorophore

La lumière fluorescente émise par un fluorophore donné est déterminée par le coefficient d'extinction molaire et le rendement quantique, qui tous deux sont des paramètres spécifiques pour chaque fluorophore. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est défini comme la quantité de lumière qui peut être absorbée par une substance fluorescente à une longueur d'onde donnée et qui est mesurée en $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Le rendement quantique (Φ) est défini comme étant le nombre de photons qui sont émis par la substance fluorescente, divisé par le nombre de photons qui sont absorbés. Ce calcul fournit l'efficacité d'un fluorophore sur un maximum de 1. La luminosité d'un fluorophore est ensuite calculée comme le produit de ϵ et Φ . Ces paramètres sont souvent utilisés dans plusieurs applications pour mesurer l'intensité de fluorescence émise et la localisation de la source fluorescente (par exemple dans les applications d'imagerie moléculaires) [264, 265].

8.3. Gamme de la lumière fluorescente

Le spectre électromagnétique de la lumière constitue la plus grande gamme de toutes les longueurs d'onde du rayonnement électromagnétique, allant du visible à l'invisible (Figure

8). Au début, les applications en recherche basées sur l'utilisation des molécules fluorescentes étaient concentrées sur les fluorophores qui émettent seulement dans le domaine du spectre électromagnétique visible (390-600 nm). Les progrès technologiques permettent maintenant la détection des spectres émis par des fluorophores au-delà des limites du visible, dans les gammes du spectre électromagnétique ultraviolet (UV) et dans l'infrarouge (IR). Ces nouveaux fluorophores (comme le Cy5.5, ICG, etc.) et les nouveaux détecteurs appropriés offrent une plus grande variabilité et polyvalence [264, 266].

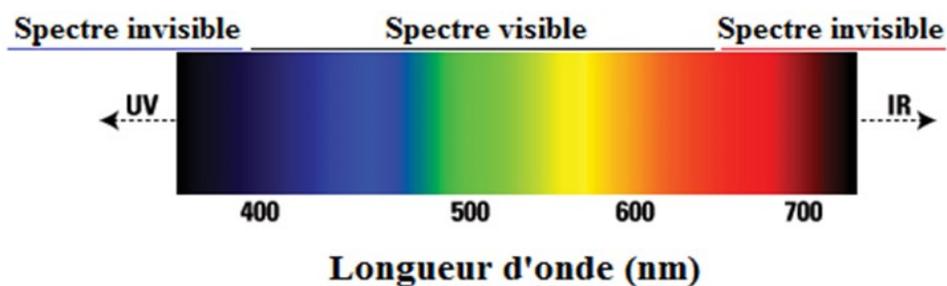


Figure 8. Le spectre électromagnétique de la lumière. Adapté de [264]

8.4. Principe d'auto-inhibition de la fluorescence (quenching)

L'émission de la fluorescence par une molécule fluorescente peut être directement influencée par l'interaction avec d'autres molécules fluorescentes ou non fluorescentes [267]. Ces phénomènes peuvent mener vers l'inhibition (*quenching* en anglais) de la fluorescence émise par le fluorophore excité [268]. L'inhibition de la fluorescence est utilisée dans plusieurs applications, comme la détermination de l'état d'activation d'une protéine, la caractérisation de l'expression d'un gène, ou encore les études sur l'activité enzymatique ou l'imagerie moléculaire [268, 269].

Le degré d'inhibition de la fluorescence dépend de la nature de la molécule inhibitrice (fluorophore ou non-fluorophore), de la longueur d'onde de l'énergie émise par la molécule fluorescente et de la longueur d'onde d'excitation où la molécule inhibitrice peut absorber l'énergie. Les mécanismes d'inhibition de la fluorescence comprennent (Figure 9) : le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) et l'inhibition par contact ou par collision [268].

Le FRET est défini comme un transfert d'énergie non radiatif (sans émission de lumière) résultant d'une interaction dipôle entre deux molécules (donneur et accepteur d'énergie). Ce phénomène physique nécessite une compatibilité énergétique entre ces molécules. Cela signifie que la molécule donatrice doit émettre généralement à des longueurs d'onde plus courtes qui se chevauchent avec les longueurs d'onde auxquelles l'accepteur absorbe l'énergie [270]. Le phénomène de FRET est aussi dépendant de la distance entre le donneur d'énergie (ou fluorescence) à l'état excité et de l'accepteur.

Le phénomène de FRET se produit alors quand le donneur (fluorophore) et l'accepteur (un quencher ou un autre fluorophore) se trouvent à une distance d'environ 10 à 100 Å (Angström). Dans cette gamme de distances, lorsque le donneur transfère son énergie par résonance à l'accepteur, une diminution de la fluorescence émise par le donneur (fluorophore) est observée. Une plus grande séparation spatiale du donneur et de l'accepteur (au-delà de 100 Å) conduit au rétablissement de l'émission de la fluorescence par le donneur [268, 270]. L'inhibition par contact se produit lorsqu'un fluorophore est complexé avec une molécule inhibitrice ou (quencher) avant l'excitation du fluorophore; en raison d'un contact direct de la molécule fluorescente avec l'autre molécule, l'énergie de l'excitation est immédiatement transférée à la molécule de contact et sera perdue dans la production de chaleur [265, 268].

L'inhibition par collision se produit quand un fluorophore excité réagit avec une molécule ou un agent inhibiteur de fluorescence en solution, ce qui provoque immédiatement le transfert d'énergie à la molécule de contact et le passage à l'état de relaxation de la molécule fluorescente excitée [268, 271].

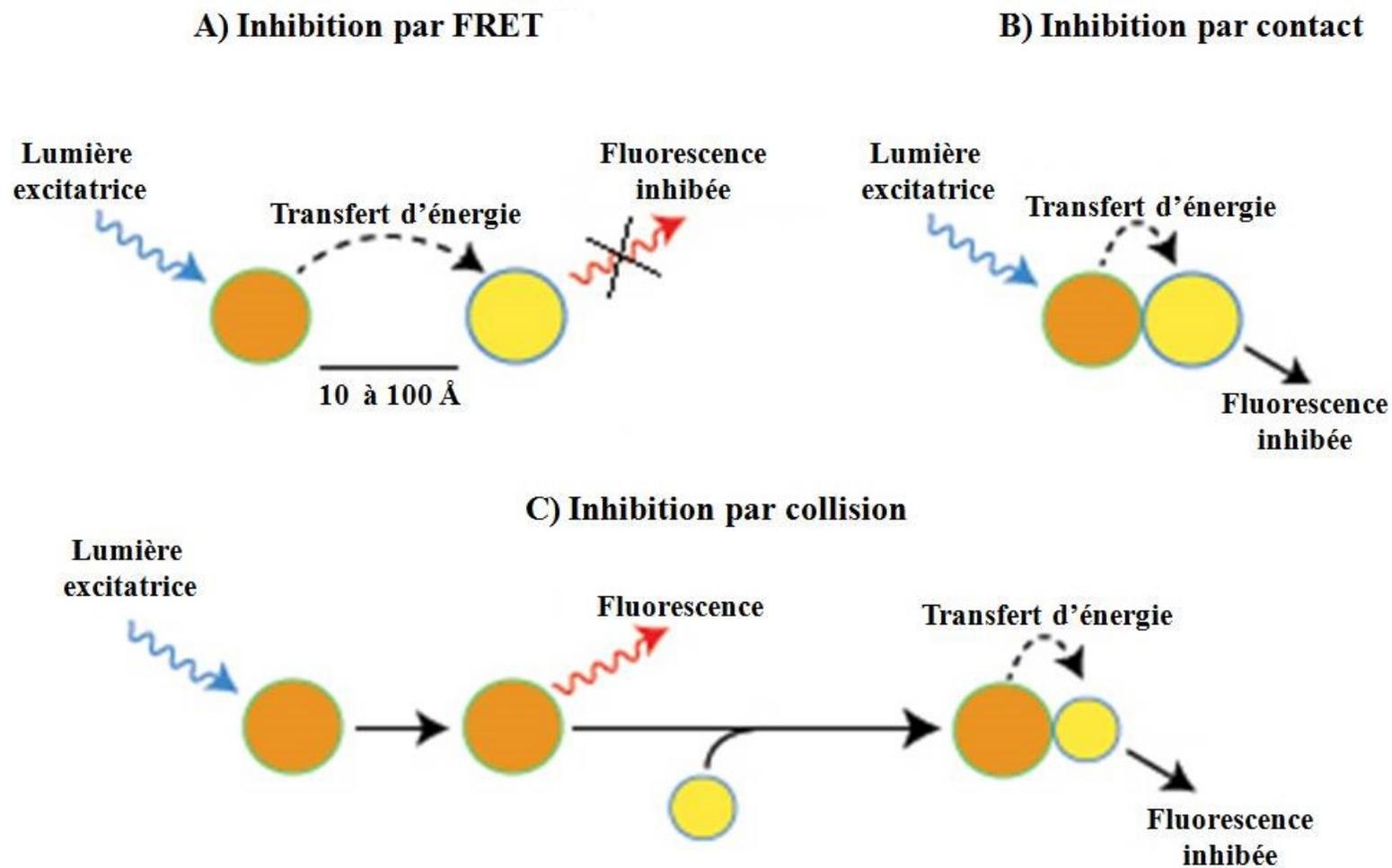


Figure 9. Les mécanismes d'inhibition de la fluorescence comprennent : A) le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET), B) l'inhibition par contact, C) l'inhibition par collision. Adapté de [272]

8.5. Classes et caractéristiques des fluorophores

Les avancées en chimie ainsi que les découvertes techniques ont alimenté le développement de différents types de fluorophores. Aujourd'hui, un vaste choix de fluorophores permet une grande flexibilité dans les applications en recherche. Les fluorophores peuvent être divisés en deux groupes :

- Fluorophores organiques, parmi lesquels on retrouve entre autres les :
 - Fluorophores synthétiques (fluorescéine, rhodamine, cyanines, etc) [273].
 - Protéines fluorescentes (GFP, phycobiliprotéines, etc) [269].
- Fluorophores inorganiques (Nanoparticules de carbone, de silice, les lanthanides, etc.)

De taille nanométrique (2-50 nm), semi-conducteurs, ils émettent une fluorescence à des longueurs d'ondes en fonction de leur taille lorsqu'ils sont excités. Les plus petits émettent une énergie plus élevée que les plus grands. Parce que la taille des fluorophores inorganiques (nanoparticules) peut être étroitement contrôlée, il y a une plus grande spécificité pour les longueurs d'onde d'excitation et d'émission distincte comparée aux fluorophores synthétiques [274, 275].

Toutefois, les descriptions des classes de fluorophores sont très nombreuses dans la littérature. Il est de ce fait impossible de faire une présentation exhaustive de tous les fluorophores connus. Je présenterai ici les grandes classes de fluorophores organiques et surtout celles liées à mon projet de maîtrise.

8.5.1. Fluorophores organiques

8.5.1.1. Fluorophores organiques synthétiques

Les fluorophores organiques synthétiques (Figure 10), telles que la fluorescéine et la rhodamine, ont été parmi les premiers composés fluorescents utilisés dans la recherche biologique [276]. Plusieurs dérivés de ces composés originaux ont été produits par la suite pour améliorer leur photostabilité et leur solubilité [265]. Ces fluorophores ont également subi des modifications pour acquérir des capacités de bioconjugaison, en particulier l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

La petite taille de ces substances fluorescentes constitue un avantage par rapport à la tétraméthyl rhodamine isothiocyanate (TRITC). La taille des protéines fluorescentes (comme

la GFP), surtout pour les stratégies de bioconjugaison [265]. En effet, le FITC et le TRITC peuvent être couplés à des macromolécules, comme des anticorps, la biotine, l'avidine et des protéines diverses (albumines, caséines, élastines) sans interférer significativement avec leur fonction biologique [277, 278]. Une grande variété de fluorophores organiques fut développée par la suite, avec des caractéristiques de spectres d'excitation/émission très vastes, des rendements quantiques et des coefficients d'extinction optimaux. L'une des classes qui nous a intéressé dans notre étude est la classe des cyanines, spécialement celle du Cy5.5-NHS-ester [265, 266, 279].

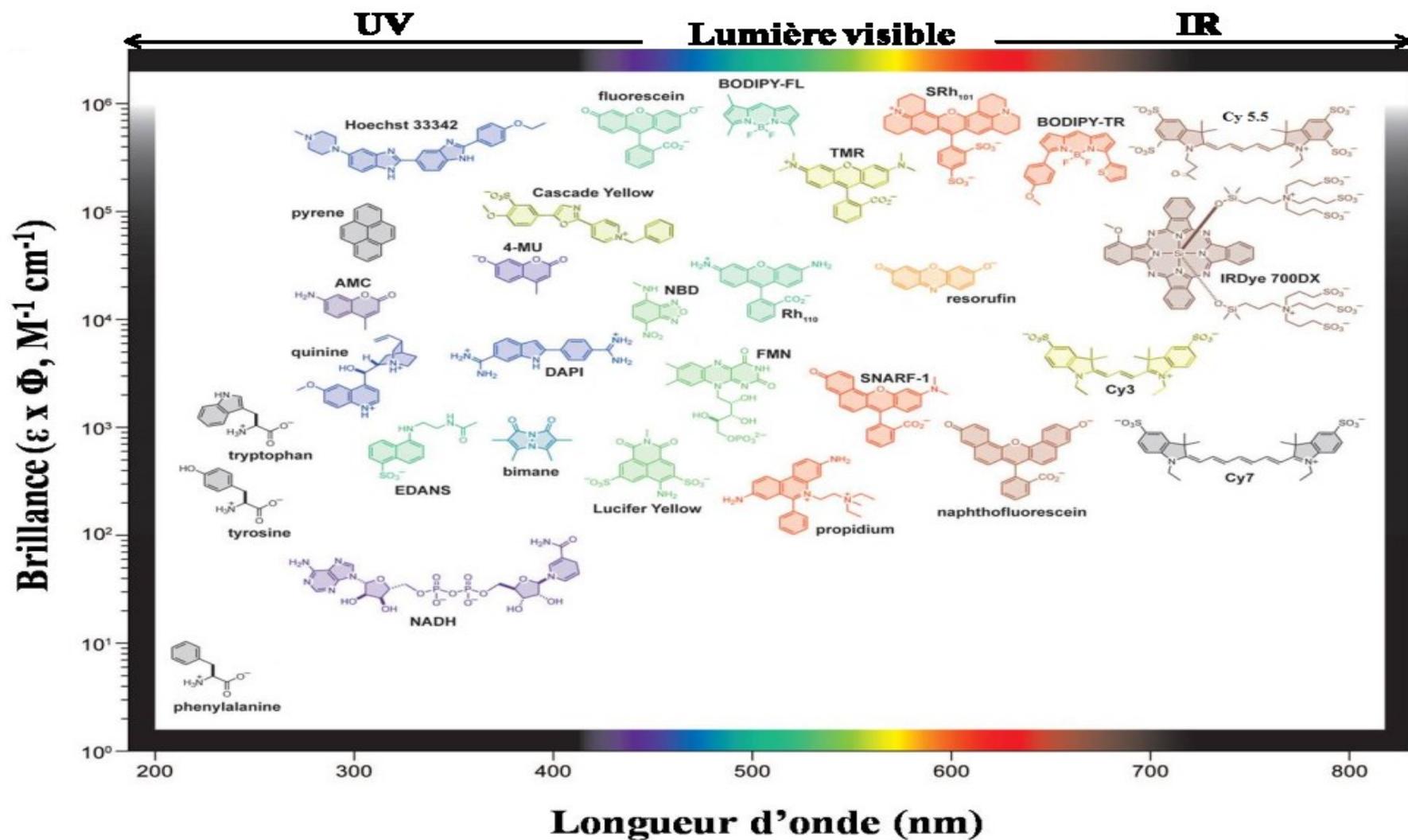


Figure 10. Principaux fluorophores organiques, répartis selon leur brillance en fonction de leur longueur d'onde d'émission. (Échelle d'ordonnée logarithmique) Adapté de [265]

8.5.1.1.1. Les fluorophores de type cyanines (Cy)

Les cyanines (Cy) sont des fluorophores synthétiques de la famille des polyméthines. Ils se composent d'une chaîne de polyméthine entre deux atomes d'azote ($R_2-N-(CH=CH)_n-CH=N^+ R_2$) et ressemblent au pigment rétinale, la rhodopsine. Les cyanines ont de nombreuses utilisations comme marqueurs fluorescents (d'ADN, de protéines), et sont particulièrement utilisés en imagerie moléculaire [265]. Les dérivés de cyanines utilisés dans le domaine de la recherche moderne sont basés sur une structure de sulfoindocyanine et sont plus connus sous le pseudonyme de " CyX ". Le X représente le nombre de carbone contenu dans une chaîne polyméthine et qui sépare les noyaux indoles. C'est ainsi que plusieurs classes de cyanines (Tableau 7) ont été développées (Cy2, Cy3, Cy5, Cy7, etc.). Ces structures différentes permettent d'obtenir des propriétés différentes conférant une meilleure flexibilité quant à la couverture d'un large spectre allant de l'IR (Cy7) à l'UV (Cy2). D'autres modifications ont permis de cibler des longueurs d'onde d'une façon contrôlée. Par exemple, l'introduction d'un anneau benzo condensé a permis un déplacement précis de 20 à 30 nm dans les longueurs d'ondes d'absorption et d'émission. Cette modification structurale est désignée avec un suffixe "0.5" (par exemple, le Cy5.5) [265].

Les cyanines sont très utiles comme ligands biomoléculaires et sont maintenant utilisés comme des fluorophores standards pour des techniques d'analyse comme les puces à ADN, les techniques d'analyse d'interactions protéiques et aussi d'analyse d'activité des protéases. Ils sont aussi souvent utilisés pour des expériences de FRET et peuvent être utilisés dans la synthèse de sondes fluorescentes pour des techniques d'imageries à haute résolution [265, 280].

Fluorophores	Couleur	$\lambda_{\text{absorption}}$ (nm)	$\lambda_{\text{émission}}$ (nm)	(Φ)	(ϵ) M ⁻¹ cm ⁻¹
Cy 2	Vert	489	506	0.12	150000
Cy 3	Rouge	550	570	0.7	130000
Cy 3.5	Rouge	581	596	0.14	120000
Cy 5	Bleu	649	670	0.27	250000
Cy 5.5	Bleu	675	694	0.23	190000
Cy 7	Violet	743	767	0.28	200000

Tableau 7. Caractéristiques spectrales des fluorophores de la famille des cyanines.

Adapté de [281]

Avec une charge nette négative, le Cy5.5 constitue un fluorophore idéal pour la synthèse de sonde bioactivable [280]. Ces caractéristiques spectrales sont dans l'ordre du proche infrarouge, ce qui favorise l'émission de la fluorescence dans les plages de faible absorption tissulaire, d'où son utilité dans l'imagerie *in vivo* et *ex vivo* [282]. Il possède aussi un bon rendement quantique (Φ) de 0,23. Il se caractérise par un déplacement de Stokes faible (20 nm), qui représente la différence entre les longueurs d'onde d'émission et d'excitation. Un déplacement de Stokes faible, favorise l'auto-inhibition de l'émission de la fluorescence par le phénomène de FRET. Aussi, le Cy5.5 se caractérise par une grande stabilité (résiste au photoblanchiment), une bonne biocompatibilité ainsi que la disponibilité de dérivés monofonctionnels de conjugaison (de type NHS ester et maléimide) [265, 275].

8.5.1.2. Protéines fluorescentes

Les protéines fluorescentes sont aussi connues sous le nom de fluorophores biologiques. Leur première utilisation dans les applications de recherche datent des années 90, lorsque la protéine fluorescente verte (GFP) a été clonée à partir de la méduse *Aequorea victoria* et utilisée comme un rapporteur pour les études d'expression génique [283]. Depuis ce temps, des dérivés de la GFP originale et des phycobiliprotéines (allophycocyanine, phycocyanine, phycoérythrine, etc.), ainsi que de nombreuses autres protéines ont été conçues pour une utilisation dans des systèmes d'expression biologique. L'avantage de ce type de fluorophores est que des plasmides d'expression peuvent être introduits dans des bactéries, des cellules, des organes ou des organismes entiers, pour diriger l'expression de ce fluorophore seul ou fusionné à une protéine d'intérêt dans le contexte des processus biologiques étudiés [269]. L'utilisation de protéines fluorescentes a ses limites. La taille de la protéine fluorescente peut modifier la fonction biologique normale de la protéine cellulaire. En outre, les fluorophores biologiques ne fournissent pas typiquement le niveau de photostabilité et de sensibilité offerte par les molécules fluorescentes synthétiques [265, 269].

8.6. Principe de synthèse des sondes bioactivables

Plusieurs sondes activables basées sur l'utilisation de protéines ou de séquences peptidiques conjuguées à des fluorophores ont été développées récemment pour les études d'activités protéasiques [284-286]. Celles-ci sont largement basées sur des mécanismes d'auto-inhibition de la fluorescence de type FRET [287]. La synthèse des sondes protéiques

bioactivables se fait généralement par saturation de la protéine ciblée avec un nombre important de molécules d'un même fluorophore (Figure 11). Cependant, dans le cas d'une sonde peptidique, la synthèse se fait le plus souvent par la conjugaison d'un fluorophore et d'une molécule inhibitrice de fluorescence "quencher" chacun sur une des deux terminaisons (N- ou C-terminal) [272]. Un clivage enzymatique de ces sondes (Figure 11) résulte dans l'activation de l'émission de la fluorescence suite à l'éloignement les uns des autres des fragments (protéiques ou peptidiques) couplés avec le(s) fluorophore(s) [288]. Parmi les différents choix de fluorophores existants, les sondes couplées avec des fluorophores qui émettent la fluorescence dans le spectre du proche infrarouge permettent une meilleure pénétration des couches tissulaires, ainsi qu'un faible bruit de fond pour les applications d'imagerie moléculaire. Ils sont aussi plus efficaces dans l'auto-inhibition de la fluorescence des uns et des autres par le phénomène de FRET [289]. Le fluorophore proche infrarouge de type cyanine 5.5 (Cy5.5) est l'un des meilleurs exemples à cet effet [290].

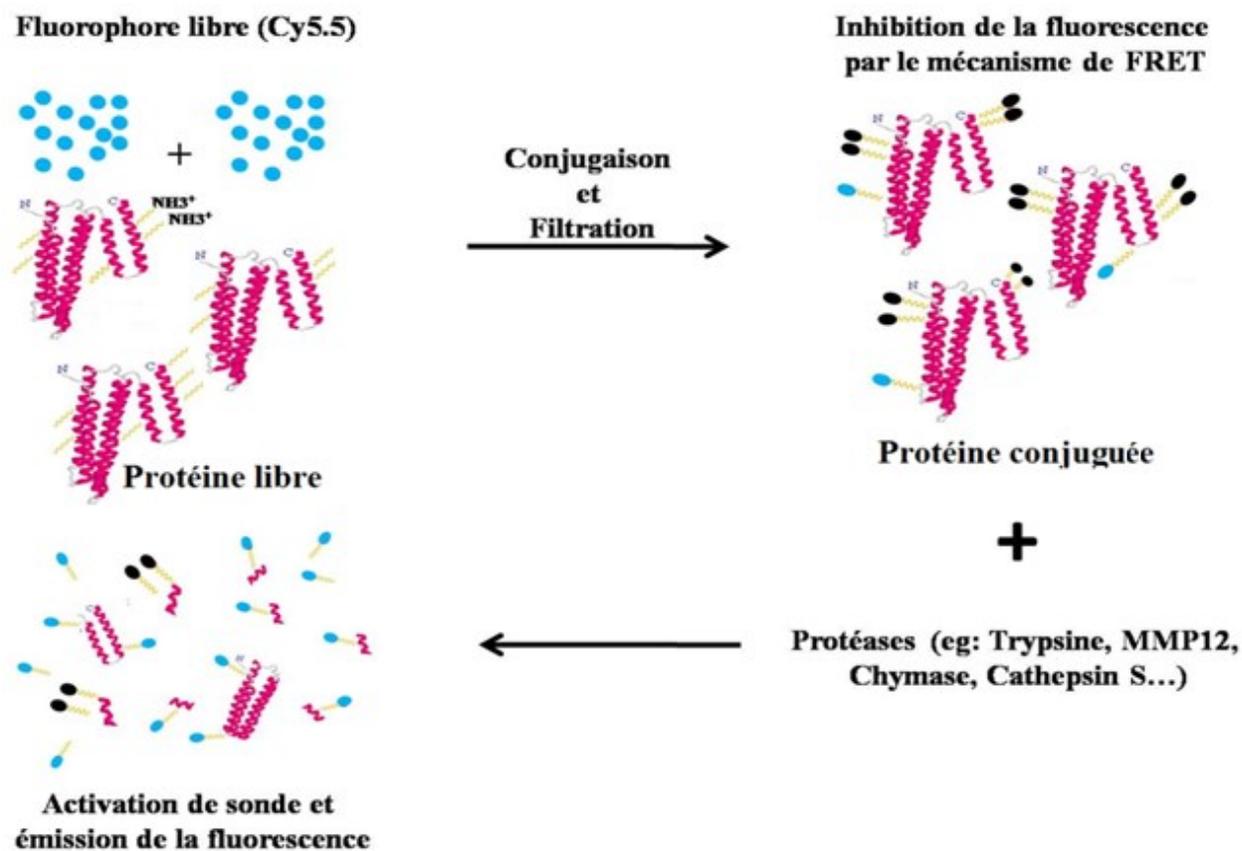


Figure 11. Principe de synthèse des sondes bioactivables basé sur l'utilisation d'une protéine native. Adapté de [291]

8.6.1. Types de réaction de conjugaison

Plusieurs méthodes sont utilisées dans les réactions de conjugaison d'un fluorophore avec une protéine cible ou une chaîne polypeptidique. Nous avons retenu dans ce chapitre les deux méthodes les plus fréquentes, les réactions qui ciblent la fonction amine primaire et celles qui ciblent la fonction thiol.

8.6.1.1. Dérivés réactifs ciblant les fonctions amines primaires

Les techniques les plus simples et les plus polyvalentes pour la conjugaison d'un fluorophore sur un peptide ou une protéine impliquent l'utilisation de groupements chimiques incorporés au sein du fluorophore qui vont cibler et interagir avec les fonctions amines primaires (-NH₂) [272, 292]. Les amines primaires existent à l'extrémité N-terminale de chaque chaîne polypeptidique et dans la chaîne latérale de résidus d'acides aminés comme la lysine. Les lysines, constituent une cible idéale vu leur présence en quantités importantes dans presque toutes les protéines connues [292].

Les amines primaires (-NH₂) sont chargées positivement à un pH physiologique; par conséquent, elles sont dirigées principalement vers la face extérieure des protéines où elles sont facilement accessibles aux fluorophores de conjugaison [272].

En outre, parmi les groupes fonctionnels disponibles dans des échantillons biologiques ou de protéines typiques, les groupements amines primaires, l' α -amine et l' ϵ -amine dans une protéine sont des nucléophiles efficaces [293]. Ces groupements peuvent interagir avec une multitude de groupements réactifs des fluorophores de synthèse. En effet, il existe de nombreux groupements réactifs chimiques de synthèse qui peuvent mener à la formation de liaisons covalentes de type amide stable avec les amines primaires (Figure 12). Il s'agit entre autres des isothiocyanates, des isocyanates, les acyles d'azides, les *N*-hydroxysuccinimides esters (NHS-esters), les sulfonyles de chlorures, les aldéhydes, les glyoxals, les époxydes, les carbonates, les carbodiimides, les anhydrides et les fluorophényl-esters [292].

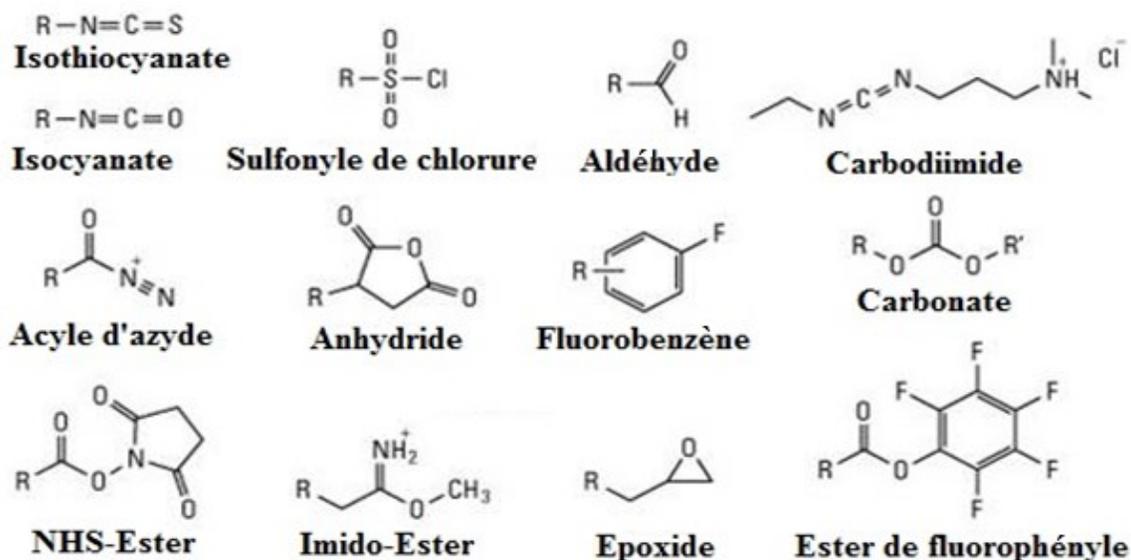


Figure 12. Type de groupements réactifs chimiques de synthèse qui peuvent formé des liaisons covalentes de type amide stable avec les amines primaires. Adapté de [272]

Les mécanismes de conjugaison impliquant les groupements réactifs chimiques du fluorophore sont des réactions pH dépendantes. Ce dernier doit être légèrement alcalin pour obtenir des résultats de conjugaisons optimaux. La réaction de conjugaison est généralement traduite par une acylation ou une alkylation de la fonction amine. Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à l'utilisation du Cy5.5-N-hydroxysuccinimide (NHS) esters. Les NHS-ester sont probablement les groupements réactifs les plus utilisés dans les réactions d'acylation. Les NHS-ester réagissent avec les molécules nucléophiles ce qui se traduit par une libération du groupement NHS du fluorophore. Ceci favorise une liaison amide stable avec la fonction amine primaire (groupements ϵ -amine des chaînes latérales des lysines) ou secondaire (N-terminal libre d'une chaîne polypeptidique ou d'une protéine) (Figure 13). La réaction doit être à un pH optimal (8 à 9). À ce pH, les groupements amines des protéines sont dans une large mesure non protonées et deviennent très réactifs vis-à-vis du NHS-ester [294-296].

8.6.1.2. Les dérivés réactifs au sulfhydryle (thiol)

Habituellement, le marquage de protéines est dirigé aux amines primaires en utilisant des réactifs NHS-ester. Toutefois, certaines protéines peuvent perdre une partie de leurs fonctions biologiques lorsqu'elles sont marquées au niveau de leurs amines primaires. De ce fait, des dérivés réactifs à la fonction sulfhydryle (thiol ou -SH) sont utilisés comme

alternative pour la conjugaison d'un fluorophore sur des protéines. Parmi les dérivés réactifs à la fonction sulfhydryle (-SH), les groupements maléimides sont les plus connus. Ces groupements réagissent spécifiquement avec les groupes sulfhydryle (-SH) des acides aminés cystéines pour former des liaisons thioéther stables et non réversibles (Figure 13). Les réactions de conjugaison sont optimales à des conditions de pH presque neutre (6,5 à 7,5). Dans le cas d'une protéine qui contient des liaisons disulfures retrouvées entre deux cystéines, ces liaisons disulfures doivent être d'abord réduites en sulfhydryles libres, afin de permettre l'interaction avec les réactifs maléimides du fluorophore [272, 297].

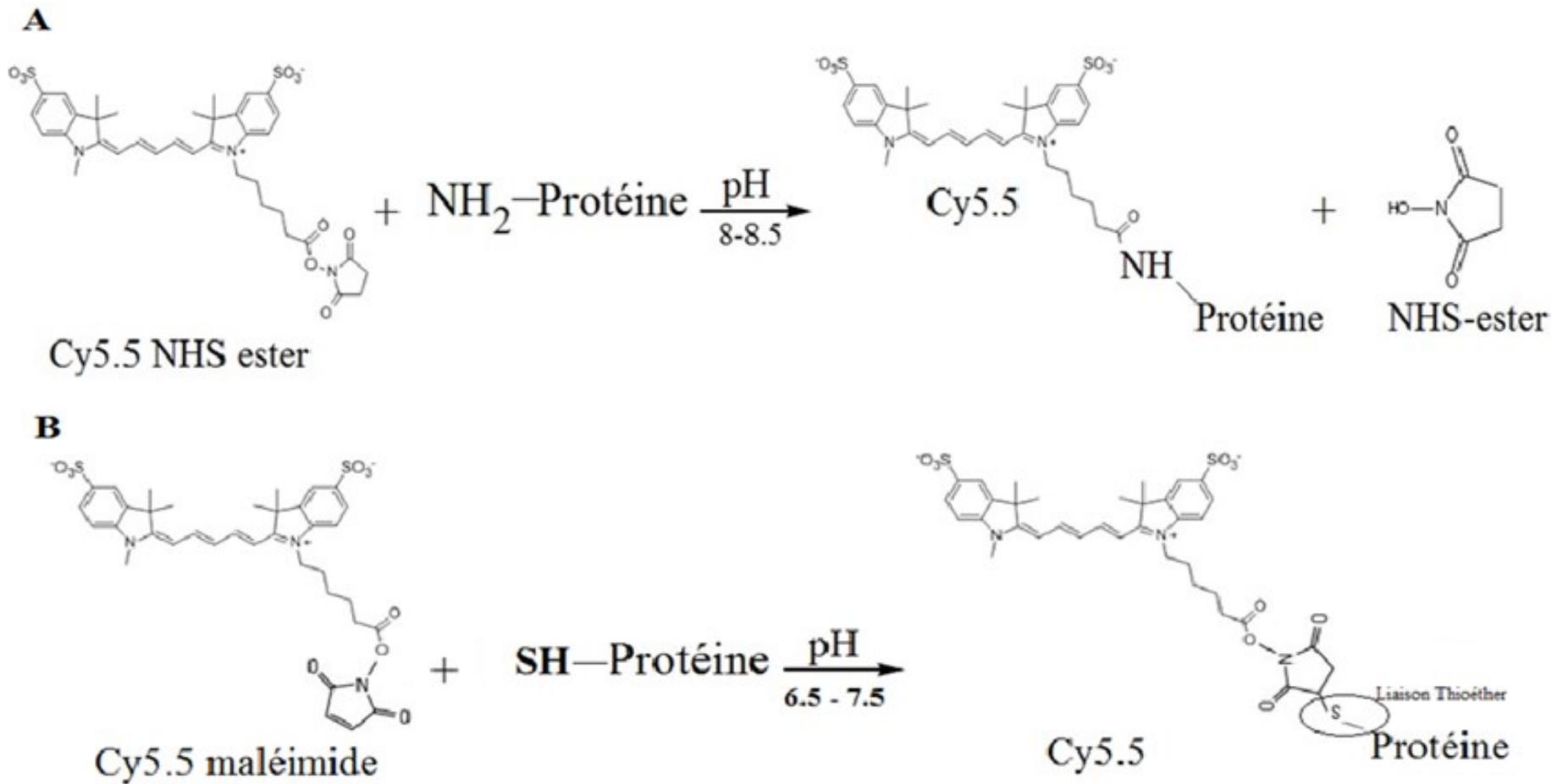


Figure13. Types de réaction de conjugaison entre protéine et fluorophore. A). Réaction ciblant la fonction amine primaire de la protéine. B) Réaction ciblant la fonction thiol de la protéine. Adapté de [272].

9. Les réactions enzymatiques (principes et méthodes d'analyse)

Presque toutes les réactions chimiques qui ont lieu dans les systèmes biologiques sont catalysées par des enzymes qui constituent la classe de protéines à la fois la plus vaste et la plus spécialisée. Les enzymes catalysent des milliers de réactions chimiques qui constituent le métabolisme intermédiaire des cellules. Le clivage de liaisons peptidiques est une des réactions enzymatiques les plus fréquentes chez les protéines et est généralement catalysé par les protéases [298]. Dans ce chapitre introductif, nous aborderons uniquement les paramètres cinétiques des mécanismes enzymatiques les plus simples.

9.1. Caractérisation des modèles de cinétiques enzymatiques

9.1.1. Modèle de base de la cinétique enzymatique

En 1902, Victor Henri et Adrian Brown étaient les premiers à décrire le premier modèle de base d'une cinétique enzymatique en examinant la vitesse d'hydrolyse du saccharose par une invertase.



Ils suggéraient que dans une réaction enzymatique, la formation d'un complexe enzyme-substrat était nécessaire pour interpréter la forme hyperbolique des courbes de vitesse initiale (V_0) de la réaction en fonction de la concentration initiale du substrat (S_0), les autres paramètres étant constants (concentration enzyme (E), température (T°), pH, pression). La vitesse de la réaction devient alors indépendante de la concentration du substrat ou d'ordre zéro par rapport au substrat au-dessus d'une certaine concentration [299, 300]. La réaction globale proposée est composée de deux réactions élémentaires : le substrat forme d'abord un complexe avec l'enzyme, puis ce complexe se décompose en produit et enzyme [301]. Soit :



Où **E**, **S**, **ES**, et **P** symbolisent l'enzyme, substrat, le complexe enzyme-substrat et le produit, respectivement. Selon ce modèle, lorsque la concentration du substrat devient suffisamment importante afin de capter toute l'enzyme sous forme d'un complexe **ES**, la deuxième étape de

la réaction est limitante et la réaction globale devient insensible aux augmentations supplémentaires en concentration de substrat [299, 302].

9.1.2. Modèle de cinétique Michaélienne

En 1913, Maud Menten et Leonor Michaelis résolurent le système réactionnel (Figure 14) en posant les hypothèses simplificatrices suivantes [299] :

1) Les mesures de cinétique sont toujours faites pour des concentrations de produit très faible, on fait donc la mesure de la vitesse initiale (V_0) pour $[P] \cong 0$ et $[S] \cong [S]_0$ où $[S]_0$ est la concentration du substrat à l'instant initial de la réaction.

2) La concentration du substrat $[S]_0$ doit être plus grande que celle de l'enzyme $[E]_0$.

3) Lors de l'addition de l'enzyme au substrat, il s'établit un équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe enzyme-substrat (ES), c'est l'hypothèse du pré-équilibre.

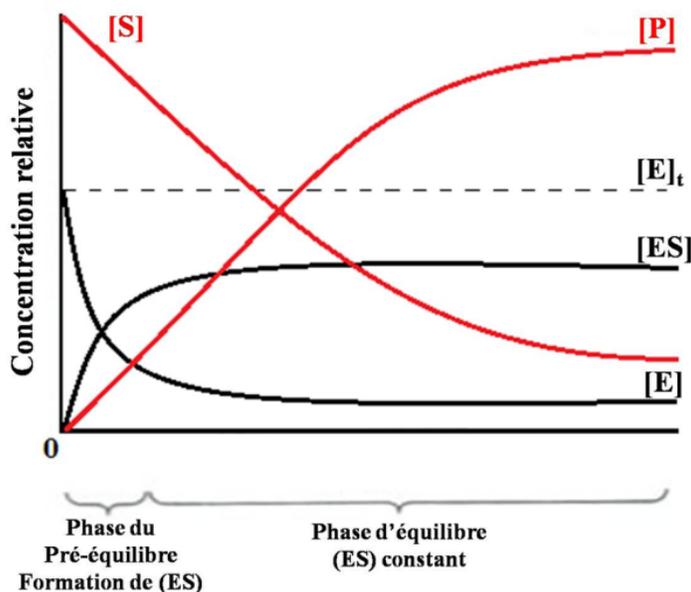


Figure 14. Illustration de la stratégie visant à développer des modèles de dosages d'activités enzymatiques. Le dosage des enzymes peut être élaboré pour mesurer soit la concentration de l'enzyme libre, l'épuisement du substrat, ou la formation du produit. Adapté de [302]

Dans le modèle Michaélien (Figure 15), les mesures de l'apparition du produit ou de disparition du substrat au cours du temps (dans les conditions expérimentales optimales de

température, pH, temps) se font dans les conditions où $[S] \gg [P]$, soit au tout début de la réaction. Dans ces conditions, $[S]$ et $[ES]$ sont considérés comme des constantes, c'est la phase stationnaire [299, 300]. On observe alors deux parties dans la courbe de la réaction enzymatique [299]. La première partie se caractérise par une pente droite et constante où la vitesse de réaction est stable, la réaction est alors dite d'ordre 1 où la vitesse initiale de la réaction est proportionnelle à la concentration du substrat [299, 303]. Dans la deuxième partie de la courbe, on observe une apparition progressive d'un plateau qui se caractérise par une diminution progressive de la vitesse de réaction dû à l'épuisement du substrat ou une désactivation de l'enzyme. Au cours de cette phase, les conditions initiales ne sont plus vérifiées, la réaction est alors dite d'ordre 0 où la vitesse de réaction est indépendante de la concentration du substrat [299]. L'équation pour les mesures des paramètres de cinétique enzymatique selon le modèle Michaélien est définie comme suit [303]:

$$V_0 = V_{\max} [S] / K_m + [S] \text{ ou } V_0 = V_{\max} / 2 \text{ si } K_m = [S]$$

V_0 : vitesse initiale de la réaction ; V_{\max} : vitesse maximale de la réaction

K_m : constante de Michaelis, représente l'affinité de l'enzyme au substrat.

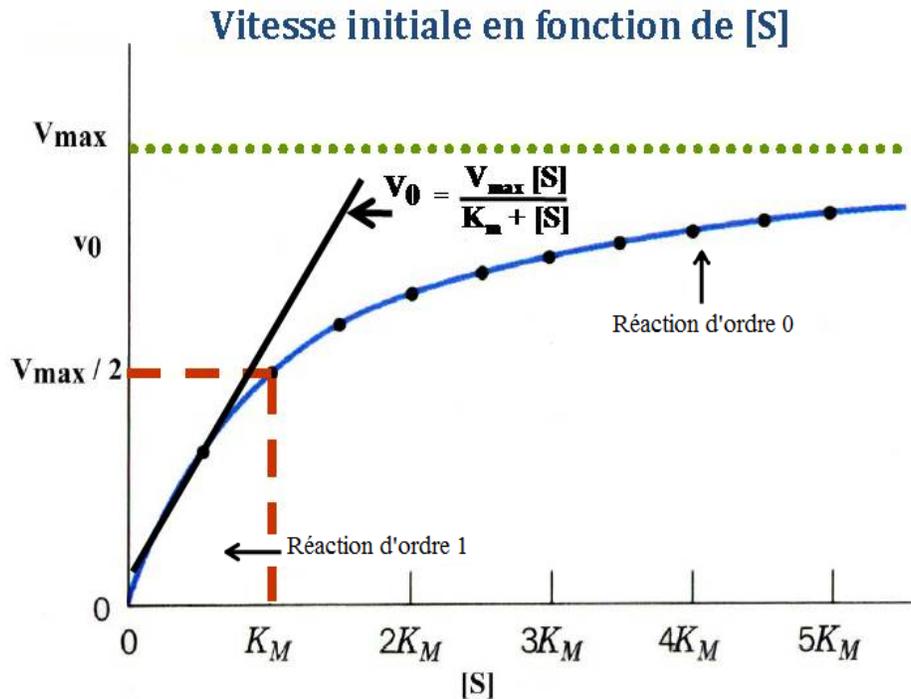


Figure 15. Modèle théorique pour les mesures des paramètres de cinétiques enzymatiques selon le modèle Michaélien. Adapté de [300].

9.1.2.1. Influence de [E] sur la vitesse de la réaction enzymatique

Lorsqu'on augmente progressivement la concentration en enzyme, tout en maintenant une concentration de substrat constante, il y a proportionnalité entre la [E] et la quantité de produit formé, en condition de vitesse initiale. La courbe de vitesse est alors $V = f([E])$ qui représente une droite ($V = d[P]/dt$), en d'autres termes, la mesure de la vitesse initiale correspond à la pente de la courbe dans la partie qui représente un tracé de droite. Cependant, lorsque les conditions de vitesses initiales ne sont plus vérifiées, il n'y a plus proportionnalité et le plateau est atteint. Théoriquement, toutes les courbes admettent le même plateau, mais dans la réalité, à cause de problèmes de solubilité, d'inactivation des enzymes dans le temps, il est très difficile d'obtenir un plateau expérimental correct [299].

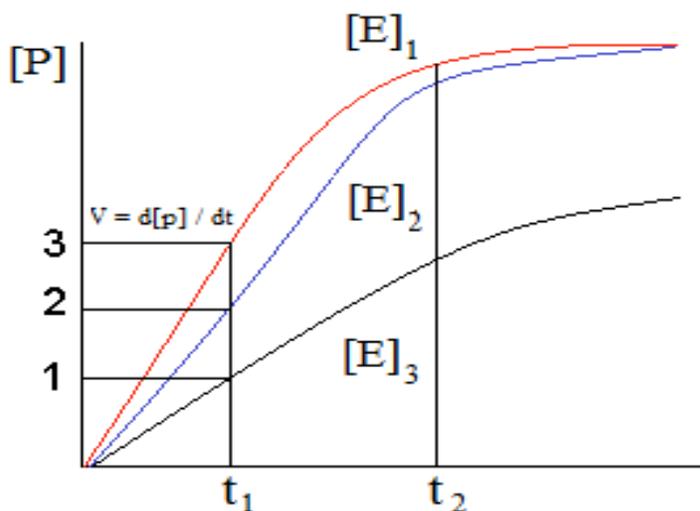


Figure 16. Modèle théorique de l'impact de la concentration de l'enzyme sur la vitesse de la réaction enzymatique. Adapté de [299].

9.1.3. Modèle de Briggs-Haldane

En 1925, George Briggs et John Haldane ont montré que l'on pouvait obtenir une équation similaire à celle de Michaelis-Menten mais avec des approches moins restrictives. En fait, ils n'ont pas trouvé nécessaire de poser la condition d'établissement d'un équilibre rapide entre les formes libres de l'enzyme, du substrat et du complexe. Ils ont simplement supposé que le système réactionnel est dans un état stationnaire, dès le début de la réaction. Ceci signifie que la vitesse de disparition du complexe (ES) est nulle, donc sa concentration est constante. C'est

le cas de la plupart des expériences de cinétique, où on peut donc considérer qu'après un état pré-stationnaire très court, l'état stationnaire est atteint [299].

9.2. Mesure de l'activité enzymatique par la méthode de cinétique

Le développement des modèles de cinétiques enzymatiques permet aujourd'hui d'analyser, de doser et de caractériser les protéases *in vitro* par deux techniques de cinétique : les cinétiques en temps réel et les cinétiques à temps fixe [300]. Dans les deux cas, la technologie a mis au point des appareils comme les fluoromètres ou *dispositifs* à transfert de charge (DTC) (pour charge-coupled device CCD en anglais). Ces derniers détectent selon la nature du substrat utilisé, soit la fluorescence ou la bioluminescence émise durant la digestion du substrat par une protéase, dans les essais *in vitro* [302]. Par la suite, la mesure des paramètres de vitesse initiale, de K_m ou encore de K_{cat} (le nombre d'événements de clivage du substrat par la protéase par unité de temps) permet la caractérisation de l'affinité au substrat et l'efficacité de clivage de la protéase. Les méthodes de cinétique permettent aussi de faire des comparaisons entre plusieurs types de protéases qui peuvent cliver le même substrat [300, 301].

10. Techniques d'analyse de l'activité protéasique en athérosclérose

Plusieurs approches basées sur des techniques moléculaires sont disponibles pour identifier et caractériser les protéases dans des extraits cellulaires et tissulaires. Des techniques comme l'immuno-bavardage de type Northern (Northern-blot) et de PCR comme le RT-qPCR sont utilisées pour quantifier les acides ribonucléiques de type messagers (ARNm) des protéases dans les extraits cellulaires ou tissulaires [304]. Aussi, des techniques de type hybridation *in situ* sont utilisées pour localiser l'expression des ARNm au niveau tissulaire [304]. Cependant, la quantité d'ARNm des protéases ne reflète pas nécessairement la quantité de protéase au niveau protéique et encore moins l'activité protéasique présente dans l'échantillon étudié [305]. Les techniques d'immuno-bavardage de type Western (Western blot) et d'immunohistochimie sont capables de quantifier et localiser respectivement l'expression des protéases au niveau protéique [304]. Cependant, l'ensemble de ces techniques ne fournit pas d'information directe sur l'activité des protéases dans le tissu. Ceci s'explique par le fait que de nombreuses protéases sont synthétisées sous une forme inactive ou pro-enzyme, ce qui nécessite leur activation. En outre, les inhibiteurs de protéases omniprésents dans les tissus

peuvent spécifiquement ou non spécifiquement inhiber les protéases dans leur forme active. Ce qui peut donner des résultats différents entre la quantité versus l'activité des protéases quantifiées par ces techniques [304, 306]. À cette fin, d'autres approches qui utilisent des sondes fluorescentes bioactivables comme source de substrat pour la détection et l'analyse des activités des protéases (telles que la zymographie et l'imagerie moléculaire fluorescente) ont été développées [305, 307].

10.1. Les techniques de zymographie

La méthode de zymographie est une technique biochimique qui a été mise au point pour détecter l'activité d'une protéase dans des homogénats de tissu ou des cryosections de tissu, dans le cas de la zymographie sur gel et de la zymographie *in situ* (ISZ), respectivement. Les approches utilisées en zymographie sont variées. Elles dépendent de la nature du substrat et de la méthode de détection de l'activité de la protéase ciblée [305].

10.1.1. La technique de zymographie *in situ* (ISZ)

L'ISZ est une technique relativement peu coûteuse dont le principe de base est d'utiliser un substrat protéique ou peptidique pour détecter et localiser les activités spécifiques des protéases dans des coupes tissulaires (cryosections de tissus) [304]. Selon la nature du substrat utilisé dans l'ISZ, on peut soit détecter la lyse d'un substrat protéique non marqué ou soit fluorescent bioactivable (par exemple la gélatine ou gélatine-FITC). En ce qui concerne les substrats non marqués, la détection est réalisée par la méthode d'autoradiographie par émulsion en utilisant la microscopie optique. Les zones où le substrat est digéré par une protéase (gélatinase) seront alors représentées par des zones sombres sur un fond blanc. Par contre, dans le cas d'un substrat fluorescent bioactivable, la microscopie à fluorescence permet la détection du signal fluorescent suite à l'activation du substrat causé par l'activité protéasique localisée dans le tissu [304, 305, 307]. Dans les deux approches, le principe général sous-jacent l'ISZ est que le substrat est déposé sur ou sous une coupe de tissu congelée non fixée. Au cours de la période d'incubation qui va suivre, le substrat sera digéré d'une manière temps et dose-dépendante par l'activité protéasique présente dans le tissu. Après la période d'incubation, l'activité protéasique est détectée par microscopie (optique ou à fluorescence),

selon la nature du substrat utilisé. On retrouve dans la littérature plusieurs exemples de substrats fluorescents bioactivables qui ont été utilisés pour la détection de l'activité protéasique au sein du tissu avec la technique de l'ISZ. C'est le cas pour l'élastine-FITC, gélatine-FITC et le collagène (I ou IV)-FITC utilisées respectivement pour la détection par exemple de l'activité, élastinolytique de la MMP-12 et de la cathepsine S, gélatinolytique de la MMP-2 et MMP-9 et collagénolytique des MMP-1, 8, 13 et 18 [304-308].

En outre, l'ISZ est utilisé en complément aux autres approches moléculaires (l'hybridation *in situ*, le Western blot et l'immunohistochimie) ce qui améliore la compréhension du rôle physiologique et pathologique des protéases. Il est cependant important de noter que cette technique a des limitations en ce qui concerne la quantification de l'activité protéasique, comme la faible sensibilité dans le cas où la quantité de protéases ciblées dans le tissu est faible. Par conséquent, la combinaison avec d'autres types de zymographie telle que la zymographie sur gel qui est plus quantitative sera bénéfique [304].

10.1.2. La technique de la zymographie sur gel

La zymographie sur gel est une technique bien établie pour la détection et la quantification de routine de différentes activités de protéases dans des homogénats de tissus, telles que l'activité des gélatinases dans des homogénats de tissus d'artères athérosclérotiques. Cette technique permet l'identification fiable des protéases sur la base de leurs masses moléculaires dans leurs formes inactives et actives, et cela après électrophorèse sur gel des homogénats de tissus étudiés. L'approche utilisée en zymographie sur gel consiste dans l'incorporation d'un substrat protéique ou peptidique (de la même nature que ceux utilisés pour l'ISZ) au sein du gel d'électrophorèse. Ce qui fait que durant la migration des protéines (d'un homogénat de tissu pathologique par exemple), le substrat sera digéré au niveau des zones sur le gel qui correspondent à la masse moléculaire de la protéase. Le signal émis après la digestion localisée du substrat peut être alors détecté et analysé par autoradiographie d'émulsion ou par des scanners de gel à fluorescence.

Toutefois, la zymographie sur gel présente aussi quelques limites. En effet, l'homogénéisation du tissu empêche la localisation histologique de l'activité enzymatique. Aussi, les procédures d'extraction utilisées peuvent d'une façon artificielle activer des protéases qui étaient sous leurs formes pro-enzyme au préalable dans le tissu ou encore rompre

l'interaction de protéases matures, avec leurs inhibiteurs respectifs qui seraient co-localisés dans des tissus intacts, et inactives avant l'homogénéisation mais dont l'activité protéasique serait libérée lors de la séparation des protéines sur gel [304-306].

10.2. Les techniques *in vivo* par imagerie moléculaire fluorescente

Plusieurs techniques d'imagerie non invasives et invasives (Figure 17), à haute résolution ont été développées auparavant pour l'analyse des lésions d'athérosclérose. La majorité de ces techniques s'appuient principalement dans leurs analyses sur des critères anatomiques et structuraux de la plaque athérosclérotique, notamment le diamètre luminal de l'artère atteinte, le volume et l'épaisseur de la plaque, la nature du contenu de la plaque (lipides et calcium). On retrouve parmi ces techniques, l'imagerie intravasculaire utilisant un cathéter à ultrasons (IVUS), l'angioscopie, la tomодensitométrie (TDM ou *computed tomography (CT) scan en anglais*) basé sur l'utilisation des rayons X, la tomographie par cohérence optique (OCT), la spectroscopie optique et l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Cependant, aucune de ces dernières n'est capable de caractériser et quantifier une activité biologique, comme celle des protéases au sein de la plaque [309].

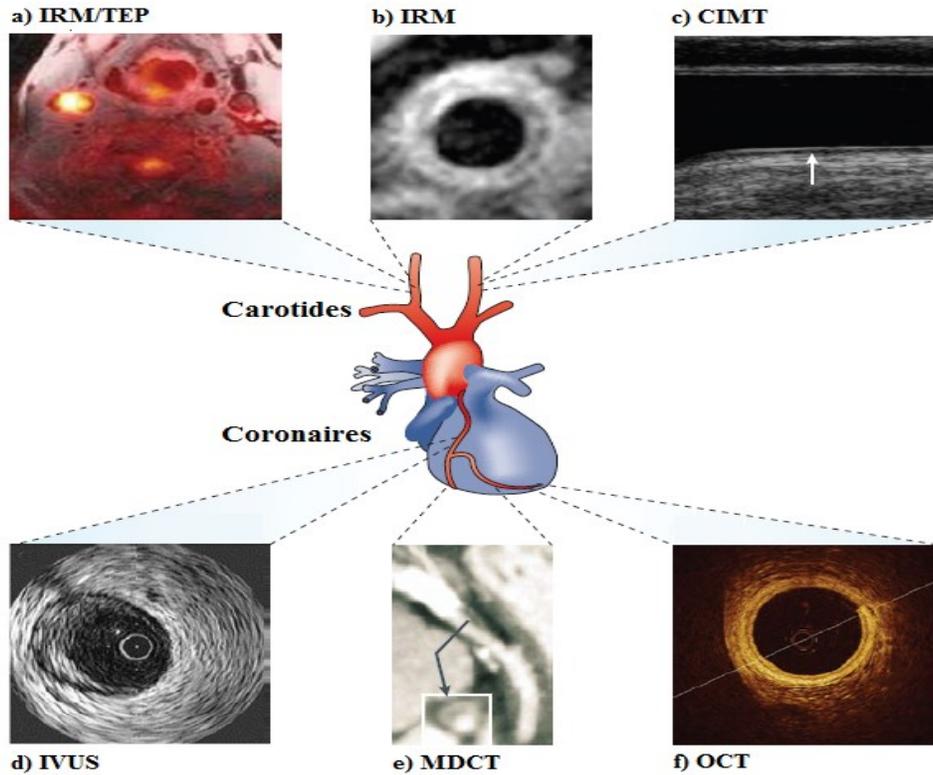


Figure 17. Exemple de techniques d'imagerie non invasives et invasives, à haute résolution pour l'analyse des lésions d'athéroscléroses. Adapté de[309].

L'émergence de la technologie des sondes d'imagerie fluorescentes dans le domaine du proche infrarouge et infrarouge (bioactivables ou non) dont la fluorescence émise traverse d'épaisses couches de tissus, permet une exploration sur plusieurs centimètres de profondeur. Ces nouvelles technologies ont ainsi stimulé le développement de différents systèmes d'imagerie à fluorescence de type microscopique et macroscopique. Ces systèmes s'appuient sur des principes photographiques pour recueillir les images [268, 310, 311].

10.2.1. Systèmes d'imagerie *in vivo* à fluorescence de type microscopique

Ces systèmes regroupent entre autres la microscopie confocale intravitale (MIC) et la microscopie multiphotonique intravitale (MMI). Ces systèmes permettent l'imagerie dans le proche infrarouge [290]. Malgré l'application limitée chez l'homme en raison de son caractère invasif, la MIC offre une résolution spatiale et une sensibilité élevée chez les petits animaux [312]. Cependant, la MMI présente plusieurs avantages par rapport à la MIC, y compris la

profondeur accrue de détection, le faible phénomène de photoblanchiment et une meilleure détection de micro-matériaux biologiques tels que le collagène, les microtubules sans l'ajout d'agents exogènes de ciblage [290]. L'utilisation de ces systèmes avait permis d'étudier chez la souris, l'activité *in vivo* entre autres des gélatinases (MMP-2 et MMP-9) et des cathepsines B dans les plaques d'athérosclérose riches en macrophages en utilisant un substrat fluorescent bioactivable dans le proche infrarouge [284, 311, 313]. Par ailleurs, ces résultats ont été confirmés par zymographie *in situ* en *ex vivo*.

10.2.2. Systèmes d'imagerie à fluorescence macroscopique

Il existe deux principaux types d'approches d'imagerie à fluorescence macroscopique : l'approche par réflectance et l'approche tomographique à fluorescence :

10.2.2.1. Systèmes d'imagerie de fluorescence par réflectance (IFR)

Les systèmes IFR sont composés d'une source de lumière d'excitation et de filtre d'émission et d'absorption de lumière à différentes longueurs d'ondes [314, 315]. Ils possèdent une caméra de type CCD pour collecter la lumière fluorescente réfléctée par l'objet imagé. Ceci permet d'obtenir des images planaires à deux dimensions. Cependant, ces systèmes d'imagerie ont une faible résolution au-delà de 3 à 5 millimètres d'épaisseur. Par ailleurs, ils sont plus efficaces pour imager des organes exposés (*ex vivo*) [314, 315]. L'utilisation des systèmes IFR a été rapportée dans des études sur l'activité *in vivo* de protéases, comme les cathepsines S, B, et les MMP (2 et 9), basée sur l'utilisation de sondes fluorescentes bioactivables [311, 316].

10.2.2.2. Systèmes d'imagerie de fluorescence tomographique

Les systèmes d'imagerie tomographiques sont aussi connus sous le nom de tomographie moléculaire de fluorescence (TMF ou FMT en anglais pour *fluorescent molecular tomography*) ou tomographie optique diffuse de fluorescence (TODF) [290]. Le TMF est une technique d'imagerie *in vivo*, quantitative, non invasive qui peut être utilisée pour détecter et quantifier l'activité de protéases inflammatoires, basée sur l'utilisation de sondes fluorescentes bioactivables, injectées *in vivo* [317] [318]. Cette technique se base sur des paramètres optiques de diffusion des photons lumineux ou de fluorescence à travers les couches tissulaires. Suite à l'infusion *in vivo* d'une sonde fluorescente, une lumière d'excitation est

dirigée à travers de multiples projections en fibres optiques vers la zone ciblée à la surface du corps de l'animal [317, 318]. Les photons émis après excitation du fluorophore se propagent dans plusieurs directions à travers les couches tissulaires des organes qu'ils traversent. Ils sont récoltés à partir de plusieurs points directement à la surface de l'animal, grâce à des capteurs en fibres optiques très sensibles puis dirigés vers une CCD [318, 319]. Les mesures tomographiques sont utilisées pour réaliser à l'aide d'algorithmes sophistiqués, une reconstruction précise de cartes spatio-temporelles tridimensionnelles de la distribution, la quantité (de l'ordre du picomole) et du temps de vie des fluorophores distribués dans les tissus en profondeur [317, 319]. Cette précision fait du TMF une nouvelle méthode d'imagerie métabolique et moléculaire très efficace pour le diagnostic et le suivi thérapeutique en particulier en cancérologie, dans des modèles expérimentaux (souris surtout) [314]. Elle est aussi de plus en plus utilisée en pathologie cardiovasculaire comme l'athérosclérose [311, 320, 321]. On peut notamment citer plusieurs études de quantification et localisation de l'activité de protéases avec la technique du TMF, comme les études impliquant la cathepsine S, B, K, et sur plusieurs classes de MMP (2,9,12, etc.) basées sur l'utilisation de sondes fluorescentes bioactivables [311, 319, 322].

Cependant, il existe des obstacles à une application plus répandue de l'utilisation de la FMT en athérosclérose. Tout d'abord, il y a souvent un manque d'information anatomique pour l'ensemble des données optiques afin de localiser avec précision la source du signal fluorescent, et cela lorsque la technique du TMF est utilisée seule. Pour surmonter cette limitation, des systèmes hybrides ont été développés, impliquant l'utilisation des techniques d'imagerie par IRM ou par CT scan en combinaison avec la technique de TMF [314, 319, 322, 323]. Ainsi, les informations anatomiques collectées par l'IRM ou le CT scan sur la structure et la nature des couches tissulaires permettent l'intégration des paramètres optiques (d'absorption et de diffusion) de chaque couche tissulaire avec les données collectées par le TMF. Ceci permet une meilleure simulation et reconstruction 3D du signal fluorescent [324].

10.2.2.3. Systèmes d'imagerie tomographique divers

En plus du TMF, d'autres systèmes d'imagerie fonctionnelle ont été développés et utilisés pour l'étude entre autres des activités biologiques en athérosclérose, comme l'apoptose

cellulaire, l'infiltration des monocytes dans la plaque et l'activité protéasique au sein de la plaque [325]. On peut citer la tomographie par émission de positrons (TEP, ou PET pour *Positron-emission tomography* en anglais) ou la tomoscintigraphie par émission monophotonique (TEMP ou SPECT pour *single photon emission computed tomography* en anglais) [325] [326].

Développées auparavant en médecine nucléaire, ces techniques nécessitent l'injection préalable d'un produit radioactif qui émet des rayonnements de type gamma [326]. Ce produit appelé radio ligand est choisi en fonction de ses propriétés chimiques pour se fixer sélectivement dans l'organisme et ainsi mettre en évidence certains processus biologiques [327]. On réalise l'image de la distribution du radioligand à l'aide d'une caméra capable de détecter les rayons gamma.

Grâce à un algorithme de reconstruction tomographique, la cartographie tridimensionnelle de l'activité radioactive est estimée et ainsi la distribution du radioligand injectée dans l'organisme. Les deux systèmes (PET et SPECT) sont assez semblables dans leurs approches sauf que dans le cas du PET, le radio-ligand utilisé est un émetteur de positrons et non de photons de haute énergie comme c'est le cas pour la SPECT. Comme pour la technique de FMT, les techniques d'imagerie PET et SPECT ont connu une amélioration quant à leur efficacité en les combinant avec les techniques d'IRM et CT scan [324, 325].

En outre, une variété de sondes, inhibitrices ou substrats utilisant des radioligands a été développée pour les études d'activités protéasiques dans des modèles d'athéroscléroses. Comme c'est le cas dans plusieurs publications qui ont rapporté la génération d'inhibiteurs marqués par des radioligands (I^{123} , Tc^{99m} , et F^{18}) spécifiques ou à large spectre, ciblant des MMPs (MMP-2, -9 et -14). L'imagerie PET et SPECT avait été utilisée pour valider l'efficacité de ces inhibiteurs [328, 329]. Les limitations principales de ces approches incluent une faible résolution spatiale, les risques d'exposition aux radiations, faible flexibilité dans leur utilisation (une sonde par cible).

Contexte et objectifs du mémoire

Dans notre laboratoire, nous avons réussi à démontrer que des perfusions de peptides mimétiques de l'apolipoprotéine A-I (apoA-I), chez le lapin et la souris se traduisent par une régression de la sténose valvulaire aortique. Nous avons aussi réussi à démontrer, entre autres, que des perfusions de particules de HDL reconstituées à des patients atteints de syndrome coronarien aigu, causent une diminution, toutefois non significative, du volume de l'athérome chez ces patients.

Malheureusement, d'autres groupes rapportent des résultats sous-optimaux de l'utilisation des stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation des HDL, et cela dans différentes conditions cliniques (athérosclérose, syndrome coronarien, etc.).

Les effets neutres observés avec ces thérapies et celles visant à augmenter le niveau de HDL-C ont récemment remis en cause la théorie des bienfaits des particules HDL, ou du moins, ouvrent le champ à des questions qui concernent en plus des niveaux de HDL-C, la préservation de la fonction des HDL, comme la fonction d'efflux de cholestérol à partir des macrophages, par exemple.

Parmi les causes possibles d'altération de la fonction des HDL, l'apoA-I non-lipidée ou présente sur les petites particules de HDL a été rapportée comme étant sensible à l'action protéolytique des protéases impliquées dans la progression des plaques d'athéroscléroses. La sensibilité de l'apoA-I, le constituant principal des particules HDL, à la dégradation par différentes protéases (chymases, cathepsines, MMP's, etc.) a été prouvé plus souvent d'une manière *in vitro*, et indique que cette protéolyse pourrait engendrer des particules HDL dysfonctionnelles en réduisant leur capacité d'accepter le cholestérol.

Dans notre étude, notre objectif est de traiter la question de la dégradation de l'apoA-I par l'action des protéases impliquées dans la progression de l'athérosclérose, en développant pour la première fois une sonde fluorescente bioactivable basée sur l'utilisation d'une apoA-I native conjuguée avec un fluorophore proche infrarouge de type Cy5.5-NHS-Ester.

Notre hypothèse est que l'activation de notre sonde apoA-I-Cy5.5 va nous permettre de faire des mesures et de valider *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* la présence d'activités protéasiques capable de dégrader spécifiquement l'apoA-I.

Article

Contribution de l'étudiant

L'article qui suit comprend une grande partie de mes travaux de maîtrise. La majorité des expérimentations, l'optimisation des méthodes et protocoles, la compilation et l'analyse des résultats et statistiques ainsi que la rédaction de l'article ont été effectuées par le premier auteur de l'article.

Les coauteurs ont principalement contribué au niveau de la conception et le suivi du protocole animal, les analyses d'imagerie *in vivo*, la révision du manuscrit ainsi que par le partage de leurs connaissances. Dr Baoqiang Li a effectué les expériences et les analyses des résultats de l'imagerie *in vivo*. Finalement les Drs Éric Rhéaume et Jean-Claude Tardif ont dirigé et supervisé mes travaux.

Je tiens à mentionner que les analyses statistiques ont été réalisées par Mme. Mariève Cossette du service de biostatistique du Centre de Coordination des Essais Cliniques de Montréal (MHICC).

L'article sera soumis au journal *Bioconjugate chemistry* en septembre 2015

**Development of a bioactivatable fluorescent probe for the
study of the proteolytic activities degrading the
apolipoprotein A-I *in vitro* and *in vivo***

Foued Maafi,^{†,‡} Baoqiang Li,^{§,‡} Cathérine Gebhard,[‡] Mathieu R. Brodeur,[‡] Louis Villeneuve,[‡]
Frédéric Lesage,^{§,‡} David Rhainds,[‡] Eric Rhéaume,^{†,‡} and Jean-Claude Tardif^{*,†,‡}

[†] Montreal University & Department of Medicine, Montreal, Quebec, Canada

[‡] Montreal Heart Institute, Montreal, QC, H1T 1C8, Canada

[§] Institute of Biomedical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montreal, QC, H3C
3A7, Canada

*** Corresponding author:**

Dr. Jean-Claude Tardif, Montreal Heart Institute, Montreal, Quebec, H1T 1C8, Canada.

Abstract

The benefits of high-density lipoproteins (HDL) against atherosclerosis have been largely attributed to its major protein component, apolipoprotein A-I (apoA-I). However, there are indications that apoA-I can be degraded by proteases localized in human atherosclerotic plaques, which could reduce the effectiveness of HDL-based therapies under certain conditions. Here, we describe the development and use of a new bioactivatable near-infrared full-length apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe for specific assessment of proteolytic activities that degrade apoA-I *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo*. The probe fluorescence is quenched by saturation of Cy5.5 fluorophore molecules on the protein and increased near-infrared fluorescence occurs after apoA-I cleavage. *In vitro* proteolysis of the apoA-I probe showed up to 11-fold increase of near-infrared fluorescence (n=5, $P \leq 0.05$). Using this apoA-I-Cy5.5 probe, we were able to quantify proteolytic activities from a variety of proteases including serine, cysteine, and metalloproteases. Also, we were able to detect activation of the apoA-I-Cy5.5 probe on atherosclerotic mice aorta sections using an *in situ* zymography assay and showed that broad-spectrum protease inhibitors could protect the probe from protease activities, resulting in decreased fluorescence compared to conditions without protease inhibitors (-54%, n= 6 per group, $P \leq 0.0001$). *In vivo*, the injected probe showed increased fluorescence in the aorta when infused in *Ldlr*^{-/-}; Tg (human apoB) atherosclerotic mice (ATX) than in C57BL/6J wild-type mice (CTL). *In vivo* measurements were confirmed by *ex vivo* imaging of the aorta which showed up to 10-fold increase in fluorescent signal in ATX mice compared to CTL mice ($P \leq 0.05$). The use of this probe could lead to improved understanding of the molecular mechanisms underlying the development and progression of atherosclerosis and improve HDL-based therapeutic strategies by improving apoA-I functionality.

Keywords: Atherosclerosis, HDL, apoA-I, bioactivatable fluorescent probe, NIRF imaging, FMT, MRI, proteases, apoA-I proteolysis.

1. Introduction

Atherosclerosis is the main cause of heart disease. It is the leading cause of death in westernized societies¹. Atherosclerosis is a complex inflammatory process involving endothelial activation and dysfunction, infiltration of different cell types, including lymphocytes and macrophages, foam cell formation, extracellular matrix and lipoprotein deposition as well as calcification^{2,3}. Extracellular matrix remodelling, including collagen synthesis and elastin degradation by matrix metalloproteinases (MMPs) and cathepsins, contributes to plaque development^{4,5,6,7}.

High-density lipoprotein (HDL)-based therapies have been shown to mediate atherosclerotic plaque regression in animal models^{8,9,10} explained mostly by its role in mediating cholesterol efflux from the plaque but also by its anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic properties^{11,12,13}. HDL's beneficial effects are mostly mediated by their most abundant protein component, the apolipoprotein A-I (apoA-I). ApoA-I is a 243-amino acids protein composed of 10 amphipathic helices¹⁴. The failure of recent HDL-related clinical studies, despite the epidemiological data showing inverse correlations between HDL-C levels and cardiovascular disease (CVD), revealed the need to improve our knowledge regarding HDL and their functionality. For instance, whereas studies using genetic models or direct infusion of HDL or apoA-I were successful to regress atherosclerotic plaque in animal models^{15,16}, others using drugs such as niacin and CETP inhibitors to raise endogenous level of HDL-C have failed to demonstrate significant therapeutic benefit¹⁷ although genetic factors may alter responses to dalcetrapib¹⁸. The possible explanation for such paradox may relate to the increased importance of HDL functionality and the integrity of its constituents, including apoA-I, over the circulating levels of cholesterol associated with HDL particles or HDL-C.

Within atheroma tissue, HDL particles are surrounded by an hostile environment and their protein constituents may suffer from several modifications, such as oxidation¹⁹ and proteolysis, which can lead to impaired functionality. The capacity of apo A-I to mediate cholesterol efflux can be abrogated by its cleavage, resulting from MMP-3, 7 and -12, cathepsin F and S, plasmin, chymase (rh-CMA-1) and neutrophil elastase proteolytic activities present in the atherosclerotic plaque or in the plasma^{20,21}. The local impairment of apoA-I is expected to lead to the loss of its atheroprotective benefits in endogenous HDL or to suboptimal efficiency of HDL-based therapy.

Different protease-specific activatable fluorescent probes have been designed^{22, 23,24}. Following binding by their target enzymes, these activatable probes undergo a physicochemical modification which leads to signal amplification, thus increasing the signal-to-noise ratio and allowing good target specificity and the study of protease activities. We reasoned that a probe based on apoA-I could be useful to detect conditions leading to loss of its integrity resulting from proteolysis. However, activatable probes using full-length conjugated proteins are poorly diversified, as they can pretty much be summarized to the most known proteins used for activatable probe that are: BSA, casein, gelatin and elastin^{25, 26, 27}. These proteins have in common a globular structure providing advantages for higher fluorophore conjugation efficiency and quenching by saturation. On the other hand, short peptide probes for the detection of cathepsin S- and chymase-specific activities have been developed based on optimal sequences recognized by these proteases^{28,29}, and allow high sensitivity for detection, however the significance in terms of degradation of the apoA-I by these individual probes/proteases would be difficult to interpret.

Near-infrared fluorescence (NIRF) molecular imaging represents a useful approach for *in vivo* and *ex vivo* imaging because of its deeper tissue penetration than visible light. The broad class of imaging tools based on activatable probes and near-infrared fluorescence have allowed the study of diverse enzyme activities, particularly proteases such as MMPs and cathepsins in small pre-clinical atherosclerotic, aortic valvular stenosis (AVS) and cancer models^{30,31}.

Our aim here is to develop a bioactivatable probe to measure apoA-I-degrading protease activities present in atherosclerotic plaque, *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*.

2. Experimental procedures

2.1. Animal model

A total of twelve aged *Ldlr*^{-/-}; Tg(human apoB) mice (ATX) and four aged wild-type mice (C57BL/6J) (Jackson Laboratory) were used as atherosclerotic and control mice model, respectively, in the study. The ATX mice were kindly given by Dr Éric Thorin. Animal care and procedures followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the animal research ethics committee of Montreal Heart Institute.

2.2. Generation of apoA-I-Cy5.5 activatable probe

2 mg/ml of full-length purified human apoA-I (Biomedical Technologies Inc, 95 % pure on SDS-PAGE) solution in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.5) were added to 3.53 mM (final concentration) of mono-reactive N-hydroxysuccinimide ester cyanine 5.5 fluorescent dye solution in DMSO (GE Healthcare Life Sciences). The final molar dye/protein ratio was 50:1. The mixture with a final pH of 8.3 was incubated for 2 h at room temperature in darkness with gentle mixing. Unbound Cy5.5 dye was then removed by sequential filtration cycles using 10-

kDa Amicon ultra centrifugal filter (Millipore) followed by an additional purification by size-exclusion using a Sephadex G25 PD-10 gel filtration column (GE Healthcare Life Sciences).

2.3. *In vitro* activation and characterization of apoA-I-Cy5.5 probe

Protease preparations

Procedure details are presented in the Supplementary method section.

***In vitro* protease activation of apoA-I-Cy5.5 probe and SDS-gel electrophoresis**

ApoA-I-Cy5.5 probe (0.5 mg/ml) was incubated with mature recombinant human chymase (rh-CMA), activated mouse MMP12, activated human cathepsin S (Cath-S) (1, 5, 10 µg/ml) for 90 minutes or with trypsin (0.5, 1 µg/ml) for 20 to 40 minutes at 37 °C. All incubations occurred in the appropriate reaction buffer for each protease tested. Digested samples were then loaded for migration in a 15% polyacrylamide-SDS gel. The fluorescence released from unquenched apoA-I-Cy5.5 probe after its proteolytic activation was visualized using a Caliper IVIS Lumina II multispectral imaging system using 680/720 nm Ex/Em filters.

***In vitro* kinetics of protease activation of apoA-I-Cy5.5**

Using a 96-well microplate, 40 µg/ml of apoA-I-Cy5.5 probe substrate were incubated in the appropriate reaction buffer with different concentration of rh-CMA, trypsin, Cath-S and MMP12. The fluorescence intensity was measured at 37 °C using a kinetic mode with Biotek Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate reader (Ex/Em; 674/700 nm). Slope equation from free Cy5.5 dye standard curve was used to extrapolate the increase of fluorescence in terms of equivalent amount of Cy5.5 released from the early phase of protease activated apoA-I-Cy5.5 kinetic curves. The early phase of the reaction was defined as the linear portion of the fluorescence emitted early after initiation of apoA-I probe degradation by the tested protease.

Protease activities were expressed as amount of Cy5.5 released per second per μg of apoA-I probe substrate.

2.4. *In situ* zymography

Six 7- μm ATX mice (13 months old) thoracic aorta cryosections were incubated during 3 hours at 37 °C with premixed 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ apoA-I-Cy5.5 probe substrate in a 0.1% low melting point agarose solution prepared in protease reaction buffer, in presence or absence of a broad-spectrum protease inhibitor mix. DAPI was added to the mixture for nuclear staining. The images were analyzed using confocal microscopy with 10X magnification. 633-nm laser for excitation and 650-750 nm emission filter were used for fluorescence detection. Quantification of the total fluorescence intensity/ μm^2 in the atherosclerotic plaque or in the atherosclerotic plaque added to the external lamina elastic were achieved using Zen-light 2008 software from Zeiss.

2.5. Hybrid FMT-MRI for *in vivo* imaging of apoA-I-Cy5.5 activation

A combined Fluorescence Molecular Tomography (FMT)-Magnetic Resonance Imaging system (MRI) system was used for *in vivo* molecular imaging. The specifications of the system were described elsewhere³². Five 12-month-old ATX mice and three 10-month-old wild-type mice were tail-injected with 100 μl of 1 mg/ml apoA-I-Cy5.5 probe diluted in saline solution. For each mouse, imaging was conducted before and 24 hours post-probe injection. One additional ATX and one C57BL/6J mice were only injected with saline and imaged to estimate the background signal. The mice were sacrificed by cardiac puncture under anesthesia followed by intensive saline perfusion of the heart and aorta. The harvested hearts (data not shown) and aortas were imaged *ex vivo* to confirm the *in vivo* observation.

2.6. *Ex vivo* imaging using apoA-I-Cy5.5 probe

Dissected aortas were pinned in a glass petri dish coated with 5 mm black Sylgard and filled with saline and then imaged at 37 °C using a commercial epi-illumination fluorescence imaging system (IVIS Lumina II, 675/720 nm Ex/Em filters, PerkinElmer). The total fluorescence density/cm² values were analyzed using a computer-based digitizing image system software (Image Pro Plus, version 7.0). After each imaging session, the aortas were embedded in optimal cutting temperature compound and preserved at -80 °C for further validation of the *ex vivo* imaging results by microscopy.

2.7. Validation of *ex vivo* imaging results by confocal microscopy

7 µm cryosections from thoracic aorta region of the ATX and C57BL/6J apoA-I-Cy5.5 probe-injected mice were mounted into an anti-fading medium; 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane in glycerol (DABCO) and imaged using confocal microscopy (633-nm excitation laser and a 650-750 nm emission filter was used for detection of Cy5.5 fluorescent signal). Additional methods are described in Supplementary Materials.

2.8. Statistical analysis

Analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A significance level of 0.05 was used for all analyses. Data are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM). The statistical analyses for the gel experiments (Figure 1A) used a Paired Student's t-test and repeated measures ANOVA test (Figure 1C), respectively. A Wilcoxon-Mann-Whitney test was used for the *ex vivo* imaging experiments. Paired Student's t-test was used for *in situ* zymography.

3. Results

3.1. Generation of an apoA-I-Cy5.5 activatable probe

We conjugated the apoA-I protein using different excess ratios of Cy5.5 fluorescent dye. The conjugation of apoA-I with 100:1 dye/protein molar ratio of Cy5.5 yielded the highest degree of fluorescence quenching after removal of unbound Cy5.5 dye in comparison to 80:1 and 50:1 dye/protein molar ratios (Supplementary Figure S1A). However, the 50:1 dye/protein molar ratio resulted in the highest fold increases in fluorescence emission after apoA-I-Cy5.5 probe unquenching by proteolytic activation with either chymase, cathepsin-S or rm-MMP-12 (Supplementary Figures S1, S2 and S3). Therefore, we pursued all our experiments with the apoA-I-Cy5.5 probe generated using a 50:1 dye/protein molar ratio.

3.2. *In vitro* characterization and activation of the apoA-I-Cy5.5 probe by chymase

Our native apoA-I has an apparent molecular mass of 24.5-kDa on SDS polyacrylamide gel in the different tested proteases buffer (Data not shown). Our conjugated purified apoA-I-Cy5.5 probe appeared at a position slightly higher than 37 kDa, estimated as 41.1 kDa after migration through SDS polyacrylamide gel. This suggests that approximately 17 to 18 protonated Cy5.5 molecules, which have a molecular weight of 931.12 Da, were bound to the apoA-I protein to generate the probe (Figure 1B and D, lane with no rh-CMA). The fluorescence of the filtered apoA-I-Cy5.5 probe represented 4% of the fluorescence of the probe solution before removal of unbound Cy5.5 dye (Figure 1A). After extensive proteolysis of the apoA-I-Cy5.5 probe with different concentrations of rh-CMA for 90 min followed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, we noted that the cleavage products showed

increased fluorescence compared to undigested apoA-I-Cy5.5, as expected as a consequence of the decreased quenching of fluorescence of the protein fragments relative to that of the intact protein (Figure 1B). The pattern of cleaved fluorescent fragments around the 15-kDa molecular weight marker (Figure 1B) is similar to the protein fragments seen using Coomassie staining on the same gel (Figure 1D).

Fluorescence quantification of the gel showed an increase by 7 to 11 times of the total fluorescence intensity, as determined by integration of the signals from the different fragments, which was dependent on the concentration of protease used in the proteolysis assay compared to the fluorescence of the undigested probe (Figure 1C). We observed similar results when the apoA-I-Cy5.5 probe was cleaved using different concentrations of trypsin, cathepsin-S or MMP-12, which also generated small fluorescent fragments whose intensities show a direct correlation with the protease concentrations used, although the profile and the number of fluorescent fragments were dependent on the protease used (Figure 2A, 2B, 2C).

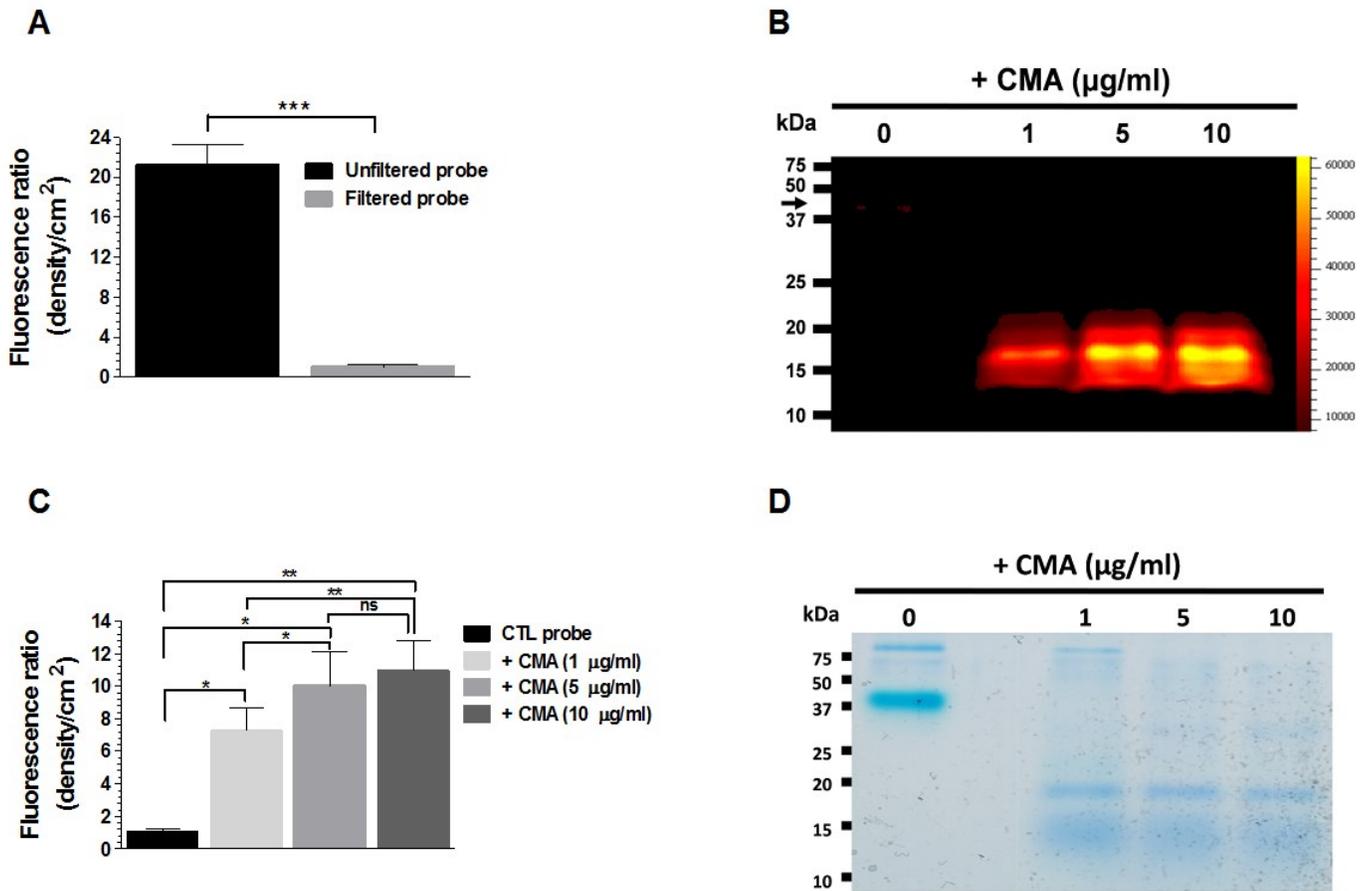


Figure 1. *In vitro* characterization of the bioactivatable apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe. (A) Fluorescence emitted from the apoA-I probe solution before and after removal of unbound Cy5.5. (B) Electrophoretic gel showing proteolytic degradation and fluorescence emission of the purified bioactivatable apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe (8 µg) incubated with recombinant human chymase (rh-CMA) protease (1, 5, 10 µg/ml); The arrow indicates the position of undigested apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe. (C) Gel quantification of the total fluorescence emission (density/cm²) per lane. (D) Coomassie staining of proteins. Data are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) (n=5, A and C). (***: P = 0.0006, respectively for unfiltered probe vs filtered probe, * : P = 0.0129 ; P = 0.015; P = 0.0288, respectively, for CTL vs CMA 1 µg/ml, CTL vs CMA 5 µg/ml and CMA 1 µg/ml vs CMA 5 µg/ml, ** : P = 0.0073 and P = 0.005, respectively, for CTL vs CMA 10 µg/ml and CMA 1 µg/ml vs CMA 10 µg/ml ; ns : P = 0.102 for CMA 10 µg/ml vs CMA 5 µg/ml).

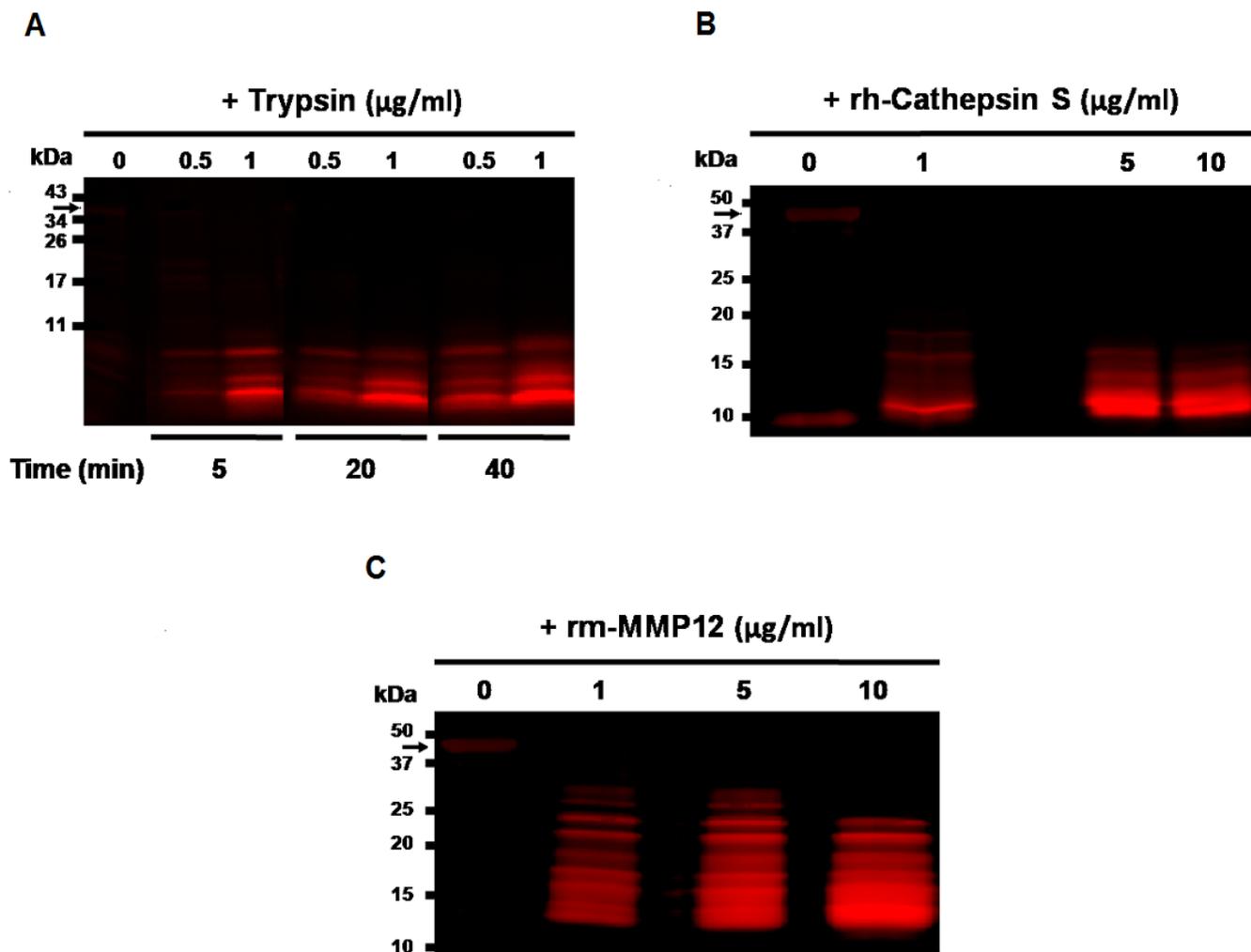


Figure 2. *In vitro* activation of the apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe. SDS polyacrylamide gel showing proteolytic degradation and fluorescence emission of the purified bioactivatable apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe incubated for 5, 20 and 40 min at 37 °C with trypsin (0.5 and 1 $\mu\text{g/ml}$) (A), or 90 min in presence of recombinant human cathepsin S (1, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$) (B) or recombinant mouse MMP-12 protease (1, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$) (C). The arrow indicates the position of undigested apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe.

3.3. *In vitro* assessment of proteolytic activities using the apoA-I-Cy5.5 probe

Proteases from three main classes: serine proteases (CMA, trypsin), cysteine proteases (cathepsin-S) and metalloproteinase family (MMP-12), previously shown to cleave apoA-I were selected to assess the ability of our probe to quantify their proteolytic activities on apoA-I. *In vitro* kinetic experiments were carried out in which proteases were added to the probe and fluorescence intensity was measured over time on a microplate fluorometer (Figure 3A and Figure 4A, 4B and 4C). The rh-CMA protease promoted an increase in fluorescence of apoA-I-Cy5.5 probe by 350, 580, 755, 900, 1040 and 1200 % using 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 and 2 $\mu\text{g/mL}$ of rh-CMA, respectively, over a period of 2.5 hours (Figure 3A). A similar time-dependent increase of fluorescence was observed over time when we added different concentrations of the apoAI-Cy5.5 probe to a fixed concentration of rh-CMA (Figure 3B). The highest protease concentration used in the assays for trypsin, MMP-12 and cathepsin-S using apoA-I-Cy5.5 probe promoted increases in fluorescence of 470%, 550% and 960% over time, respectively (Figure 4A, 4B and 4C).

3.4. *In vitro* measurement of proteolytic activities degrading the apoA-I-Cy5.5 probe

The increases in fluorescence after proteolysis of the bioactivatable fluorescent probe with increasing protease concentrations or when substrate concentration is increased in the presence of fixed protease concentration can be fitted using third-order polynomial equation with an r^2 typically > 0.99 . We built standard curves of Cy5.5 free dye in each specific protease activity buffers used in our tests and observed straight lines after log-log graphing, indicating

power-law relationships between the free Cy5.5 concentration in solutions and fluorescence intensity (Figure 3E, Supplementary Figure S4). This enabled us to convert fluorescence readings to Cy5.5 concentrations and use the slope of the free Cy5.5 dye standard curve equation to calculate protease activities from the linear phase of the kinetic assays of fluorescence measurements with each protease tested.

To determine the usefulness and reliability of the apoA-I-Cy5.5 probe, we assayed *in vitro* Cy5.5 fluorescence unquenching over a wide range of rh-CMA, trypsin, Cathepsin-S and MMP-12 protease concentrations or initial protease velocity over a wide range of apoA-I-Cy5.5 probe concentrations (showed here only for rh-CMA). We observed a good fit between the proteolytic activity (Cy5.5 unquenching in equivalent of $\text{Cy5.5}/(\text{time} \times \text{amount of probe})$) and rh-CMA concentrations (1.7×10^{-9} to 6.7×10^{-8} M) using a third order polynomial relationship (Figure 3C), and also between rh-CMA initial velocity and the concentration of apoA-I-Cy5.5 probe (3.4×10^{-8} to 1×10^{-6} M) (Figure 3D). Similar results were obtained with trypsin, cathepsin-S and MMP-12 as we also observed polynomial relationships between proteolytic activities (Cy5.5 release) and protease concentrations; between 5.4×10^{-9} to 1.7×10^{-7} M for trypsin, 6.4×10^{-9} to 1.5×10^{-7} M for cathepsin-S and from 1.9×10^{-9} to 1.9×10^{-8} M for MMP-12 (Figure 4D, 4E, 4F, respectively).

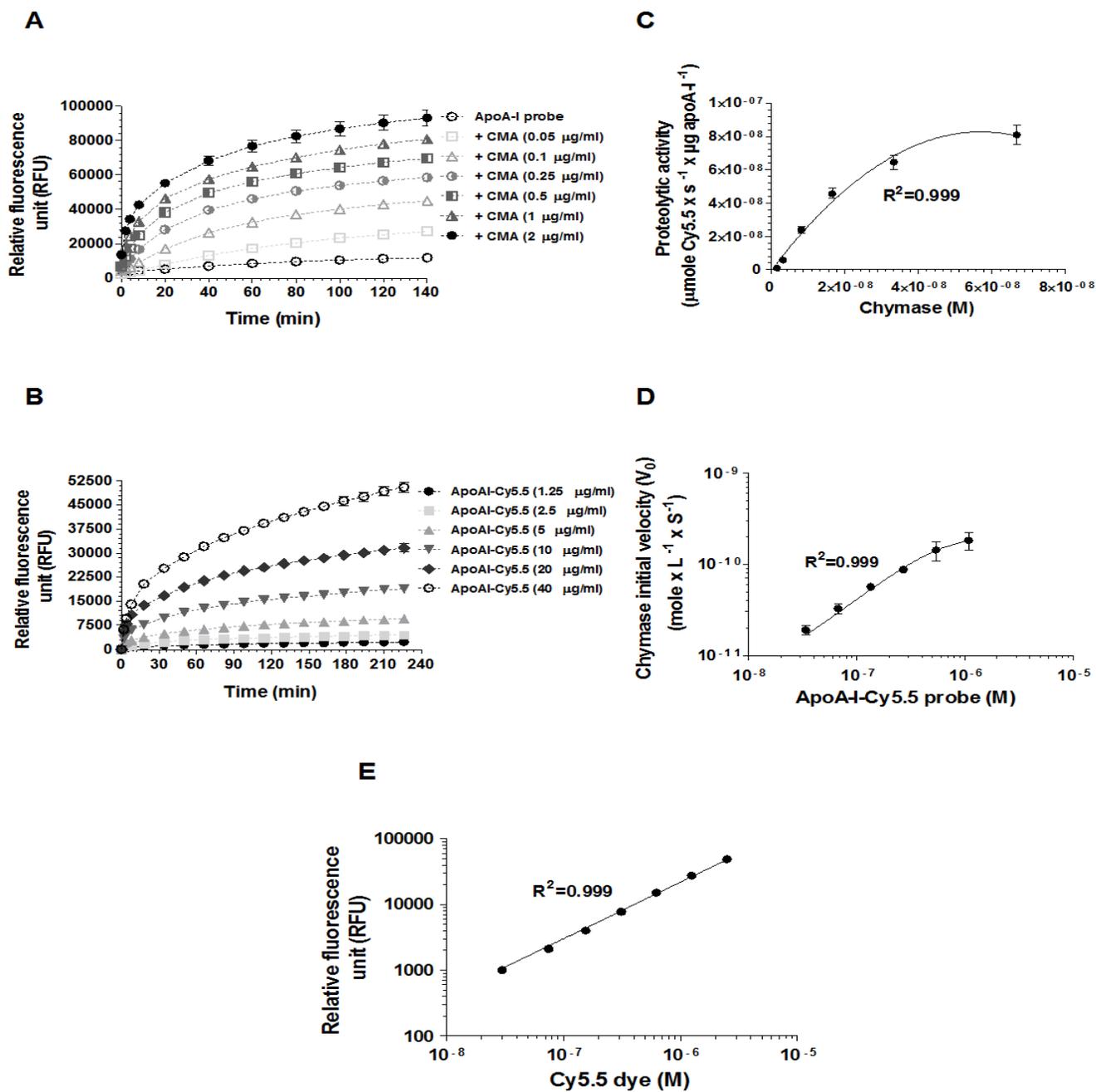


Figure 3. *In vitro* measurement of chymase (rh-CMA) proteolytic activity using apoA-I-Cy5.5 probe. Increase in fluorescence ($n=3$) over time mediated by proteolysis of apoA-I-Cy5.5 probe (40 $\mu\text{g/ml}$) using rh-CMA (0.05 $\mu\text{g/ml}$ to 2 $\mu\text{g/ml}$) (A), or different concentrations of apoA-I-Cy5.5 probe incubated with 1 $\mu\text{g/ml}$ of recombinant human chymase (B). Chymase activity on apoA-I probe. The fluorescence emitted was measured for the

indicated time using 20 seconds intervals on a fluorescent microplate reader. (C) Relationship between the proteolytic activity of the rh-CMA protease (1.7×10^{-9} to 6.7×10^{-8} M) and apoA-I-Cy5.5 probe (1×10^{-3} M), rh-CMA activity was analysed between 20 sec and 320 sec of reaction time (n=3). (D) Relationship between the concentration of the ApoA-I-Cy5.5 probe (3.4×10^{-8} to 1×10^{-6} M) and the rh-CMA initial velocity (n=3). (E) Log-Log standard curve showing the relation between free Cy5.5 dye concentration (2.5×10^{-6} to 3×10^{-8} M) and fluorescence measured in the rh-CMA-specific activity buffer (n=5). Third order polynomial trend curves were used for fitting curves in panels C and D. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM).

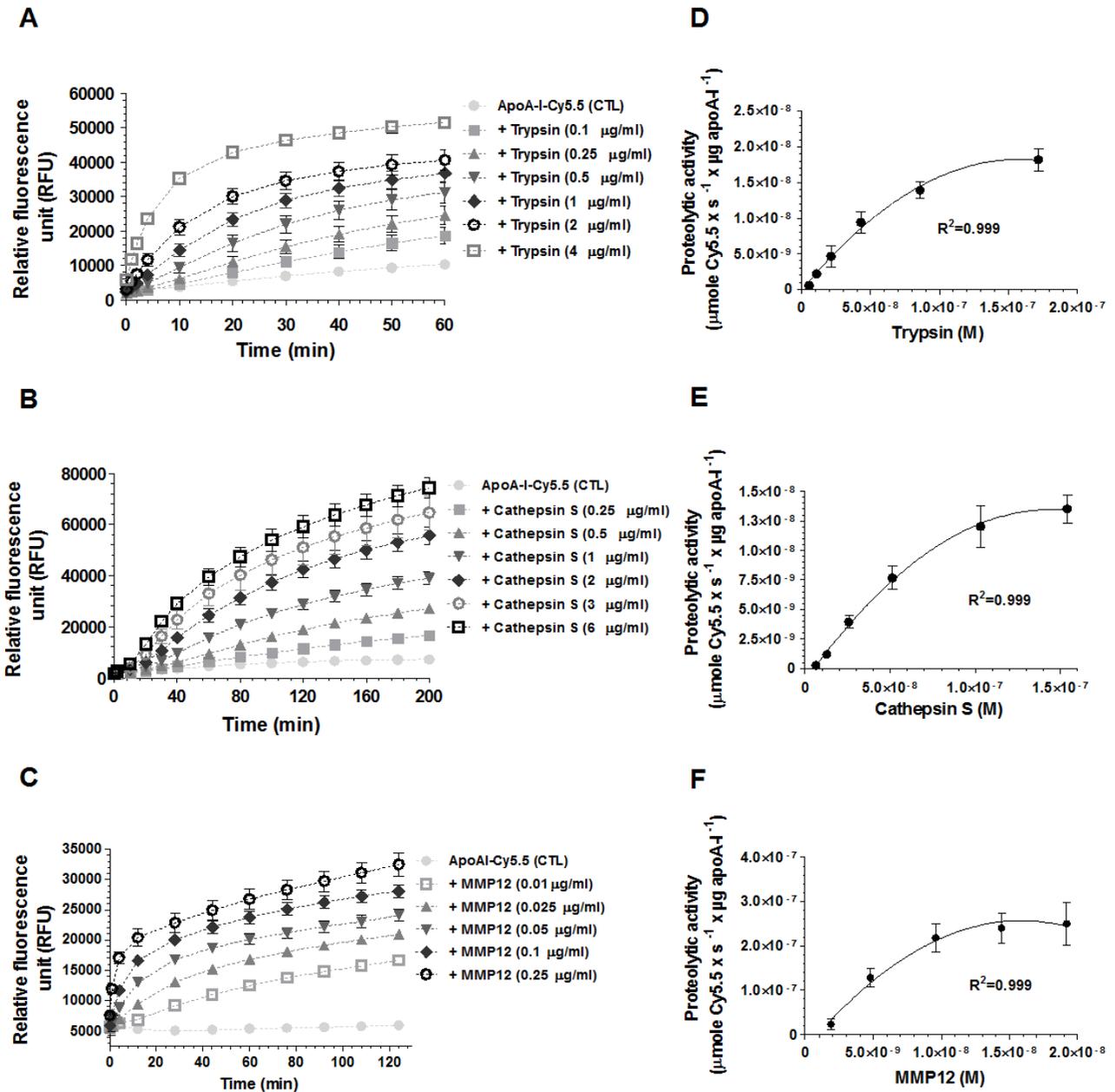


Figure 4. *In vitro* proteolytic activities dose-responses and time-courses of different proteases on the apoA-I-Cy5.5 probe. Increase in fluorescence over time mediated by proteolytic digestion of the apoA-I-Cy5.5 probe using trypsin (0.1 to 4 $\mu\text{g/ml}$) (A), recombinant human cathepsin S (0.25 to 6 $\mu\text{g/ml}$) (B) or recombinant mouse MMP12 (0.01 to 0.25 $\mu\text{g/ml}$) (C). Relationship between the concentration of protease and equivalent of Cy5.5 release is shown

for concentrations of trypsin between 5.4×10^{-9} and 1.7×10^{-7} M (D); recombinant human cathepsin S between 6.4×10^{-9} and 1.5×10^{-7} M (E) and recombinant mouse MMP12 between 1.9×10^{-9} and 1.9×10^{-8} M (F); using an apoA-I-Cy5.5 probe concentration of 1×10^{-3} M. Third order polynomial trend curves was used for fitting curves in panels D, E and F. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) (n=3).

3.5. *In situ* detection of proteolytic activities degrading the apoA-I-Cy5.5 probe

We wanted to characterize the usability of the apoA-I-Cy5.5 probe for the detection of proteolytic activities degrading the apoA-I protein in atherosclerotic tissue. *In situ* zymography using our quenched apoA-I-Cy5.5 probe shows increased fluorescence in atherosclerotic lesions of thoracic aortas sections from 13-month *Ldlr*^{-/-};Tg(human apoB) mice, probably explained by the activation of the apoA-I-Cy5.5 probe due to the protease activities present in the plaques and resulted in a strong fluorescent signal emission (Figure 5A, upper right panel). The addition of broad-spectrum protease inhibitors, which significantly reduced apoA-I-Cy5.5 activation *in vitro* (Supplementary Figure S5), resulted in a significant decrease of the fluorescent signal in the atherosclerotic plaque area, indicating the contribution of proteolytic activities to the observed increase in fluorescence (compare lower and upper panels of Figure 5A). After quantification, the fluorescence was 53.7% lower in the atherosclerotic plaque in presence of protease inhibitors ($P \leq 0.0001$; Figure 5B) or 54.4% lower in the region including plaque area and the external elastic layer of the aorta in absence of protease inhibitors ($P \leq 0.01$; Figure 5C).

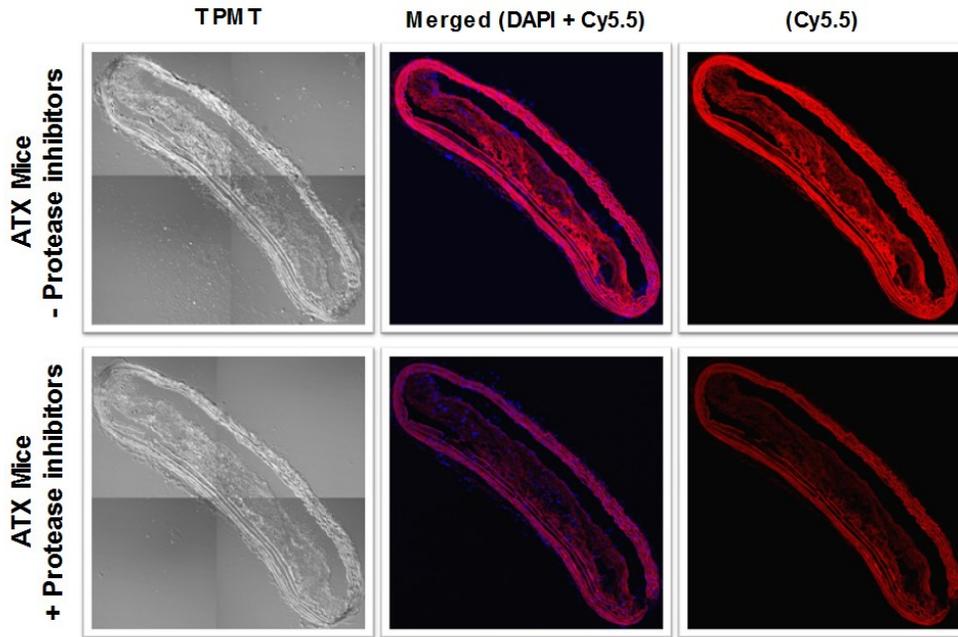
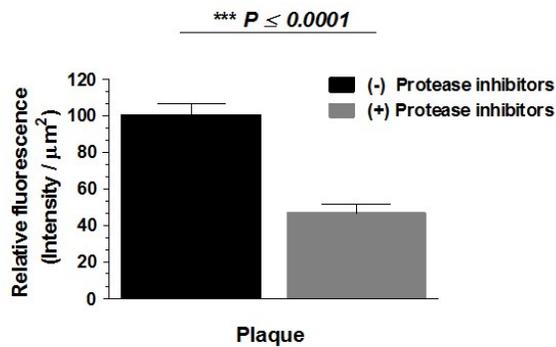
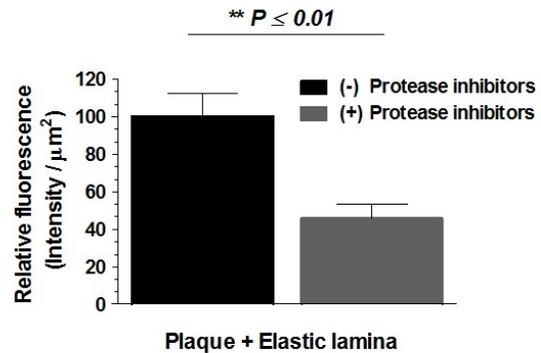
A**B****C**

Figure 5. *In situ* zymography for apoA-I-targeting proteolytic activity in mouse thoracic aorta. (A) Representative sections of thoracic aorta of an atherosclerotic (ATX) mice ($\text{LDLr}^{-/-}$; Tg(human apoB)), incubated for 24 h with the apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence or absence of a broad-spectrum protease inhibitors cocktail (TPMT: Transmitted light photomultiplier tube). (B and C) Quantification of the relative total fluorescence (intensity / μm^2) in the plaque or in the plaque + elastic lamina (B) and (C). Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) (n=6) (*** : $P \leq 0.0001$; ** : $P = 0.0023$).

3.6. *In vivo* and *ex vivo* detection of proteolytic activities degrading the apoA-I-Cy5.5 probe.

We next tested the ability of the quenched apoA-I-Cy5.5 probe to detect the proteolytic activities degrading the apoA-I protein *in vivo* and *ex vivo*. Five 12-month-old *Ldlr*^{-/-};Tg (human apoB) mice (ATX) and three 10-month-old C57BL/6J mice (CTL) were tail injected with our apoA-I-Cy5.5 quenched-probe; and FMT-MRI imaging was conducted 24 hours after the injection. As detailed previously³², the MR images were used to guide the fluorescence image reconstruction; and then the anatomical (MRI) and functional (FMT) information were correlated to facilitate interpreting the images. (Figure 6, MR slices). In the reconstruction, a Monte Carlo based mathematical model was used to model photon propagation in biological tissues. As shown in Figure 6, the differences in fluorescence intensity between the ATX mice and the CTL mice were evident in the aortic region.

In vivo FMT-MRI observations were compared with the *ex vivo* quantification of fluorescence images of the aortas (Figure 7A) showing that the fluorescence signal from the apoA-I-Cy5.5 probe in the atherosclerotic region of the aorta of the ATX mice was 10-fold higher than that observed from CTL mice aortas (Figure 7B, $P \leq 0.05$). Auto-fluorescence controls showed negligible signal (Figure 7A, top and bottom left panels).

Finally, to further characterize the source of the fluorescent signal obtained *in vivo* and *ex vivo*; we analyzed by confocal microscopy cryosections of thoracic aortas of ATX and CTL mice (Figure 8A). The fluorescence signal was strong in atherosclerotic plaque area of ATX aorta in comparison to the almost total absence of fluorescence in CTL mice aorta tissue (Figure 8B and 8C).

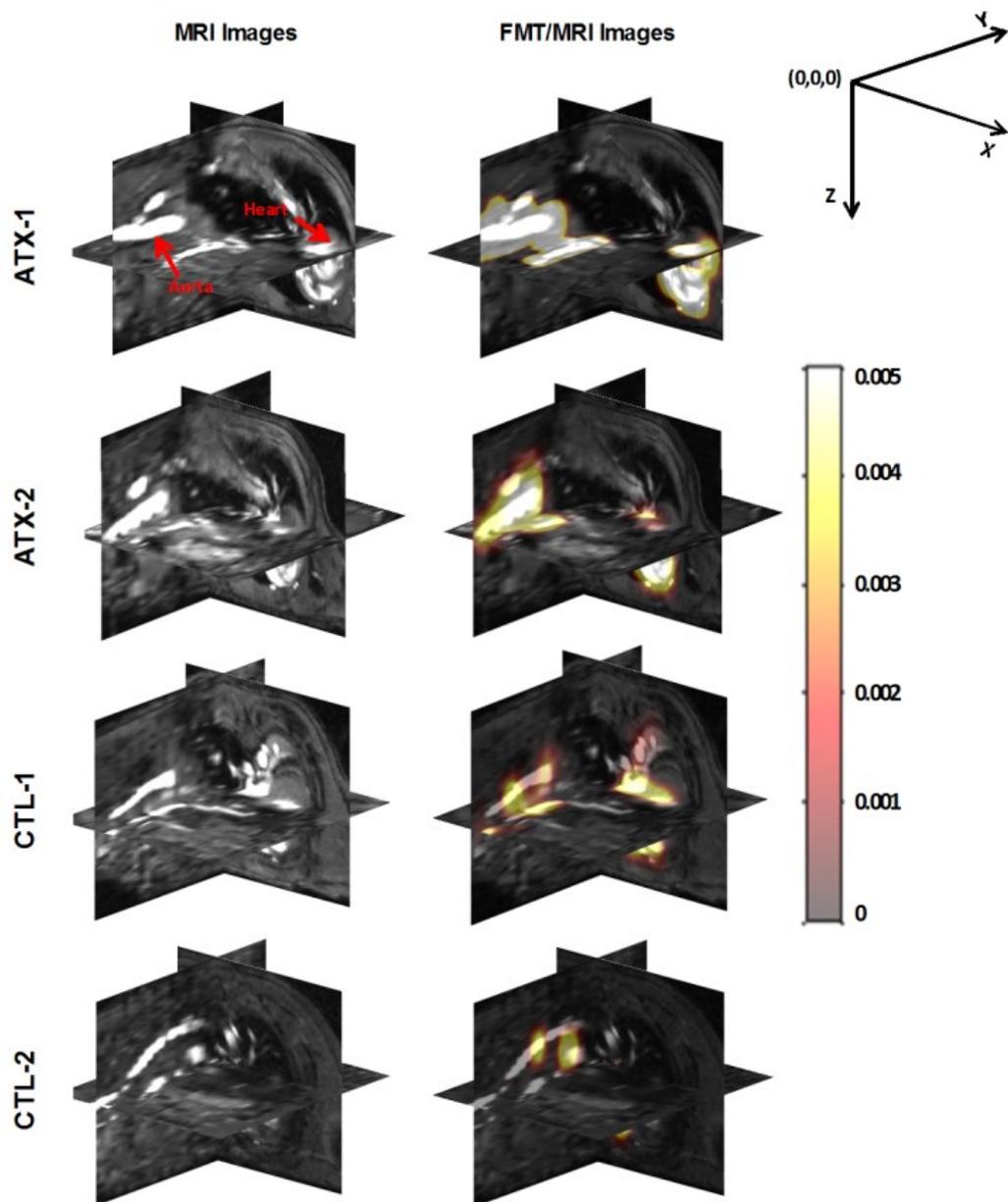


Figure 6. *In-vivo* activation of the apoA-I-Cy5.5 activatable fluorescent probe assessed by hybrid FMT-MRI imaging system. The images in the first column are the magnetic resonance slices for each mouse. The heart and part of the aorta of ATX #1 are indicated with red arrows. In the second column, the reconstructed FMT/MRI images were overlaid with transparency ($\alpha = 0.5$) on the MR slices. Three orthogonal MR slices were chosen for each mouse: axial slice (YZ), coronal slice (X-Y) and sagittal slice (X-Z).

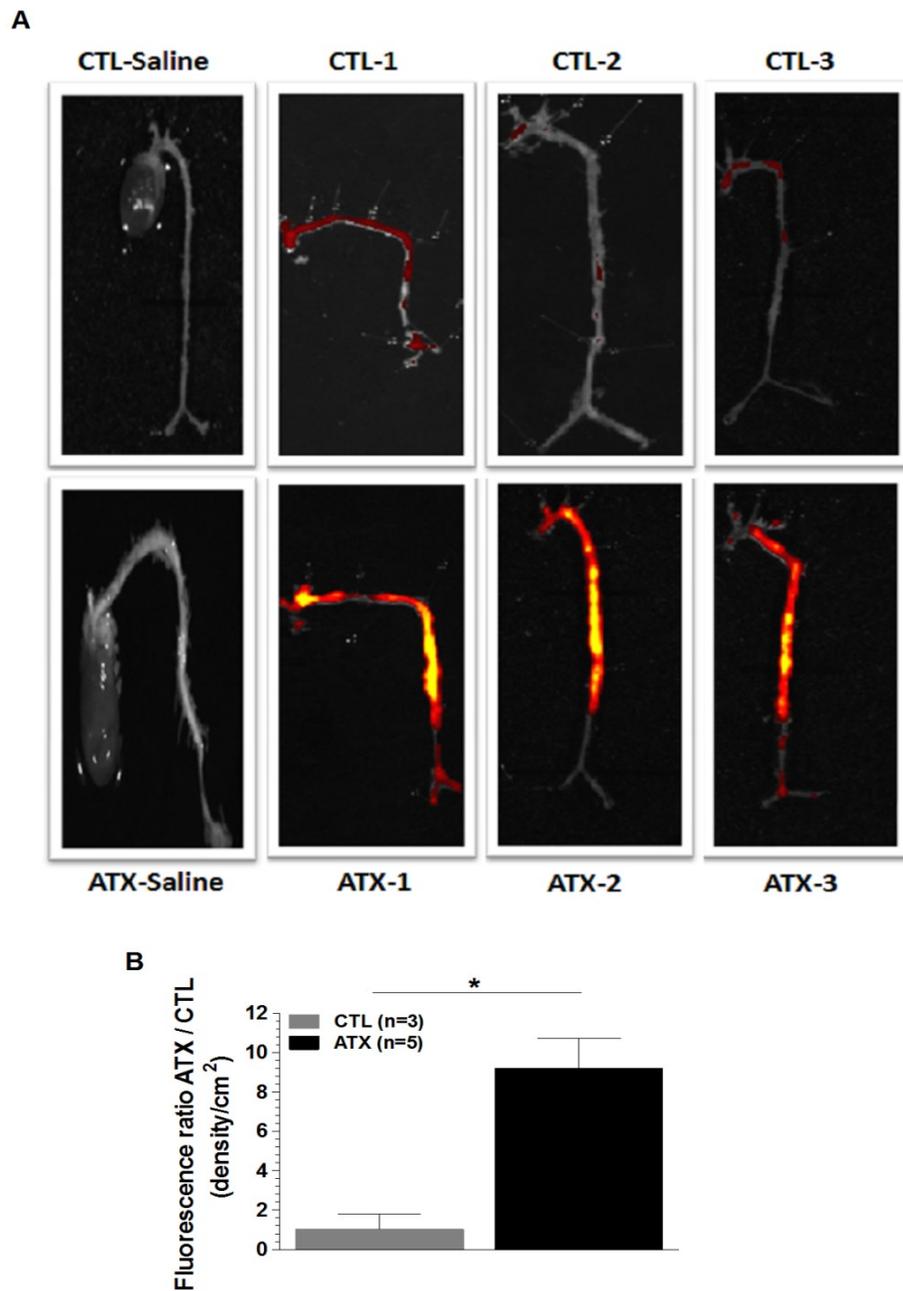


Figure 7. Characterization of the *in vivo* activation of the apoA-I-Cy5.5 probe by *ex vivo* imaging. (A) Near infrared fluorescence signal in aorta of the atherosclerotic mice (ATX) compared to normal mice (C57BL/6J). The images are presented as overlays of fluorescent image with white light image. (B) Lumina II Living Image software quantification of the total fluorescence (density/cm²). Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM) (ATX n=5; CTL n=3; * : P = 0.0253).

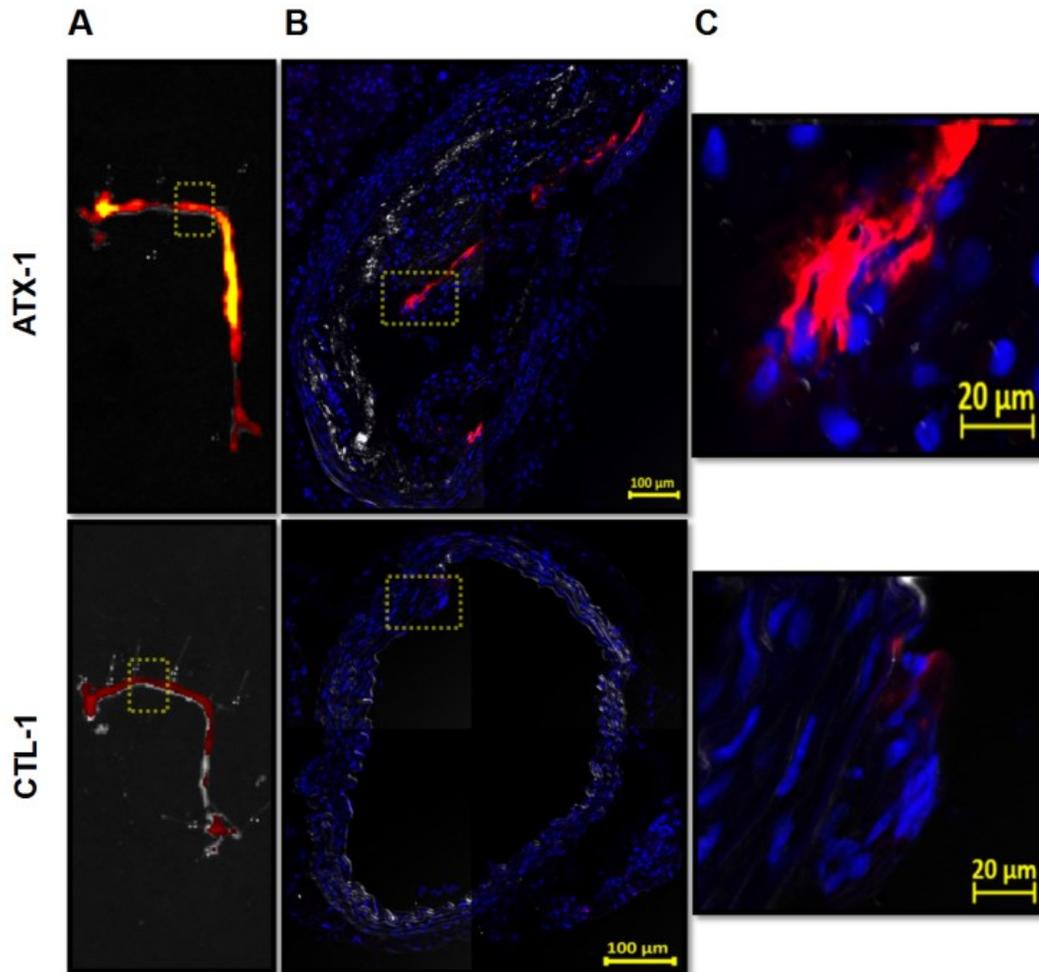


Figure 8. Confocal microscopy analysis of thoracic aorta cryosections. (A) Indication of the origin of the cryosection slices in the thoracic aorta visualized by *ex vivo* imaging. (B) Localisation of the fluorescent signal on the thoracic aorta cryosections by confocal microscopy (10X). (C) Zoomed image of the boxed region.

4. Discussion

Here we report on a novel activatable fluorescent probe based on the conjugation of a full-length apoA-I protein with the Cy5.5 near-infrared fluorescent dye. The probe fluorescence is increased by protease activities degrading apoA-I. This new probe offers the following advantages: (1) the intact protein-based probe has low background due to fluorophore quenching, (2) the probe can be activated through cleavage at multiple sites and by different proteases that target apoA-I. Structural studies of apoA-I by thermal unfolding has demonstrated that the apoA-I molecule exhibits a loosely folded, molten globular-like structure³³. The observed quenching property of our apoA-I-Cy5.5 probe may be related to the presence of Cy5.5 residues being brought sufficiently close in the context of the three-dimensional apoA-I structure. There are 21 lysines and 13 arginines present in the apoA-I sequence that represent possible targets of the Cy5.5 dye conjugation on the protein. Our results indicate that the Cy5.5 dye had access to about 17 to 18 of these 34 side chains as indicated by the change in the molecular weight of the apoA-I. The resulting fluorescence energy transfer (FRET) of the excited-state energy between neighboring Cy5.5 molecules covalently attached to apoA-I leads to the autoquenching phenomenon. Heating at 95C° or SDS denaturation did not significantly impaired the quenching state of the probe as demonstrated by the very low fluorescence observed in absence of proteases on denaturing SDS-gel (Figure 1B). However, proteolytic activities from chymase, trypsin, cathepsin S or MMP-12 resulted in similar significant increase of fluorescence (≈ 11 folds) due to unquenching following protein fragmentation.

Trypsin and cathepsin S exhibit similar specificities in their proteolytic activity, cleaving proteins at basic amino acid (Lys/Arg) residues^{34, 35, 36}, which we believe are the main

primary amine targets to Cy5.5 NHS ester conjugation in the conditions used to produce our apoA-I probe. Also, some study have shown that NHS ester dyes could target other primary amino acid such as tyrosine, however, this would be less efficient in alkaline pH like in our study³⁷. The presence of Cy5.5 molecules on apoA-I did not hinder significantly cleavage by these proteases as indicated by the presence of multiple fragments after exposure to proteases. Moreover we observed that the pattern of the fragments following probe cleavage by these protease was very similar to that of intact apoA-I protein (data not shown). Chymase specifically hydrolyzes at the carboxyl side of aromatic amino acids (Try/Tyr, Phe residues) on the apoA-I, especially at Tyr 18 and Phe 225 and possibly also at a third cleavage site at Phe 229 that was recently characterized^{20, 21}, which is compatible with the apparition of two smaller fragments of approximately 15 and 14 kDa (Figures 1B and 1C). Although Cy5.5 NHS ester should not target Tyr or Phe side chains under the conditions used, we observed the presence of several lysines neighbouring chymase-specific cleavage sites, which could potentially be linked to Cy5.5 dye on our apoA-I-Cy5.5 probe and probably contribute to fluorescence unquenching following apoA-I cleavage by chymase. Fragmentation of the apoA-I protein by MMP-12 was previously characterized by Kovanen et al., which reported at least 5 cleavage sites, mostly present in the C-terminal region³⁸. This is corroborated by our results showing multiple fragments after MMP-12 proteolysis of the apoA-I probe and which also matched with the fragment profile detected by western-blot, after incubation of the native apoA-I protein with MMP-12 (data not shown).

We noted, after performing our kinetic experiments, some differences in the maximum fluorescence emitted after the incubation upon time of the apoA-I-Cy5.5 probe with the different proteases tested (Figures 3 and 4). (Figures 3 and 4). One explanation for this

observation may be that the maximum fluorescence emission is dependent on the level of Cy5.5 unquenching which is dependent on the specific site of cleavage for each protease and the distribution of the Cy5.5 dyes on the amino acid residues surrounding the specific protease cleavage sites on the protein. Therefore it is expected that different cleavage site patterns may result in different levels of unquenching, however, we feel that, given this limitation, each protease tested showed a very good level of apoA-I-Cy5.5 probe activation.

Our apoA-I-Cy5.5 probe used as a substrate for proteolysis fulfills many essential requirements for a quantitative protease assay. Indeed, when we compared our developed apoA-I-Cy5.5 probe to the different activatable fluorescent probes previously reported, for instance BSA-BODIPY, elastine-FITC or casein-FITC^{24, 25, 27} which were tested mainly for *in vitro* quantitative protease activity assays, our probe showed an equivalent and in some case a highest fold increase in fluorescence allowing a sensitive and reliable quantification of proteolytic activities resulting in degradation of the apoA-I protein. This was also true, when we compared our probe with some peptide probes designed for *in vitro* and *in vivo* protease activities assessment. For instance, Weissleder et al, reported in one of their studies a 700 to 800% increase in fluorescence after activation of the tested Cy5.5-R4-Cy7-CLIO peptide probe³⁹, which is comparable to the fluorescence increase (up to 1200%) of our probe.

In situ zymography allows estimating different protease activities and at the same time to localize these activities in tissue sections. It was first adapted from the gel zymography technique using frozen tissue sections⁴⁰. Using this method adapted for our probe, we showed an increase in the fluorescence by *in situ* proteolysis of the apoA-I-Cy5.5 probe, which is highlighted by over 50% diminution of the fluorescence emission after inhibition of proteases activities in the tissues using a broad-spectrum proteases inhibitor mix. It should be noted,

however, that the 50% decrease in fluorescence is not meant as a direct correlation with the decrease in proteolytic activities in the atherosclerotic tissue. Indeed, the *in vitro* assessment of apoA-I-Cy5.5 proteolytic activities in presence of protease such as chymase, cathepsin S, trypsin and MMP-12, showed that using twice the amount of proteases in the reaction resulted in 2-fold increase of proteolytic activities degrading the apoA-I-Cy5.5 probe, as measured by the rate of fluorescence increase emitted at the early phase of the reaction (Figure 3 and 4). However, we did not observe a 2-fold increase of relative fluorescence signal at the end of the reactions (Figure 3 and 4). Therefore, it would probably be preferable to perform *in situ* zymography kinetic experiments with our probe and different protease inhibitors and to complement these data with the characterization of the expression of the main protease candidates that may contribute to apoA-I degradation in the tissue of interest.

In the past decade, a variety of imaging techniques were developed to assess atherosclerotic lesions, mostly by the study of plaque volume, thickness and obstructed vessel diameter. However, few are able to assess biological activity during plaque progression⁴¹. Fluorescence molecular tomography (FMT) is an imaging technique able to quantitatively detect a fluorescent signal (NIRF) in three dimensions⁴², where light excitation of the target organ is achieved from several directions and the emitted signal is collected from several projections, then measured, and combined to represent the distribution of fluorophores in tissues^{43,44}. The combination of FMT with MRI enables the construction of a heterogeneous model which improves the simulations of photons propagation and elimination of background signal, particularly from lung tissues. Our results obtained when comparing *in vivo* FMT-MRI and *ex vivo* fluorescence reflectance imaging confirmed that heterogeneous modeling is beneficial to reconstructions and improved localization and quantification of the reporter³².

One of the goal of the present study was to push for further application using our developed bioactivatable apoA-I-Cy5.5 probe to assess *in vivo* proteolytic activities degrading the apoA-I. The increase in fluorescence observed in atherosclerotic compared to normal mice was probably caused by the presence of protease activities present in atherosclerotic lesions and able to degrade apoA-I protein.

Many studies showed that proteolytic degradation of the apoA-I protein may be responsible for significant alteration of its functions typically associated with HDL, such as cholesterol efflux^{36,20}. Usually, the detection of protease activities, such as from MMPs, are achieved using the commonly used BSA, gelatine or casein conjugated probes. For increased specific assessment, peptide-based activatable probes are also often used. However, such fluorescent probes have limitations for the characterisation of the global protease activities degrading the apoA-I. Hence, our apoA-I-Cy5.5 bioactivatable probe opens up several applications including those presented in this paper. In addition, it will be possible to use this probe for the assessment of plasma protease activities degrading the apoA-I protein in circulation from cardiovascular disease patients. Moreover, it will also be possible to study the proteolytic activities degrading apoA-I in tissue homogenates from atherosclerotic patients. Also, we can adapt this probe to different techniques used for protease activity detection such as in gel zymography. Combining those several applications for our bioactivatable probe with specific protease inhibitors and protease expression characterization will then allow us to dissect the nature of the most deleterious protease(s) to apoA-I protein integrity and functionality in different tissues and clinical conditions. The increased knowledge of the apoA-I-degrading activities could result in new therapeutical approaches. Such information could be central to selectively and specifically inhibit target deleterious protease to protect the

integrity of apoA-I protein which could improve HDL-based therapies. Although apoA-I on mature HDL seems protected by proteases²¹, it was reported that only 3% of the apoA-I present in the healthy or atherosclerotic artery tissue are associated with HDL particles and approximately 92% of apoA-I is found in free, non-lipidated form in arteries⁴⁵. Such protease inhibition approach, either direct or indirect (eg. through reducing inflammation), could be used in combination with HDL-based therapeutic strategies to protect reconstituted HDL or endogeneously increased HDL. CETP inhibition, for instance, can result in significant HDL remodeling and maintain the production of pre-beta HDL⁴⁶, the small minimally lipidated HDL particles that play a critical role in cholesterol efflux but that are particularly sensitive to protease degradation.⁴⁷ Such approaches could enhance the benefits of endogenous or exogenous HDL-based therapies, particularly in certain clinical presentations where deleterious proteolytic activity is present.

5. Conclusion

In summary, we have developed a new bioactivatable full-length apoA-I-Cy5.5 conjugated near-infrared probe which may be useful for *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* detection and quantification of protease activities responsible for the degradation of the apoA-I protein, the critical component for HDL functionality. Providing specific measurements of apoA-I-altering proteolytic activities will improve our understanding regarding the molecular mechanisms implicating proteases involved in atherosclerosis or other related disease linked to impaired HDL functionality and may help to improve HDL-based therapeutic strategies.

6. Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the statistical analysis by Mariève Cossette, M.Sc, at the Montreal Heart Institute Coordinating Center (MHICC). Special thanks to Romain Berti PhD, and Philippe Pouliot PhD, for scientific advises and technical help in the current manuscript.

7. Funding

Dr. Tardif holds the Canada Research Chair in translational and personalized medicine and the Université de Montréal endowed research chair in atherosclerosis.

8. References

1. Faxon, D. P., Creager, M. A., Smith, S. C., Jr., Pasternak, R. C., Olin, J. W., Bettmann, M. A., Criqui, M. H., Milani, R. V., Loscalzo, J., Kaufman, J. A., Jones, D. W., Pearce, W. H., and American Heart, A. (2004) Atherosclerotic Vascular Disease Conference: Executive summary: Atherosclerotic Vascular Disease Conference proceeding for healthcare professionals from a special writing group of the American Heart Association, *Circulation* 109, 2595-2604.
2. Galkina, E., and Ley, K. (2009) Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis, *Annual review of immunology* 27, 165-197.
3. John E. Deanfield, J. P. H. a. T. J. R. (2007) Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance, *Circulation* 115, 1285-1295.
4. Johnson, J. L., Devel, L., Czarny, B., George, S. J., Jackson, C. L., Rogakos, V., Beau, F., Yiotakis, A., Newby, A. C., and Dive, V. (2011) A selective matrix metalloproteinase-12 inhibitor retards atherosclerotic plaque development in apolipoprotein E-knockout mice, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 31, 528-535.
5. Adiguzel, E., Ahmad, P. J., Franco, C., and Bendeck, M. P. (2009) Collagens in the progression and complications of atherosclerosis, *Vascular medicine* 14, 73-89.
6. Galina K. Sukhova, G.-P. S., Daniel I. Simon, Harold A. Chapman, and Peter Libby. (1998) Expression of the Elastolytic Cathepsins S and K in Human Atheroma and Regulation of their Production in Smooth Muscle Cells *J. Clin. Invest* 102, 576-583.
7. Rodgers, K. J., Watkins, D. J., Miller, A. L., Chan, P. Y., Karanam, S., Brissette, W. H., Long, C. J., and Jackson, C. L. (2006) Destabilizing role of cathepsin S in murine atherosclerotic plaques, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 851-856.
8. Juan Jose Badimon, L. B., and Valentin Fuster. (1990) Regression of Atherosclerotic Lesions by High Density Lipoprotein Plasma Fraction in the Cholesterol-fed Rabbit *J. Clin. Invest.* 85, 1234-1241.
9. Edward M. Rubin, R. M. K., Elizabeth A. Spangler, Judy G. Verstuyft, Shirley M. Clift. (1991) Inhibition of early atherogenesis in transgenic mice by human apolipoprotein AI *Nature* 353.
10. ANDREW S. PLUMP, C. J. S., AND JAN L. BRESLOW. (1994) Human apolipoprotein A-I gene expression increases high density lipoprotein and suppresses atherosclerosis in the apolipoprotein E-deficient mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci* 91, 9607-9611.
11. Vaisar, T., Pennathur, S., Green, P. S., Gharib, S. A., Hoofnagle, A. N., Cheung, M. C., Byun, J., Vuletic, S., Kassim, S., Singh, P., Chea, H., Knopp, R. H., Brunzell, J., Geary, R., Chait, A., Zhao, X. Q., Elkon, K., Marcovina, S., Ridker, P., Oram, J. F., and Heinecke, J. W. (2007) Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL, *The Journal of clinical investigation* 117, 746-756.
12. Davidson, W. S., Silva, R. A., Chantepie, S., Lagor, W. R., Chapman, M. J., and Kontush, A. (2009) Proteomic analysis of defined HDL subpopulations reveals

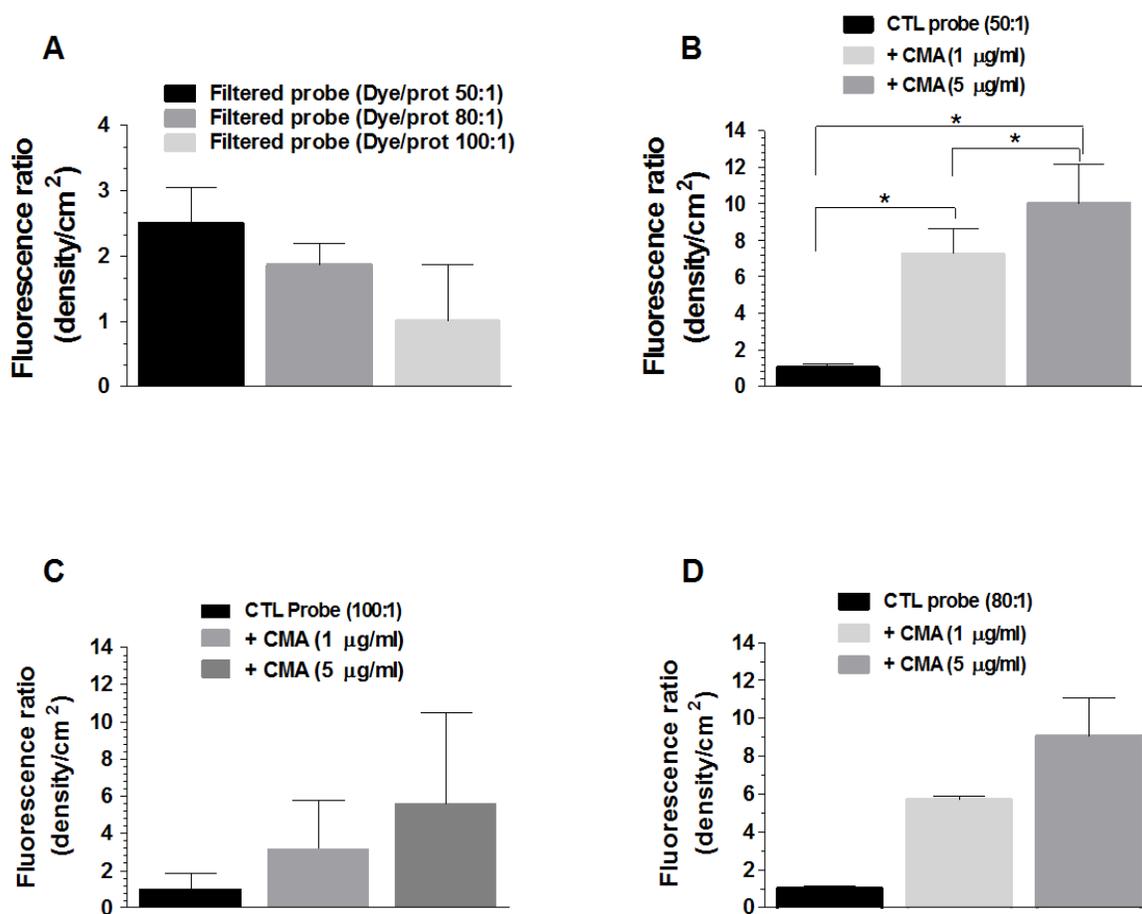
- particle-specific protein clusters: relevance to antioxidative function, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 29, 870-876.
13. Navab, M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., and Fogelman, A. M. (2011) HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms, *Nature reviews. Cardiology* 8, 222-232.
 14. Pollard, R. D., Fulp, B., Samuel, M. P., Sorci-Thomas, M. G., and Thomas, M. J. (2013) The conformation of lipid-free human apolipoprotein A-I in solution, *Biochemistry* 52, 9470-9481.
 15. Qin, S., Kamanna, V. S., Lai, J. H., Liu, T., Ganji, S. H., Zhang, L., Bachovchin, W. W., and Kashyap, M. L. (2012) Reverse D4F, an apolipoprotein-AI mimetic peptide, inhibits atherosclerosis in ApoE-null mice, *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics* 17, 334-343.
 16. Morgantini, C., Imaizumi, S., Grijalva, V., Navab, M., Fogelman, A. M., and Reddy, S. T. (2010) Apolipoprotein A-I mimetic peptides prevent atherosclerosis development and reduce plaque inflammation in a murine model of diabetes, *Diabetes* 59, 3223-3228.
 17. Arsenault, B. J., Dube, M. P., Brodeur, M. R., de Oliveira Moraes, A. B., Lavoie, V., Kernaleguen, A. E., Guauque-Olarte, S., Mathieu, P., Pibarot, P., Messika-Zeitoun, D., Bosse, Y., Rhainds, D., Rheame, E., and Tardif, J. C. (2014) Evaluation of links between high-density lipoprotein genetics, functionality, and aortic valve stenosis risk in humans, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 34, 457-462.
 18. Tardif, J. C., Rheame, E., Lemieux Perreault, L. P., Gregoire, J. C., Feroz Zada, Y., Asselin, G., Provost, S., Barhdadi, A., Rhainds, D., L'Allier, P. L., Ibrahim, R., Upmanyu, R., Niesor, E. J., Benghozi, R., Suchankova, G., Laghrissi-Thode, F., Guertin, M. C., Olsson, A. G., Mongrain, I., Schwartz, G. G., and Dube, M. P. (2015) Pharmacogenomic determinants of the cardiovascular effects of dalcetrapib, *Circulation. Cardiovascular genetics* 8, 372-382.
 19. Huang, Y., DiDonato, J. A., Levison, B. S., Schmitt, D., Li, L., Wu, Y., Buffa, J., Kim, T., Gerstenecker, G. S., Gu, X., Kadiyala, C. S., Wang, Z., Culley, M. K., Hazen, J. E., DiDonato, A. J., Fu, X., Berisha, S. Z., Peng, D., Nguyen, T. T., Liang, S., Chuang, C. C., Cho, L., Plow, E. F., Fox, P. L., Gogonea, V., Tang, W. H., Parks, J. S., Fisher, E. A., Smith, J. D., and Hazen, S. L. (2014) An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma, *Nature medicine* 20, 193-203.
 20. Usami, Y., Kobayashi, Y., Kameda, T., Miyazaki, A., Matsuda, K., Sugano, M., Kawasaki, K., Kurihara, Y., Kasama, T., and Tozuka, M. (2013) Identification of sites in apolipoprotein A-I susceptible to chymase and carboxypeptidase A digestion, *Bioscience reports* 33, 49-56.
 21. Lee, M., Kovanen, P. T., Tedeschi, G., Oungre, E., Franceschini, G., and Calabresi, L. (2003) Apolipoprotein composition and particle size affect HDL degradation by chymase: effect on cellular cholesterol efflux, *Journal of lipid research* 44, 539-546.
 22. Funovics, M., Weissleder, R., and Tung, C. H. (2003) Protease sensors for bioimaging, *Analytical and bioanalytical chemistry* 377, 956-963.
 23. Wellington Pham, W.-F. L., Ralph Weissleder, and Ching-Hsuan Tung. (2003) High Efficiency Synthesis of a Bioconjugatable Near-Infrared Fluorochrome, *Bioconjugate Chem* 14, 1048-1051.

24. Pickering, A. M., and Davies, K. J. (2012) A simple fluorescence labeling method for studies of protein oxidation, protein modification, and proteolysis, *Free radical biology & medicine* 52, 239-246.
25. Jones, L. J., Upson, R. H., Haugland, R. P., Panchuk-Voloshina, N., Zhou, M., and Haugland, R. P. (1997) Quenched BODIPY dye-labeled casein substrates for the assay of protease activity by direct fluorescence measurement, *Analytical biochemistry* 251, 144-152.
26. Voss, E. W., Jr., Workman, C. J., and Mummert, M. E. (1996) Detection of protease activity using a fluorescence-enhancement globular substrate, *BioTechniques* 20, 286-291.
27. Palmier, M. O., Fulcher, Y. G., and Van Doren, S. R. (2011) Solubilized elastin substrate for continuous fluorimetric assay of kinetics of elastases, *Analytical biochemistry* 408, 172-174.
28. Hensley, H. H., Roder, N. A., O'Brien, S. W., Bickel, L. E., Xiao, F., Litwin, S., and Connolly, D. C. (2012) Combined in vivo molecular and anatomic imaging for detection of ovarian carcinoma-associated protease activity and integrin expression in mice, *Neoplasia* 14, 451-462.
29. Agarwal, A., Boettcher, A., Kneuer, R., Sari-Sarraf, F., Donovan, A., Woelcke, J., Simic, O., Brandl, T., and Krucker, T. (2013) In vivo imaging with fluorescent smart probes to assess treatment strategies for acute pancreatitis, *PloS one* 8, e55959.
30. Aikawa, E., Nahrendorf, M., Sosnovik, D., Lok, V. M., Jaffer, F. A., Aikawa, M., and Weissleder, R. (2007) Multimodality molecular imaging identifies proteolytic and osteogenic activities in early aortic valve disease, *Circulation* 115, 377-386.
31. Aikawa, E., Aikawa, M., Libby, P., Figueiredo, J. L., Rusanescu, G., Iwamoto, Y., Fukuda, D., Kohler, R. H., Shi, G. P., Jaffer, F. A., and Weissleder, R. (2009) Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease, *Circulation* 119, 1785-1794.
32. Li, B., Maafi, F., Berti, R., Pouliot, P., Rheume, E., Tardif, J. C., and Lesage, F. (2014) Hybrid FMT-MRI applied to in vivo atherosclerosis imaging, *Biomedical optics express* 5, 1664-1676.
33. Gursky, O., and Atkinson, D. (1996) Thermal unfolding of human high-density apolipoprotein A-1: implications for a lipid-free molten globular state, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 2991-2995.
34. Olsen, J. V., Ong, S. E., and Mann, M. (2004) Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues, *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3, 608-614.
35. Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D. C., Lecaille, F., Bogyo, M., Bromme, D., Ellman, J. A., and Craik, C. S. (2006) Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities, *The Journal of biological chemistry* 281, 12824-12832.
36. Lindstedt, L., Lee, M., Oorni, K., Bromme, D., and Kovanen, P. T. (2003) Cathepsins F and S block HDL3-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells, *Biochemical and biophysical research communications* 312, 1019-1024.
37. Abello, N., Kerstjens, H. A., Postma, D. S., and Bischoff, R. (2007) Selective acylation of primary amines in peptides and proteins, *Journal of proteome research* 6, 4770-4776.

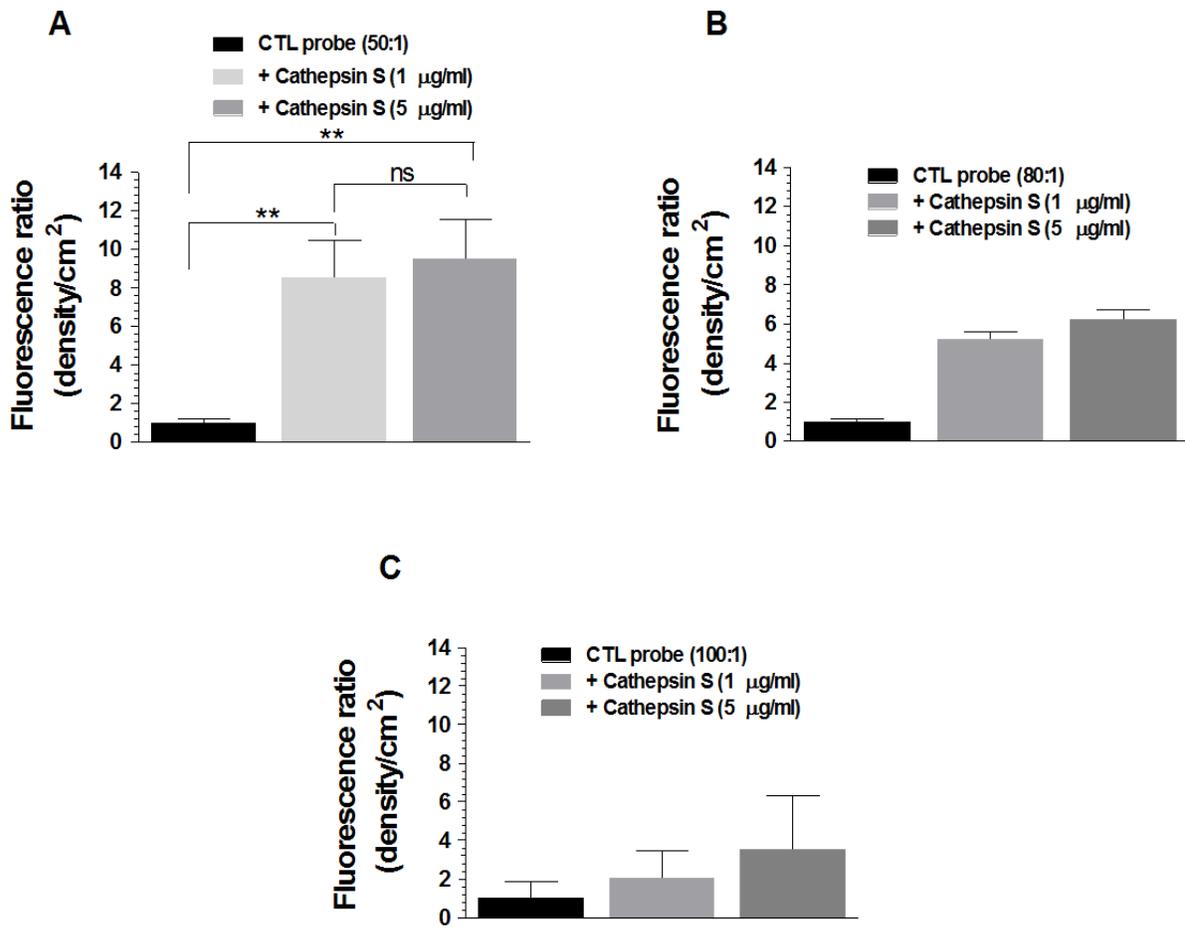
38. Lindstedt, L., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Welgus, H., and Kovanen, P. T. (1999) Matrix metalloproteinases-3, -7, and -12, but not -9, reduce high density lipoprotein-induced cholesterol efflux from human macrophage foam cells by truncation of the carboxyl terminus of apolipoprotein A-I. Parallel losses of pre-beta particles and the high affinity component of efflux, *The Journal of biological chemistry* 274, 22627-22634.
39. Moritz F. Kircher, R. W., and Lee Josephson. (2004) A Dual Fluorochrome Probe for Imaging Proteases, *Bioconjugate Chem* 15, 242-248.
40. Vandooren, J., Geurts, N., Martens, E., Van den Steen, P. E., and Opdenakker, G. (2013) Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes, *Nature methods* 10, 211-220.
41. Mitchel, J., Waters, D., Lai, T., White, M., Alberghini, T., Salloum, A., Knibbs, D., Li, D., and Heller, G. V. (2000) Identification of coronary thrombus with a IIb/IIIa platelet inhibitor radiopharmaceutical, technetium-99m DMP-444: A canine model, *Circulation* 101, 1643-1646.
42. Ntziachristos, V., Tung, C. H., Bremer, C., and Weissleder, R. (2002) Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo, *Nature medicine* 8, 757-760.
43. Ntziachristos, V., Chance, B., and Yodh, A. (1999) Differential diffuse optical tomography, *Optics express* 5, 230-242.
44. Ntziachristos, V., and Weissleder, R. (2001) Experimental three-dimensional fluorescence reconstruction of diffuse media by use of a normalized Born approximation, *Optics letters* 26, 893-895.
45. DiDonato, J. A., Huang, Y., Aulak, K. S., Even-Or, O., Gerstenecker, G., Gogonea, V., Wu, Y., Fox, P. L., Tang, W. H., Plow, E. F., Smith, J. D., Fisher, E. A., and Hazen, S. L. (2013) Function and distribution of apolipoprotein A1 in the artery wall are markedly distinct from those in plasma, *Circulation* 128, 1644-1655.
46. Niesor, E. J., Magg, C., Ogawa, N., Okamoto, H., von der Mark, E., Matile, H., Schmid, G., Clerc, R. G., Chaput, E., Blum-Kaelin, D., Huber, W., Thoma, R., Pflieger, P., Kakutani, M., Takahashi, D., Dernick, G., and Maugeais, C. (2010) Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre-beta-HDL formation and increases reverse cholesterol transport, *Journal of lipid research* 51, 3443-3454.
47. Kunitake, S. T., Chen, G. C., Kung, S. F., Schilling, J. W., Hardman, D. A., and Kane, J. P. (1990) Pre-beta high density lipoprotein. Unique disposition of apolipoprotein A-I increases susceptibility to proteolysis, *Arteriosclerosis* 10, 25-30.
48. Sanan, D. A., Newland, D. L., Tao, R., Marcovina, S., Wang, J., Mooser, V., Hammer, R. E., and Hobbs, H. H. (1998) Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a), *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 4544-4549.
49. Huszar, D., Varban, M. L., Rinninger, F., Feeley, R., Arai, T., Fairchild-Huntress, V., Donovan, M. J., and Tall, A. R. (2000) Increased LDL cholesterol and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice with attenuated expression of scavenger receptor B1, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 20, 1068-1073.

50. Nakakubo, H., Fukuyama, H., Nakajima, M., Imada, T., Uno, S., Shiota, N., Takai, S., Miyazaki, M., and Nakamura, N. (2000) Secretory production of recombinant human chymase as an active form in *Pichia pastoris*, *Yeast* *16*, 315-323.

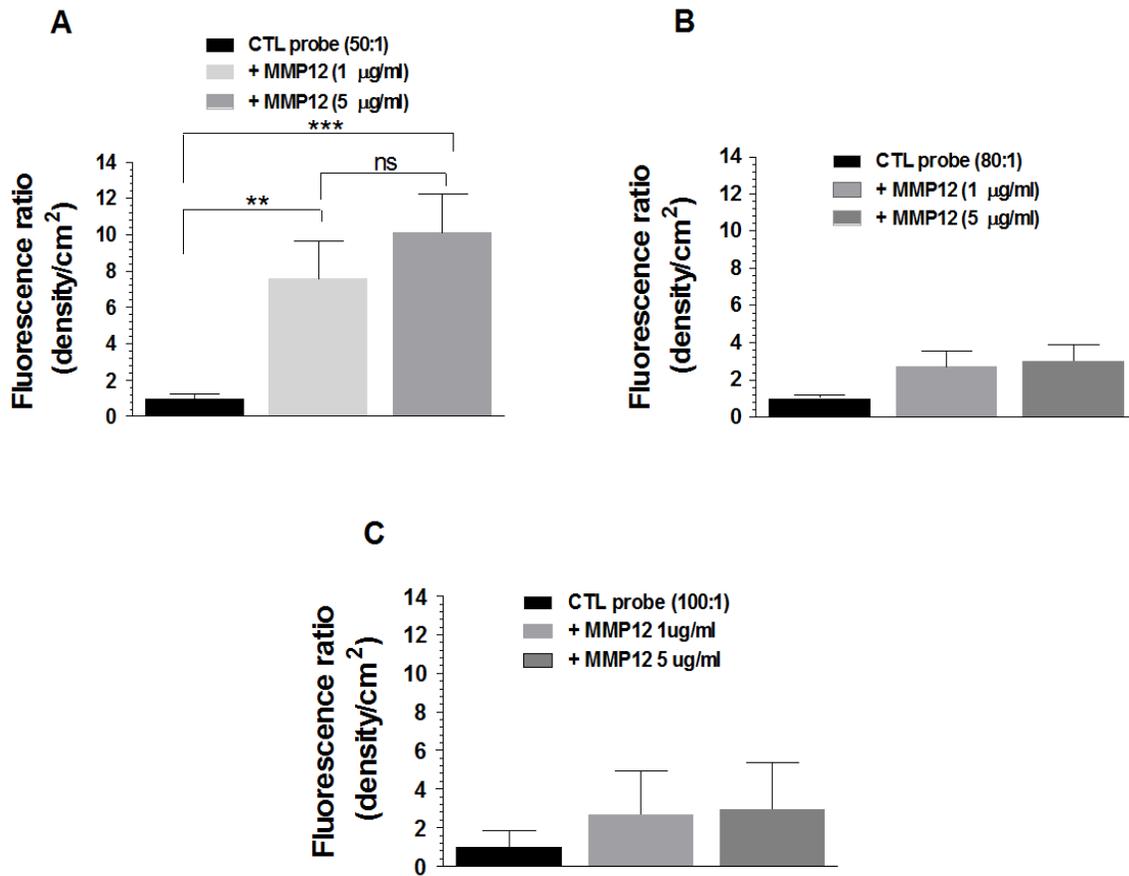
9. Supplementary figures



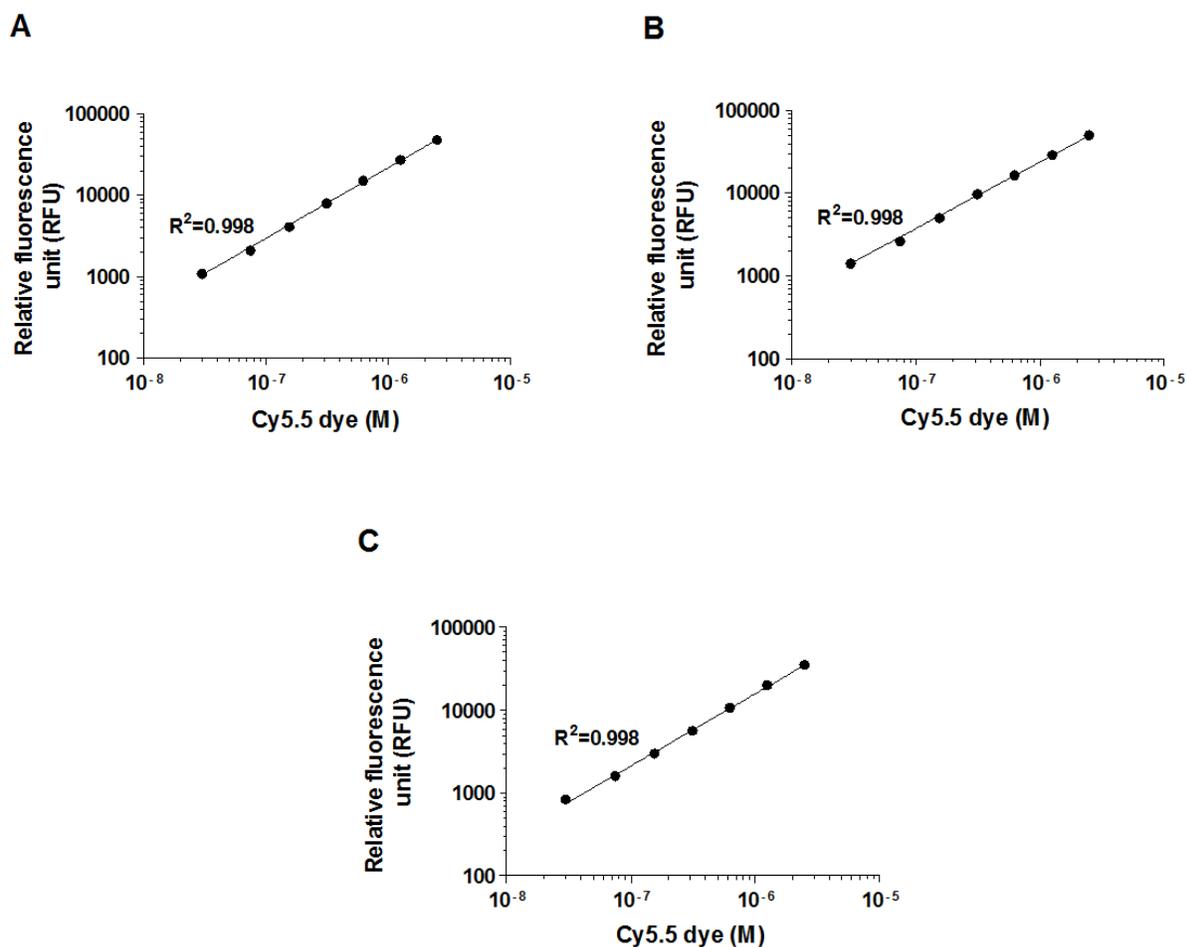
Supplementary Figure S1. Comparison between basal fluorescence emitted from the different dye/protein molar ratios (50, 80 or 100:1) by the synthesized apoA-I probe solution after removal of unbound Cy5.5 (A). Quantification of the total fluorescence emission (density/cm²) after proteolytic activation and fluorescence emission of the incubated apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe synthesized with either 50:1 (B; n=5), 80:1 (C; n= 2) or 100:1 (D; n= 2) dye/protein molar ratio, incubated with rh-rh-CMA protease (1, 5 μg/ml).



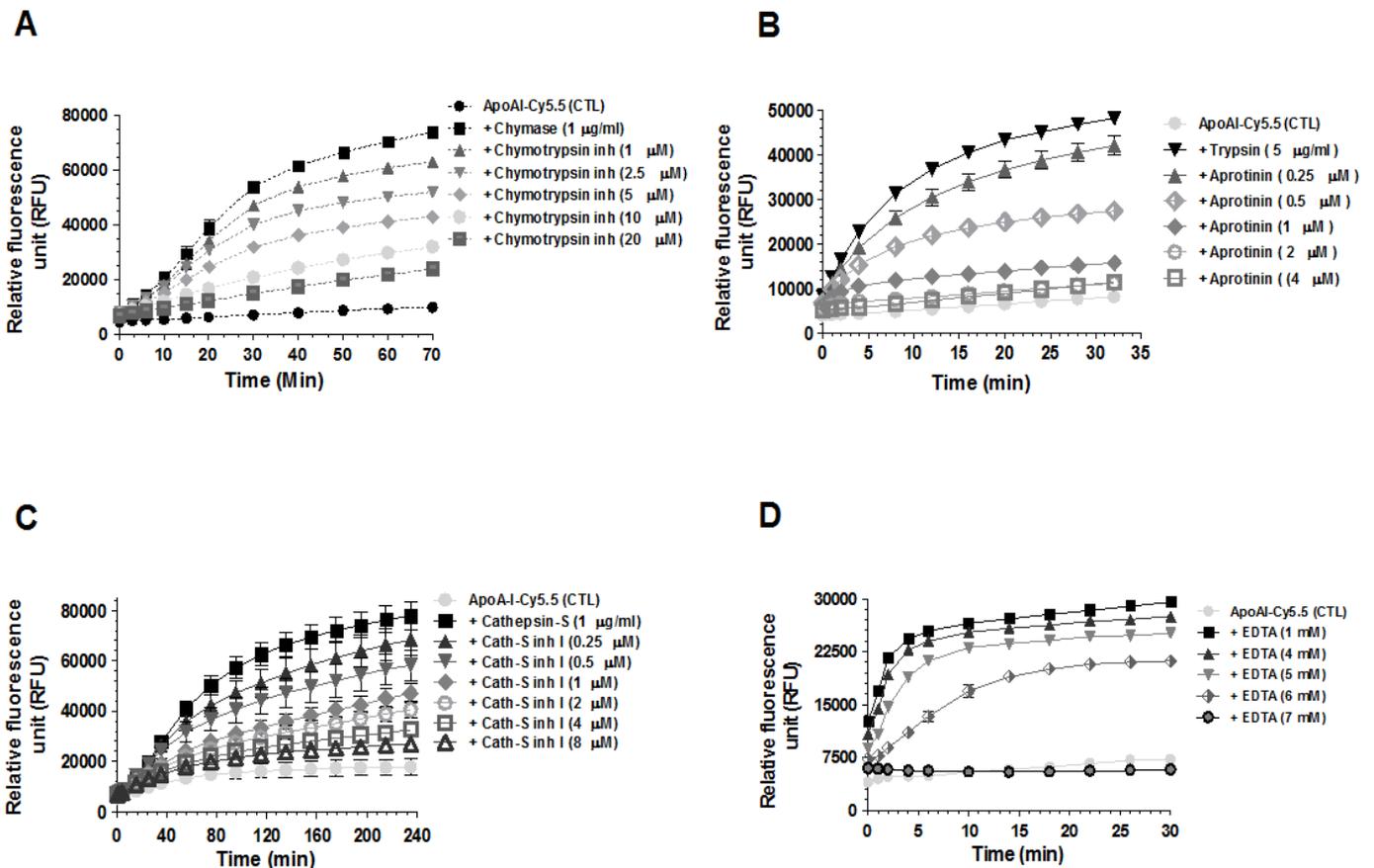
Supplementary Figure S2. Quantification of the total fluorescence emission (density/cm²) after proteolytic activation and fluorescence emission of the incubated of apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe synthesized with either 50:1 (A; n= 4), 80:1 (B; n= 2) or 100:1 (C; n= 2), dye/protein molar ratio, incubated with rh-Cathepsin S protease (1, 5 µg/ml) (** : P = 0.0009 and P = 0.0004 respectively for CTL vs Cathepsin S 1 µg/ml and CTL vs Cathepsin S 5 µg/ml; ns : P = 0.5254 for Cathepsin S 1 µg/ml vs Cathepsin S 5 µg/ml) .



Supplementary Figure S3. Quantification of the total fluorescence emission (density/cm²) after proteolytic activation and fluorescence emission of the incubated of apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe synthesized with either 50:1 (A ; n= 5), 80:1 (B; n= 2) or 100:1 (C; n= 2), dye/protein molar ratio, incubated with rm-MMP12 protease (1, 5 µg/ml) (*** : P = 0.0001 for CTL vs MMP12 (5 µg/ml) ; ** : P = 0.0015 for CTL vs MMP12 (1 µg/ml); ns : P = 0.1355 for MMP12 (1 µg/ml) vs MMP12 (5 µg/ml)).



Supplementary Figure S4. Log-Log graphs displaying in different protease buffers linear correlation between free Cy5.5 dye concentration (0.03 to 2.5 μ M), and fluorescence. (A) Measurements performed in the trypsin-specific activity buffer. (B) Measurements performed in the cathepsin S-specific activity buffer. (C) Measurements performed in the MMP-12-specific activity buffer. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean (SEM, n=5). Error bars are too small to be visible on the graphs.



Supplementary Figure S5. *In vitro* measurements using protease inhibitors. (A) Inhibition of chymase proteolytic activity by the chymotrypsin inhibitor (SoyBean). Recombinant human chymase protease (1 µg/ml) was incubated with apoA-I-Cy5.5 probe in the presence of 1 to 20 µM of chymotrypsin inhibitor. (B) Inhibition of trypsin proteolytic activity by aprotinin. Trypsin protease (5 µg/ml) was incubated with apoA-I-Cy5.5 probe in the presence of 0.25 to 4 µM of aprotinin. (C) Inhibition of recombinant cathepsin S proteolytic activity by the cathepsin inhibitor I. Cathepsin S protease (1 µg/ml) was incubated with apoA-I-Cy5.5 probe in the presence of 0.25 to 8 µM of cathepsin inhibitor I. (D) Inhibition of recombinant MMP-12 proteolytic activity by EDTA. Recombinant mouse MMP-12 protease (1 µg/ml) was incubated with apoA-I-Cy5.5 probe in the presence of 1 to 7 mM of EDTA. The fluorescence emitted from 40 µg/ml of apoA-I-Cy5.5 fluorescent probe was measured at 37 °C at the indicated time using fluorescence microplate reader. Data are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM) (rh-CMA: n=4, trypsin, Cath-S and MMP-12: n=3).

10. Supplementary methods

10.1. Animal model

We used an hypercholesterolemic / atherosclerotic mouse model (ATX , n= 12; 12 to 13 months old) which is deficient for the LDL receptor (*Ldlr*) gene and express the human apolipoprotein B (*Ldlr*^{-/-}; Tg(human apoB)). The mice were kindly given by Dr Éric Thorin. ApoB is the major lipoprotein composing LDL particles and is involved in cholesterol clearance through its interaction with the LDL receptor in the liver. The lack of *Ldlr* in ATX mice leads to increased LDL-C levels and development and progression of atherosclerosis, especially in older mice (> 10 months)^{48, 49}. Wild-type mice (C57BL/6J, n= 4; 10 months old) (Jackson Laboratory) were used as control mice. Animal care and procedures followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and were approved by the animal research ethics committee of Montreal Heart Institute.

10.2. Generation of apoA-I-Cy5.5 activatable probe

Full-length purified human apoA-I (Biomedical Technologies Inc) was intensively dialysed in Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X (pH 7.4) to remove ammonium bicarbonate from the original solution, and then concentrated to 10 mg/ml. 2 mg/ml of full-length purified human apoA-I (Biomedical Technologies Inc) solution in 0.1 M sodium phosphate (pH 8.5) were added to 3,53 mM (final concentration) of mono-reactive N-hydroxysuccinimide ester cyanine 5.5 fluorescent dye solution in DMSO (GE Healthcare Life Sciences). The final molar dye/protein ratio was 50:1. The mixture with a final pH of 8.3 was incubated for 2 h at room temperature in darkness with gentle mixing every 10 to 15 minutes. Unbound Cy5.5 dye was then removed by 6 spin-separation cycles at 14,000 g using a 10-kDa Amicon ultra centrifugal

filter (Millipore) followed with additional purification by size-exclusion using a Sephadex G25 PD-10 gel filtration column equilibrated with PBS (GE Healthcare Life Sciences). The concentration of the final purified probe was estimated using the manufacturer parameters for apoA-I (280 nm $E^{1\%} = 13$), the absorbance at 675 nm and absorbance correction factor at 280 nm (CF = 18 %) for Cy5.5 dye using a NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific).

10.3. *In vitro* activation and characterization of apoA-I-Cy5.5 probe

Protease preparations

Mature recombinant human chymase expressed in *Pichia pastoris* system (rh-CMA, 227 µg/ml stock solution, Sigma) and trypsin from porcine pancreas (Tryp, 20 µg/ml stock solution, Sigma), recombinant human cathepsin S (Cath-S, R&D systems) and recombinant mouse metalloproteinase 12 (MMP12, R&D systems) were used for the *in vitro* activation of the apoA-I-Cy5.5 probe. Prior to experiment, MMP12 (100 µg/ml) and Cath-S (100 µg/ml) were first activated in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 5 µM ZnCl₂, 0.05% Triton-X and 1 mM of 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) for 24 h at 37 °C and in 50 mM sodium acetate, 5 mM dithiothreitol (DTT), and 250 mM NaCl (pH 4.5) for 2 h at room temperature, respectively. rh-CMA expressed in *Pichia pastoris* were provided as mature active form⁵⁰

All proteases were then diluted to 10 µg/ml into the optimal reaction buffer for each protease : rh-CMA in 27 mM Tris-HCl (pH 7.8), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, trypsin in 50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 20 mM KCl, 5 mM magnesium acetate and 0.5 mM DTT, MMP12 in 50 mM

Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0.05% Triton-X , Cath-S in 50 mM sodium acetate, 5 mM DTT, 250 mM NaCl (pH 6.5).

***In vitro* protease activation of apoA-I-Cy5.5 probe and SDS-gel electrophoresis**

ApoA-I-Cy5.5 probe (0.5 mg/ml) was incubated with rh-CMA, MMP12, Cath-S (1, 5, 10 µg/ml) for 90 minutes at 37 °C or with trypsin (0.5, 1 µg/ml) for 20 to 40 minutes. All incubations occurred in the appropriate reaction buffer for each protease tested. Digested samples were then denatured for 5 minutes at 90 °C in Laemmli sample buffer and loaded for migration in a 15% polyacrylamide-SDS gel. The fluorescence released from unquenched apoA-I-Cy5.5 probe after its activation by proteases was visualized into a Caliper IVIS Lumina II multispectral imaging system using a 680 nm excitation filter and a 720 nm emission filter. Mann-Whitney test (Figure 1A), and one way ANNOVA test with Newman-Keuls multiple comparison post-hoc test (Figure 1C), were used for statistical analysis.

***In vitro* kinetics of protease activation of apoA-I-Cy5.5**

rh-CMA (0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2 µg/ml), trypsin (0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg/ml), Cath-S (0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 µg/ml), and MMP12 (0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 µg/ml) were placed in a 96-well microplate and 40 µg/ml of apoA-I-Cy5.5 probe substrate (dissolved in the optimal buffer for each protease) were added to each well. The final reaction volume was 150 µl. The fluorescence intensity was measured at 37 °C every 20 seconds using a kinetic mode and a Biotek Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate reader using 674 nm excitation and 700 nm emission wavelengths. Fluorescence emission intensities versus time were plotted using GraphPad 6.0 software. To measure the protease activity, we first generated a free Cy5.5 dye standard curve, then used the slope equation from the free Cy5.5 standard curve to extrapolate the increase of fluorescence in terms of equivalent amount of Cy5.5 released from the early

phase curves. The early phase of the reaction was defined as the linear portion of the fluorescence emission curve early after initiation of apoA-I probe degradation by the tested protease. Then, protease activities were expressed as amount of Cy5.5 released per second per μg of apoA-I probe (protein content) as substrate.

10.4. *In situ* zymography

To assess apoA-I proteolysis *in situ*, we incubated 7- μm thoracic aorta sections of a 13-month-old ATX mouse with our apoA-I-Cy5.5 probe substrate (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of DAPI (nuclear stain); 3 hours at 37 °C in a 0.1% low melting point agarose mixed with the appropriate reaction buffer, in presence or absence of a broad-spectrum protease inhibitor mix consisting in 1 mM PMSF, 10 μM aprotinin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trypsin-chymotrypsin inhibitor from Glycine max (Soybean), 0.25 mM of Cathepsin inhibitor I (Calbiochem), 10 μM of E64 (Calbiochem) and E64d (Sigma) and 20 mM EDTA. The images were analyzed using a Zeiss LSM-710 confocal microscope with 10X magnification. The Cy5.5 fluorescent signal was visualised using the 633-nm laser for excitation and 650-750 nm filter for emission. Quantification of the fluorescence intensity in the atherosclerotic plaque or in the atherosclerotic plaque and the external lamina elastic (total fluorescence intensity/ μm^2) were achieved using Zen-light 2008 software from Zeiss.

10.5. Hybrid FMT-MRI for *in vivo* imaging of apoA-I-Cy5.5 activation

A combined Fluorescence Molecular Tomography (FMT)-Magnetic Resonance Imaging system (MRI) system was used for *in vivo* molecular imaging. The specifications of the system were described elsewhere³². Here, imaging was performed to evaluate the *in vivo* activation of our apoA-I-Cy5.5 probe following its exposure to the protease activities degrading apoA-I present in the aorta of atherosclerotic mice model.

Five ATX (LDLR^{-/-}; Tg(human apoB); ~12 months old) and three wild-type (C57BL/6J; ~10 months old) mice were tail-injected with 100 µl of 1 mg/ml apoA-I-Cy5.5 probe diluted in saline solution (0.9% NaCl). For each mouse, imaging under isoflurane anaesthesia was conducted before and 24 hours after the administration of the probe. One additional ATX and one C57BL/6J mice were only injected with saline and imaged to estimate the background signal.

For FMT, the field of view (FOV) of the optical recording was designed to approximately cover the heart area. For MRI, a 2D CINE bright blood sequence (in rapid single phase mode) was used with cardiac, but no respiratory gating. The parameters were as follows: TR in the range 120-140 ms (one R-R interval), TE = 1.8 ms, FA = 30, 256 x 256 matrix leading to 0.18 x 0.14 mm resolution, 30 slices of 1 mm thickness, 20 averages for each slice. For each mouse, the FMT-MRI process was completed within ~45 minutes. After the imaging sessions, the mice were sacrificed by cardiac puncture under isoflurane (2.5 %) 1 L/min oxygen followed by intensive saline perfusion of the heart and aorta and then dissected. The hearts (data not shown) and aortas were imaged *ex vivo* to confirm the *in vivo* observation.

10.6. *Ex vivo* imaging using apoA-I-Cy5.5 probe

Dissected aortas were pinned in a glass petri dish coated with 5 mm black Sylgard and filled with 1 ml saline and then placed at 37 °C into a commercial epi-illumination fluorescence imaging system (IVIS Lumina II, PerkinElmer). The following parameters were used : 675 nm (± 20) / 720 (± 20) for excitation/emission filters, a field of view (FOV) of 10 cm, F/stop 1, Binning (M) 4/2, excitation time of 2 second. The total fluorescence density/cm² were analyzed using a computer-based digitizing image system software (Image Pro Plus, version 7.0).

After each imaging session, the aortas were embedded in optimal cutting temperature compound and preserved at -80 °C for further validation of the *ex vivo* imaging results by microscopy.

10.7. Validation of *ex vivo* imaging results by confocal microscopy

7 µm cryosections from thoracic aorta region of the ATX and C57BL/6J apoA-I-Cy5.5 probe-injected mice were incubated 30 min with 1 µg/ml DAPI in PBS for nucleus staining then mounted into an anti-fading medium; 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO) in glycerol. The sections were then imaged with confocal microscopy (Zeiss LSM-710) with 10X magnification, tailed 4X4 and a 633-nm laser for excitation and 650-750 nm filter for emission were used to detect the Cy5.5 fluorescent signal.

Discussion

De nombreuses études appuient la théorie des bienfaits du HDL-C et des particules HDL dans la prédiction du risque cardiovasculaire et dans la régression des lésions d'athérosclérose [209, 211, 330]. Cependant, les travaux récents de Kathiresan et ses collègues [331] et les effets neutres observés dernièrement avec les thérapies visant à augmenter le niveau de HDL-C ont remis en cause cette théorie [332]. Ces travaux ont mis en évidence la nécessité d'une réflexion plus profonde sur la question. À ce sujet, la fonctionnalité des particules HDL semble plus importante pour prédire le risque de développer une maladie cardiovasculaire, que juste évaluer les niveaux de HDL-C circulant [190, 215, 222, 225, 333, 334].

Parmi les causes d'altération de la fonction des HDL, l'apoA-I non-lipidé ou présente sur les petites particules de HDL a été rapportée comme étant sensible à l'action protéolytique des protéases impliquées dans la progression des plaques d'athéroscléroses [230]. Un tel clivage protéolytique de l'apoA-I peut altérer significativement la médiation du transport inverse du cholestérol ou l'efflux du cholestérol cellulaire à partir des macrophages [222, 335]. Remarquablement, on rapporte que seulement 3% de l'apoA-I présente au sein des artères, saines ou athérosclérotiques, est associée aux particules HDL et $\approx 92\%$ du total de l'apoA-I se retrouve sous forme libre non-lipidé [336].

Les travaux pionniers de Kovanen et ses collègues ont bien caractérisé l'impact du clivage de l'apoA-I par diverses protéases [222]. Toutefois, les travaux de Kovanen et ses collègues se sont basés essentiellement sur des approches *in vitro* qui décrivent les sites sur l'apoA-I potentiellement sensibles à la dégradation par les différentes protéases. Toutefois, aucun de ces travaux ne s'est attardé à essayer d'identifier parmi les différentes protéases, celle(s) qui pourraient causer le plus de dommages au niveau des plaques athérosclérotiques ou en circulation. En effet, ces événements protéolytiques, au niveau circulant ou local sur les petites HDL qui sont principalement impliquées dans l'efflux de cholestérol relayé par ABCA1, qu'elles soit de nature endogènes, ou reconstituées (rHDL) et utilisées dans les stratégies thérapeutiques basées sur les HDL, pourraient engendrer des particules HDL dysfonctionnelles en réduisant leur capacité d'accepter le cholestérol [231, 246, 248, 252].

Parmi les approches de détection des activités protéasiques spécifiques comme celles des cathepsines, les MMP et les chymases, on retrouve l'utilisation de sondes qui sont développées sur la base de courtes séquences peptidiques optimalement reconnues par ces protéases. Ces sondes peuvent permettre, avec une grande sensibilité, la détection de l'activité de ces protéases. Toutefois, l'importance en termes de dégradation globale de l'apoA-I causée par l'activité de chacune de ces protéases serait plus difficile à interpréter avec ce genre de sondes. En effet les sites de clivages utilisés dans des sondes peptidiques pour quantifier l'activité de chacune de ces protéases, ne sont pas exactement identiques à ceux ciblés par ces mêmes protéases sur l'apoA-I. Alors, nous ne pourrions pas conclure que ces protéases vont cliver l'apoA-I avec une efficacité équivalente à celle observée lors du clivage des sondes peptidiques présentant des séquences de reconnaissance optimales pour les différentes protéases.

Dans d'autres approches, on utilise des protéines natives, pleine longueur, connues pour être la cible de diverses protéases en les transformant en sondes fluorescentes bioactivables. Les exemples les plus connus sont les sondes gélatine-FITC, caséine-FITC, élastine-FITC et albumine-FITC (BSA-FITC). Nous retrouvons aussi plusieurs variantes de ces mêmes sondes conjuguées toutefois avec d'autres types de fluorophores comme le coumarin, le Bodipy et les cyanines, par exemple [261, 278]. La forme globulaire des protéines comme la BSA favorise la disponibilité des sites de liaison au fluorophore à la surface de la protéine avec, au final, une distribution homogène de ces fluorophores à la surface de la protéine. La distribution homogène de ces derniers, favorise le phénomène de l'auto-inhibition par FRET de la fluorescence émise par le complexe fluorophore / protéine [277]. L'utilisation de ces sondes protéiques fluorescentes bioactivables est bien décrite dans plusieurs études de détection et localisation de l'activité gélatinolytique, collagénolytique et élastinolytique de différentes protéases impliquées dans le développement et la progression de l'athérosclérose [308, 337]. Cependant, l'utilisation de ce type de sonde ne fournit pas d'informations directes sur l'activité protéolytique dégradant l'apoA-I spécifiquement.

Ainsi donc, dans notre étude, nous avons traité la question de la dégradation de l'apoA-I en développant pour la première fois une sonde fluorescente bioactivable basée sur l'utilisation d'une apoA-I native conjuguée avec un fluorophore proche infrarouge de type

Cy5.5-NHS-ester, pour la quantification *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* de l'activité protéolytique globale dégradant l'apoA-I.

La première étape de notre travail consistait à conjuguer l'apoA-I avec divers excès de fluorophore et valider *in vitro* la fonctionnalité de notre sonde apoA-I-Cy5.5-NHS-ester en mesurant le gain de fluorescence après sa protéolyse. Nous avons donc exposé la sonde produite dans diverses conditions à des protéases connues pour leur capacité de cliver l'apoA-I, soit la chymase, la MMP-12 et la cathepsine S. Notre choix d'utiliser ces protéases est basé également sur leurs implications dans la progression et le développement de l'athérosclérose. Nous avons alors constaté les éléments suivants :

1- Lors de la détermination du ratio molaire (Cy5.5-NHS-ester/apoA-I) le plus efficace pour obtenir la meilleure inhibition du signal fluorescent émis par la sonde non-activée, un ratio molaire 100 : 1 (Cy5.5-NHS-ester/apoA-I) avait produit le plus faible signal de fluorescence émis par la sonde apoA-I-Cy5.5 basale en comparaison avec les ratios de 80 et 50 : 1 testés. Ce résultat indique que, plus la concentration du fluorophore utilisée dans la réaction de conjugaison par rapport à celle de la protéine est forte et plus le taux de « quenching » ou d'inhibition de la fluorescence basale émise par une sonde protéique bioactivable est faible. Ces résultats sont conformes avec des études précédentes sur le développement des sondes BSA et caséine bioactivables [261, 278]. Des résultats d'études utilisant les fluorophores de type Cy5 et Cy5.5 pour le marquage d'anticorps rapportent qu'un ratio fluorophore/protéine au-delà de 12:1 durant la phase de conjugaison permet de produire une inhibition de l'émission de la fluorescence par le complexe fluorophore / protéine [279, 338].

Nous savons que les groupes réactifs de types NHS-ester du Cy5.5 ciblent spécifiquement les chaînes latérales des acides aminés primaires de type arginine et lysine et d'une façon non spécifique, celles d'autres acides aminés comme la tyrosine et la thréonine [294, 296]. Les études de séquençage de l'apoA-I montrent que cette dernière contient 21 lysines et 13 arginines [171]. Le plus souvent ces lysines et arginines sont disposées sur la même hélice alpha de l'apoA-I et d'une manière rapprochée les unes des autres [171]. Nous pensons alors que durant la réaction de conjugaison, les molécules de NHS-ester-Cy5.5 utilisées avec un ratio de 100:1 auraient lié un nombre important d'acides aminés lysine et arginine, mais peut-être aussi des tyrosines et thréonines à la surface de l'apoA-I. Nous croyons que les molécules de Cy5.5 conjuguées à la protéine se retrouvent ainsi à proximité

les unes des autres à la surface de l'apoA-I causant l'auto-inhibition de la fluorescence émise par le Cy5.5.

2- Lors de l'activation protéolytique de la sonde apoA-I-Cy5.5 par la chymase, la trypsine, la cathepsine-S ou la MMP-12, on a observé une forte augmentation de l'émission du signal fluorescent, tel que souhaité. De façon similaire aux sondes BSA-FITC et BSA-Bodipy, la protéolyse de l'apoA-I engendre la libération de fragments peptidiques permettant ainsi l'éloignement des molécules de fluorophore, à proximité les unes des autres à la surface de l'apoA-I non-clivée, menant alors à une augmentation de la fluorescence émise [261, 277, 278]. On considère dans la littérature qu'une sonde fluorescente bioactivable est efficace lorsque l'augmentation du signal fluorescent émis durant l'activation protéolytique de la sonde est d'au moins 10 fois. Avec notre sonde, nous avons observé une augmentation allant jusqu'à ≈ 11 fois, suite aux analyses des données d'électrophorèses des fragments fluorescents libérés après l'activation protéolytique de notre sonde. Aussi, nous avons observé en terme de pourcentage d'activation jusqu'à $> 1200\%$ d'augmentation de la fluorescence lors de l'analyse des données de cinétique au fluorimètre. Ces résultats sont comparables aux pourcentages rapportés par les études caractérisant des sondes BSA-FITC [277] et parfois meilleurs que ceux rapportés dans certaines études utilisant des sondes peptidiques fluorescentes activables pour l'analyse de l'activité protéolytique [287, 339].

3- Bien que la fluorescence de base de la sonde synthétisée avec un ratio molaire de 100 : 1 (Cy5.5/apoA-I) était plus faible, notre sonde synthétisée avec un ratio molaire de 50 : 1 (Cy5.5/apoA-I) a démontré une plus grande augmentation de la fluorescence lors de son activation par les protéases testées comparée à celle synthétisée avec un ratio molaire de 100 : 1 (Cy5.5/apoA-I). Compte tenu de nos observations, il est possible qu'une quantité excessive de Cy5.5 couplé à l'apoA-I pourrait mener à la conjugaison sur des résidus rapprochés dans la séquence peptidique et qui ne peuvent être séparés les uns des autres lors de la protéolyse par ces protéases.

D'un autre côté, comme pour le FITC [261], la charge nette négative du Cy5.5, pourrait favoriser une conjugaison non spécifique à la protéine et augmenter le risque d'un changement dans la conformation structurelle de la protéine conjuguée [280] [261]. Par ailleurs, il est mentionné dans l'étude de Tricerri et ses collègues que la conjugaison d'une apoA-I avec des molécules d'Alexa-546 cause une légère baisse du contenu en hélices-alpha

de l'apoA-I [174]. Il est possible que le ciblage d'acides aminés non spécifiques ou un changement structurel de l'apoA-I causé par l'incorporation d'un grand nombre de molécules de Cy5.5 pourrait interférer avec l'ancrage de la protéase sur ces sites de clivage spécifique au niveau de l'apoA-I. Ce phénomène pourrait effectivement empêcher la protéase de cliver efficacement l'apoA-I et affecterait ainsi l'émission de la fluorescence par la sonde lors de son activation. Toutefois, en utilisant un ratio de 50 : 1 (Cy5.5/apoA-I) la présence de molécules Cy5.5 sur l'apoA-I ne semble pas entraver de manière significative le clivage protéolytique, tel qu'indiqué par la présence de fragments fluorescents après une exposition à de multiples protéases (Figure 1B et Figure 3 de l'article). De plus, nous avons observé que les motifs de ces fragments générés après protéolyse de l'apoA-I conjuguée au Cy5.5 étaient très similaires à ceux produits lors des protéolyses de la protéine apoA-I non conjuguée (Figure 18 en annexe et dans les études suivantes [231, 248, 340]).

Les différents sites de clivage sur l'apoA-I ont été bien caractérisés dans les cas de la chymase et de la MMP-12 [231, 252]. D'après ces études, l'apoA-I serait clivée au niveau des phénylalanines en positions 33, 225 et 229 et tyrosine en position 18 par la chymase et aux niveaux des lysines en position 226, leucines en positions 214 et 200 et la tyrosine en position 122, par la MMP-12. Toutefois dans le cas de la cathepsine S, les sites de clivages spécifiques à l'apoA-I ne sont pas connus. Par contre, on sait que la cathepsine S, comme la trypsine, cliverait les protéines en général au niveau des résidus lysines et arginines spécifiquement et avec une affinité moindre, au niveau des résidus thréonine et glutamine [250].

La face plane des cycles aromatiques des acides aminés phénylalanine, tyrosine et tryptophane possède une charge négative partielle due à ce qu'on appelle le π orbital. Il est aussi suggéré que les résidus d'acides aminés cationiques, arginines ou lysines, qui sont à une distance de 6,0 Å de la face d'un cycle aromatique (Phe, Tyr ou Trp) peuvent s'engager dans des interactions polaires appelées interactions cations π orbital [171]. Plusieurs cas de ces interactions ont été mentionnés et bien décrits dans une étude sur la structure de l'apoA-I et les acides aminés impliqués sont conservés dans les séquences d'apoA-I à travers les espèces, incluant l'homme [171]. En outre, ceci peut suggérer la présence de molécules Cy5.5 ciblant les lysines et arginines en des positions très rapprochées des résidus Phe et Tyr des sites de clivage spécifiques à la chymase. Dans le cas de la MMP-12, la trypsine et la cathepsine S, les mêmes acides aminés ciblés par ces protéases le sont aussi par le NHS-Ester-Cy5.5. Ceci

pourrait donc favoriser l'émission de la fluorescence observée lors de l'activation de notre sonde apoA-I-Cy5.5 par ces protéases, en absence d'altération structurelle de l'apoA-I conjuguée à des concentrations de Cy5.5 optimales.

La deuxième étape de notre travail portait sur l'utilisation de notre sonde apoA-I-Cy5.5 pour détecter et localiser l'activité protéasique dégradant l'apoA-I dans des sections tissulaires d'aorte de souris (ATX) athérosclérotiques (*Ldlr*^{-/-}; Tg (apoB^{+/+} humaine)) âgées de plus de 12 mois. L'étude par Wagsater et ses collègues a montré par la technique de zymographie *in situ* en utilisant une sonde fluorescente bioactivable de type gélatine-FITC, une importante activité protéasique (MMPs) au sein de la plaque d'athérosclérose chez les souris ATX âgées de plus de 40 semaines [337]. Dans notre étude, nous avons été capables d'observer une augmentation de la fluorescence par l'activation *in situ* de la sonde apoA-I-Cy5.5. De plus, nous avons observé que le signal fluorescent émis lors de l'activation de la sonde était localisé au niveau de la plaque d'athérome dans nos sections d'aorte. La MMP-12 et la cathepsine S peuvent dégrader l'apoA-I *in vitro* [252, 341]. L'activité *in situ* dans les plaques d'athéromes de ces dernières a été rapportée chez les souris athérosclérotiques, par zymographie *in situ* via l'utilisation de la sonde élastine-FITC bioactivable [100, 342]. L'ensemble des résultats de ces études suggère que ces deux protéases pourraient donc contribuer au moins en partie à l'activité menant à l'activation observée *in situ* de notre sonde apoA-I-Cy5.5. Par ailleurs, nous aurions pu démontrer plus clairement l'implication de la MMP-12 et de la cathepsine S dans l'activation *in situ* de notre sonde apoA-I-Cy5.5 en utilisant des inhibiteurs spécifiques à la MMP-12 et à la cathepsine S pour fin de comparaison dans nos expériences de zymographie *in situ*.

Nous avons observé une diminution de 50% de l'émission de la fluorescence de la sonde après l'inhibition de l'activité des protéases dans les tissus en utilisant un mélange d'inhibiteurs de protéases à large spectre. Toutefois, il convient de noter que la diminution de 50% de la fluorescence n'est pas nécessairement directement corrélée avec une diminution de 50 % des activités protéolytiques dans le tissu athérosclérotique. Nous nous sommes fait une idée à ce sujet lorsque nous avons comparé *in vitro* l'émission de la fluorescence lors de l'activation de la sonde apoA-I-Cy5.5 par les protéases testées et l'activité protéolytique de ces dernières (Tableau 8 en annexe). Nous avons en effet constaté qu'avec deux fois plus de protéases incubées avec la sonde, on obtient deux fois plus d'activité protéolytique tel que

mesuré par le taux initial d'augmentation de la fluorescence. Toutefois, on obtient pas deux fois plus de fluorescence totale à la fin de la réaction (phase plateau).

Par conséquent, en complément à la zymographie *in situ*, il sera souhaitable de caractériser aussi l'expression des principaux candidats de protéases qui peuvent contribuer à la dégradation de l'apoA-I dans le tissu d'intérêt. Aussi, nous pourrions essayer de caractériser les cinétiques d'apparition de la fluorescence en fonction du temps au cours de l'activation *in situ* de notre sonde en utilisant la microscopie à fluorescence en temps réel sur nos sections de tissus en présence et en absence d'inhibiteurs de protéases.

Les obstacles fondamentaux à l'imagerie optique pour l'observation de tissus *in vivo* sont souvent liés à la diffusion élevée de la lumière, l'auto-fluorescence tissulaire, la forte absorption de la lumière par l'hémoglobine et d'autres macromolécules, ainsi qu'à une faible pénétration de la lumière. Les fluorophores qui émettent la lumière fluorescente dans les longueurs d'onde proche de l'infrarouge (NIRF) comme le Cy5.5 sont souvent choisis pour le développement de sondes fluorescentes bioactivables *in vivo* parce que leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont associées à une réduction de l'auto-fluorescence tissulaire et à une augmentation de la profondeur de pénétration dans le tissu par rapport aux longueurs d'onde proche du visible et des fluorophores tel le FITC [343, 344].

Ainsi donc, notre choix d'utiliser un fluorophore dans le proche infrarouge (Cy5.5) pour la synthèse de notre sonde apoA-I-Cy5.5 nous a permis d'évaluer, dans la dernière étape de notre étude, la localisation de l'activité protéolytique qui activerait l'apoA-I-Cy5.5 *in vivo*. Pour cette étape, nous avons infusé des souris ATX et des souris sauvages (C57BL/6J) avec notre sonde apoA-I-Cy5.5. Contrairement aux souris ATX, les souris sauvages (C57BL/6J) ne développent pas ou peu de lésions d'athérosclérose en absence d'une diète riche en cholestérol [70]. Nous avons observé une augmentation plus importante de la fluorescence d'une manière localisée au niveau de l'aorte et du cœur chez les souris ATX que celle obtenue chez les souris sauvages. Nous pensons que cette augmentation du signal fluorescent est due à la présence d'activités protéolytiques présentes dans les lésions athérosclérotiques chez des souris ATX en comparaison avec les souris sauvages (C57BL/6J). Ces protéases étant capables de dégrader l'apoA-I auraient activé *in vivo* notre sonde apoA-I-Cy5.5. Il serait probablement souhaitable d'extraire les protéines de l'aorte vs. le cœur en présence d'inhibiteurs de protéases et d'essayer d'observer le patron de fragments fluorescents de la sonde apoA-I-Cy5.5 sur gel

PAGE-SDS. La complexité du patron et la taille des fragments pourraient donner un indice sur le type ou le nombre de protéases impliquées dans la dégradation *in vivo*.

Le manque d'études décrivant la dégradation de l'apoA-I *in vivo* rend difficile l'interprétation de nos résultats. Toutefois, dans une étude réalisée au sein de notre laboratoire [319], nous avons rapporté la détection *in vivo* d'une activité protéolytique, localisée au niveau de l'aorte et du cœur, de MMP chez des souris ATX infusées avec une sonde peptidique fluorescente bioactivable dans le proche infrarouge (MMPsense 680). La sonde MMPsense est connue pour être spécifique à la détection *in vivo* de l'activité des MMP-2, -3, -9 et -13 [345, 346]. La MMP-3 est aussi connue pour être capable de dégrader l'apoA-I *in vitro* [252]. Aussi, dans un modèle de sténose valvulaire aortique chez des souris apoE^{-/-}, une pathologie dont la progression et les facteurs de risque ressemblent beaucoup à ceux retrouvés en athérosclérose [347], l'activité protéolytique de la cathepsine S a été démontrée *in vivo* au niveau de l'aorte et de la valve aortique, par l'utilisation d'une sonde peptidique fluorescente bioactivable en proche infrarouge (CLIO-gly750 et OsteoSense680) [348]. La cathepsine S est aussi connue pour dégrader l'apoA-I *in vitro* [251]. Les résultats de ces études confirment indirectement nos observations *in vivo*.

Cependant, nous pensons aussi que l'activité protéolytique présente au niveau plasmatique par des protéases capables de dégrader l'apoA-I, pourrait aussi contribuer à l'activation de la sonde apoA-I-Cy5.5. Par exemple, l'activité de la plasmine est élevée dans le plasma de patients coronariens [349]. On rapporte aussi une augmentation des niveaux circulants de la kallikréine tissulaire chez des patients qui développent des lésions d'athérosclérose au niveau des artères carotides, cette augmentation est aussi corrélée positivement avec la sévérité des lésions [350]. Plusieurs membres de la famille des MMP (MMP-1,-2,-3, et -9) sont aussi activement présents au niveau plasmatique mais aussi dans le sérum de patients atteints de pathologies athéro-thrombotiques [351]. Les patients avec des lésions d'athérosclérose au niveau des carotides ont une augmentation de l'activité de la MMP-8 plasmatique [352]. La MMP-8 a été rapportée dans une étude récente comme étant capable de dégrader l'apoA-I [353]. Pour la cathepsine S, on rapporte que 1% de cette protéase en circulation est actif chez des patients sains [354]. En ce qui concerne l'activité de la chymase dans le plasma, aucune preuve directe n'a encore été rapportée [134]. La capacité de ces protéases à dégrader l'apoA-I et à altérer sa fonction d'induire l'efflux de cholestérol est

rapportée dans la plupart des cas lors des incubations *in vitro* de l'apoA-I ou des particules HDL avec les protéases citées ci-dessus [230, 231, 251-253, 353]. Il serait donc intéressant, si possible, de comparer le patron de migration sur SDS-PAGE des fragments de la sonde apoA-I-Cy5.5 récupérée d'aortes de souris athérosclérotiques excisés après infusion de la sonde *in vivo* et de le comparer avec ce qui pourrait être obtenu à partir d'une incubation de la sonde avec du plasma de souris normales et athérosclérotiques.

Pour renforcer nos résultats *in vivo*, nous avons effectué des analyses de données d'imagerie *ex vivo*. L'imagerie *ex vivo* a été réalisée sur les aortes extraites des mêmes souris ATX et sauvages qu'on avait préalablement infusées avec notre sonde apoA-I-Cy5.5 pour les expériences d'imagerie *in vivo*. Il est à noter que nos souris ATX et sauvages avaient été exsanguinées par une ponction cardiaque suivie d'une série de perfusion avec une solution physiologique (saline), pour éliminer toutes traces de sang résiduel au niveau des aortes. Cette approche nous permet de diminuer le risque que le signal détecté provienne de l'activation de notre sonde apoA-I-Cy5.5 par des protéases présentes dans le plasma. Par ailleurs, nos résultats obtenus par l'imagerie *ex vivo* allaient dans le même sens que nos observations obtenues en *in vivo*. Localisé dans le tissu des aortes, le signal fluorescent était donc plus important chez les souris ATX que chez les souris sauvages. D'autres exemples d'analyse par imagerie *ex vivo* rapportent la présence de protéases qui pourraient dégrader l'apoA-I dans des aortes de souris athérosclérotiques [321, 355] et de sténose valvulaire aortique [348, 356].

L'implication de la chymase dans la progression de l'athérosclérose et de la sténose valvulaire aortique est bien documentée [239, 357, 358]. Aussi, la capacité de cette dernière à dégrader *in vitro* l'apoA-I est connue [231, 246, 248]. Toutefois, on ne trouve aucune étude qui rapporte un lien direct entre la chymase et la dégradation *in vivo* de l'apoA-I. Cependant, Kovanen et ses collègues ont montré une colocalisation de l'apoA-I avec la chymase, après l'analyse de données immunohistologiques des tissus de la valve aortique chez des patients qui avaient une sténose valvulaire aortique [359]. Fait à noter également, Kovanen et ses collègues et des résultats non publiés du Laboratoire de Dr Tardif (Rhéaume E, Gendron S, Kernaleuguen A-E, Lavoie V, Tardif J-C) indiquent la présence de l'ARNm de l'apoA-I au sein de valves saines et que ce niveau d'expression locale de l'apoA-I est diminué dans des valves de patients avec sténose valvulaire aortique.

L'utilisation de notre sonde bioactivable peut nous permettre de disséquer la nature de la (les) protéase (s) la (les) plus délétère(s) pour l'intégrité et la fonctionnalité de l'apoA-I dans les différents tissus et les différentes conditions cliniques. Ceci peut être mis en évidence par l'utilisation des inhibiteurs de protéases spécifiques en combinaison avec notre sonde apoA-I-Cy5.5 ce qui va permettre une caractérisation plus efficace des contributions relatives des différentes familles ou type de protéases dans la dégradation de l'apoA-I.

En outre, il sera possible d'utiliser notre sonde pour l'évaluation des activités des protéases plasmatiques dégradant l'apoA-I en circulation à partir de plasma de patients athérosclérotiques et sains. Aussi il sera également possible d'étudier les activités protéolytiques dégradant l'apoA-I dans des homogénats de tissus provenant de patients athérosclérotiques et sains. Finalement, nous pouvons adapter notre sonde à différentes techniques utilisées pour la détection de l'activité des protéases dégradant l'apoA-I tels que la zymographie sur gel.

Une meilleure connaissance des activités protéolytiques dégradant l'apoA-I pourrait aussi déboucher sur de nouvelles approches thérapeutiques ou permettre de raffiner les approches de thérapies basées sur les HDL. Ces nouvelles connaissances pourraient être au centre du développement d'une stratégie qui combinerait une inhibition sélective et spécifique qui ciblerait la protéase délétère pour protéger l'intégrité de la protéine apoA-I, ce qui pourrait améliorer les thérapies à base de HDL. Une telle approche peut aussi être utilisée en combinaison avec des stratégies thérapeutiques à base de HDL reconstituées pour les protéger contre la dégradation protéolytique et permettre en parallèle d'augmenter le niveau de HDL endogène. L'inhibition de la CETP, par exemple, par des inhibiteurs comme le Dalcitrapib peut entraîner le remodelage des particules HDL qui favorise la production de pré-bêta HDL [203], les petites particules HDL minimalement lipidées qui jouent un rôle essentiel dans l'efflux de cholestérol, mais qui sont particulièrement sensibles à la dégradation par différentes protéases [230].

L'action anti-inflammatoire et la régression de la plaque d'athérosclérose rapportées dans des modèles de souris athérosclérotiques infusées avec des peptides mimétiques de l'apoA-I [360, 361], sont entre autres liées à leur composition riche en acides aminés aromatiques hydrophobes qui favorisent l'efflux du cholestérol à partir des cellules comme les macrophages spumeux [211]. La capacité des chymases à cliver des protéines au niveau des

résidus aromatiques peut laisser croire que le clivage des peptides mimétiques de l'apoA-I est également possible. Par exemple, le L4F a été modifié suite à la constatation de son instabilité causée par une sensibilité à l'action protéolytique de la trypsine [362]. Nous pensons alors que cette susceptibilité à certaines protéases peut diminuer l'efficacité d'un tel traitement utilisant un peptide mimétique de l'apoA-I dans certaines conditions cliniques chez l'humain. Dans d'autres circonstances, s'il est impossible de cibler et d'inhiber spécifiquement l'activité protéasique capable de dégrader l'apoA-I, nous pensons que notre sonde apoA-I-Cy5.5 pourra néanmoins aider à approfondir nos connaissances pour cibler des pathologies où la dégradation de l'apoA-I serait moins importante pour développer des stratégies thérapeutiques plus efficaces.

En conclusion, notre sonde fluorescente bioactivable apoA-I-Cy5.5 offre plusieurs avantages : (1) la sonde est à base d'une apoA-I native pleine longueur et présente un faible signal fluorescent dans son état non activé, dû en grande partie à la conformation structurale de l'apoA-I et à la capacité des fluorophores Cy5.5 d'auto-inhiber l'émission de leur propre fluorescence. (2) La fluorescence émise par le Cy5.5 dans les longueurs d'onde proche infrarouge favorise un faible ratio bruit de fond/signal fluorescent émis. (3) la sonde peut être activée par un clivage au niveau de multiples sites et par différentes protéases qui ciblent l'apoA-I. Notre sonde nous a aussi permis la détection et la quantification des activités des protéases (*in vitro*, *in vivo* et *ex vivo*) responsables de la dégradation de la protéine apoA-I, la composante critique pour la fonctionnalité des HDL. Notre étude peut avoir un impact sur l'amélioration de notre compréhension concernant les mécanismes moléculaires impliquant les protéases liées à la fonctionnalité des HDL dans l'athérosclérose ou d'autres maladies connexes, et peut aussi nous aider à améliorer la venue de nouvelles stratégies thérapeutiques à base de HDL.

Points limites de l'étude

La plupart des propriétés anti-athérogènes des HDL sont exercées dans la paroi artérielle. Par conséquent, les HDL et leur principale protéine constitutive, l'apoA-I doivent quitter le compartiment plasmatique et traverser l'endothélium [363, 364]. Le passage des particules HDL à travers l'endothélium de la paroi artérielle implique des mécanismes qui contrôlent l'internalisation et la transcytose des HDL et l'apoA-I [365]. Ces mécanismes

incluent la liaison de l'apoA-I et l'hydrolyse de l'ATP en ADP par une ATPase à la surface des cellules endothéliales. Ensuite l'ADP produit peut se lier au récepteur P2Y12, un récepteur couplé à une protéine G, à la surface des cellules endothéliales et stimule l'internalisation des particules de HDL naissantes et matures [366]. Le récepteur ABCA1 module également l'absorption et le transport de apoA-I à travers les cellules endothéliales aortiques [367]. Savion et Gamliel ont précédemment montré *in vitro*, qu'une proportion d'apoA-I associée spécifiquement avec des cellules endothéliales d'aorte bovine (CEAB) était résistante à la trypsine qu'on retrouve dans le sérum ajouté pour la culture des cellules [368]. Bien que l'étude d'Arnold von Eckardstein et ses collègues confirme les observations précédentes, il rapporte contradictoirement 3 % de dégradation de l'apoA-I qui serait observé dans les lysats des cellules endothéliales (CEAB) [369]. On pense que cette question devrait être posée dans notre étude. En effet, une dégradation de l'apoA-I durant la transcytose des HDL à travers la couche des cellules endothéliales de la paroi aortique pourrait effectivement causer l'activation non spécifique à une action liée aux protéases de notre sonde apoA-I-Cy5.5 infusée à nos souris ATX. Durant la transcytose, l'apoA-I transite à travers le compartiment endosomal à partir du pôle apical vers le pôle baso-latérale des cellules endothéliales [367]. Des protéases actives capables de dégrader l'apoA-I peuvent être présentes à ce niveau [370]. Des expériences *in vitro*, où on incuberait la sonde apoA-I-Cy5.5 avec des cellules endothéliales seraient envisageables afin de valider les observations précédentes.

Le remodelage des lipoprotéines à la surface des HDL décrit dans notre introduction peut aussi avoir un impact sur notre sonde apoA-I-Cy5.5. En effet, on pense que la lipodation et/ou la fusion de notre sonde injectée aux souris ATX, peut mener à un changement de conformation de la protéine apoA-I (conjugué) et du même fait pourrait causer une activation de la sonde, non spécifique à une activité protéasique. Il devrait être possible d'apporter une réponse à cette hypothèse en incubant la sonde apoA-I-Cy5.5 avec des phospholipides ou avec des particules de HDL isolées à partir de patients sains ou athérosclérotiques. On pourrait aussi incuber la sonde avec des cellules macrophages spumeuses en présence d'inhibiteur de protéases et investiguer l'impact sur le niveau de fluorescence basale lors de la lipodation de la sonde apoA-I-Cy5.5 durant le processus d'efflux de cholestérol relayé par ABCA1.

Contrairement à des sondes peptidiques synthétiques activables basées sur l'utilisation de séquences en acides aminés reconnues d'une manière spécifique par une protéase ciblée,

l'utilisation d'une protéine apoA-I native dans la synthèse de notre sonde et dont la séquence en acides aminés contient 21 lysines, 13 arginines, 7 phénylalanines et 7 tyrosines ainsi que 10 thréonines [171], rend cette dernière potentiellement dégradable et donc susceptible à l'activation par plusieurs classes de protéases. En effet, toutes les protéases impliquées dans l'athérogénèse n'ont pas été testées dans notre étude. Ainsi, la présence de plusieurs sites de clivages sur l'apoA-I rend très difficile l'attribution du clivage de l'apoA-I à une protéase spécifique en circulation ou au niveau de la plaque. De plus, après le clivage de l'apoA-I, la protéine peut s'éloigner de la protéase cible, ce qui rend possiblement très complexe l'isolement de la protéase impliquée dans la dégradation de l'apoA-I.

Cependant, vu l'importance de la région C-terminale de l'apoA-I dans l'induction de l'efflux de cholestérol dépendant d'ABCA-1 à partir des cellules macrophages spumeuses, le développement d'une sonde peptidique à partir de fragments d'apoA-I en position C-terminale pourrait restreindre le nombre de cibles de protéases à étudier. De plus, l'ajout d'une fonction cétone ou phosphonate à la sonde pourrait améliorer la liaison spécifique et irréversible au site actif d'une protéase tout en écartant les protéases qui cliveraient l'apoA-I au niveau de la région centrale ou en N-terminale.

Bibliographie

1. Singh, R.B., et al., *Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process*. Exp Clin Cardiol, 2002. **7**(1): p. 40-53.
2. Badimon, L. and G. Vilahur, *LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1254**: p. 18-32.
3. Hegele, R.A., *The genetic basis of atherosclerosis*. Int J Clin Lab Res, 1997. **27**(1): p. 2-13.
4. Lusis, A.W., A.; Drake, TA, *Textbook of Cardiovascular Medicine*. 1998: p. p. 2389-2413.
5. Kahle W., L.H.a.P.W., *Anatomie. Tome 2, 2^{éd.}*, . Paris: Flammarion Médecine-Sciences., 1990.
6. Lusis, A.J., *Atherosclerosis*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 233-41.
7. Palinski, W. and C. Napoli, *The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero programming and postnatal susceptibility to atherogenesis*. FASEB J, 2002. **16**(11): p. 1348-60.
8. Napoli, C., et al., *Maternal hypercholesterolemia during pregnancy promotes early atherogenesis in LDL receptor-deficient mice and alters aortic gene expression determined by microarray*. Circulation, 2002. **105**(11): p. 1360-7.
9. Smedby, O., et al., *Predilection of atherosclerosis for the inner curvature in the femoral artery. A digitized angiography study*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(7): p. 912-7.
10. Smedby, O., *Geometric risk factors for atherosclerosis in the aortic bifurcation: a digitized angiography study*. Ann Biomed Eng, 1996. **24**(4): p. 481-8.
11. Gimbrone, M.A., Jr., *Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis*. Thromb Haemost, 1999. **82**(2): p. 722-6.
12. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis*. Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 1-5.
13. Stary, H., *Atlas of Atherosclerosis: Progression and Regression. 2nd edition*. New York: Parthenon Publishing Group, 2003.
14. Libby, P., *Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis*. Am J Med, 2008. **121**(10 Suppl 1): p. S21-31.
15. Insull, W., Jr., *The pathology of atherosclerosis: plaque development and plaque responses to medical treatment*. Am J Med, 2009. **122**(1 Suppl): p. S3-S14.
16. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
17. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
18. Stary, H.C., et al., *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1994. **89**(5): p. 2462-78.
19. Castelli, W.P., et al., *HDL cholesterol and other lipids in coronary heart disease. The cooperative lipoprotein phenotyping study*. Circulation, 1977. **55**(5): p. 767-72.

20. Badimon, L., R.F. Storey, and G. Vilahur, *Update on lipids, inflammation and atherothrombosis*. Thromb Haemost, 2011. **105 Suppl 1**: p. S34-42.
21. Skalen, K., et al., *Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis*. Nature, 2002. **417**(6890): p. 750-4.
22. Boren, J., et al., *Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding*. J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2658-64.
23. Fukuchi, M., et al., *Normal and oxidized low density lipoproteins accumulate deep in physiologically thickened intima of human coronary arteries*. Lab Invest, 2002. **82**(10): p. 1437-47.
24. Callow, M.J., et al., *Atherogenesis in transgenic mice with human apolipoprotein B and lipoprotein (a)*. J Clin Invest, 1995. **96**(3): p. 1639-46.
25. Grainger, D.J., et al., *Activation of transforming growth factor-beta is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice*. Nature, 1994. **370**(6489): p. 460-2.
26. Ichikawa, T., et al., *Lipoprotein(a) promotes smooth muscle cell proliferation and dedifferentiation in atherosclerotic lesions of human apo(a) transgenic rabbits*. Am J Pathol, 2002. **160**(1): p. 227-36.
27. Delporte, C., et al., *Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase in inflammatory pathways and clinical studies*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 971579.
28. Boudjeltia, K.Z., et al., *Myeloperoxidase-dependent LDL modifications in bloodstream are mainly predicted by angiotensin II, adiponectin, and myeloperoxidase activity: a cross-sectional study in men*. Mediators Inflamm, 2013. **2013**: p. 750742.
29. Yoshida, H. and R. Kisugi, *Mechanisms of LDL oxidation*. Clin Chim Acta, 2010. **411**(23-24): p. 1875-82.
30. Plihtari, R., et al., *Proteolysis sensitizes LDL particles to phospholipolysis by secretory phospholipase A2 group V and secretory sphingomyelinase*. J Lipid Res, 2010. **51**(7): p. 1801-9.
31. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
32. Chi, H., et al., *Interleukin-1 receptor signaling mediates atherosclerosis associated with bacterial exposure and/or a high-fat diet in a murine apolipoprotein E heterozygote model: pharmacotherapeutic implications*. Circulation, 2004. **110**(12): p. 1678-85.
33. Watier, H. and Y. Lebranchu, *Role of the endothelium in leukocyte trafficking*. Rev Prat, 1997. **47**(20): p. 2245-50.
34. Lebranchu, Y., *Lipids and dysfunctional endothelium*. Nephrologie, 2000. **21**(7): p. 373-6.
35. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
36. Michiels, C., *Endothelial cell functions*. J Cell Physiol, 2003. **196**(3): p. 430-43.
37. John E. Deanfield, J.P.H.a.T.J.R., *Endothelial Function and Dysfunction: Testing and Clinical Relevance*. Circulation, 2007. **115**: p. 1285-1295.
38. Libby, P. and H. Li, *Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis*. J Clin Invest, 1993. **92**(2): p. 538-9.

39. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis*. Science, 1991. **251**(4995): p. 788-91.
40. Mestas, J. and K. Ley, *Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis*. Trends Cardiovasc Med, 2008. **18**(6): p. 228-32.
41. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions*. Nature, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
42. Harrington, J.R., *The role of MCP-1 in atherosclerosis*. Stem Cells, 2000. **18**(1): p. 65-6.
43. Johnson, J.L. and A.C. Newby, *Macrophage heterogeneity in atherosclerotic plaques*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(5): p. 370-8.
44. Waldo, S.W., et al., *Heterogeneity of human macrophages in culture and in atherosclerotic plaques*. Am J Pathol, 2008. **172**(4): p. 1112-26.
45. Febbraio, M., D.P. Hajjar, and R.L. Silverstein, *CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 785-91.
46. Tedgui, A. and Z. Mallat, *Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways*. Physiol Rev, 2006. **86**(2): p. 515-81.
47. Sprague, A.H. and R.A. Khalil, *Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease*. Biochem Pharmacol, 2009. **78**(6): p. 539-52.
48. Shimokado, K., et al., *A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least two forms of PDGF*. Cell, 1985. **43**(1): p. 277-86.
49. Korshunov, V.A., S.M. Schwartz, and B.C. Berk, *Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(8): p. 1722-8.
50. Newby, A.C., *Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture*. Physiol Rev, 2005. **85**(1): p. 1-31.
51. Kratky, R.G., J. Ivey, and M.R. Roach, *Local changes in collagen content in rabbit aortic atherosclerotic lesions with time*. Atherosclerosis, 1999. **143**(1): p. 7-14.
52. Dickhout, J.G., S. Basseri, and R.C. Austin, *Macrophage function and its impact on atherosclerotic lesion composition, progression, and stability: the good, the bad, and the ugly*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(8): p. 1413-5.
53. Stoneman, V.E. and M.R. Bennett, *Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(4): p. 343-54.
54. Hegyi, L., et al., *Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis*. J Pathol, 1996. **180**(4): p. 423-9.
55. Seimon, T. and I. Tabas, *Mechanisms and consequences of macrophage apoptosis in atherosclerosis*. J Lipid Res, 2009. **50** Suppl: p. S382-7.
56. Finn, A.V., et al., *Concept of vulnerable/unstable plaque*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(7): p. 1282-92.
57. Libby, P. and M. Aikawa, *Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1257-62.
58. Kuhn, H., et al., *Arachidonic Acid metabolites in the cardiovascular system: the role of lipoxygenase isoforms in atherogenesis with particular emphasis on vascular remodeling*. J Cardiovasc Pharmacol, 2007. **50**(6): p. 609-20.

59. Heo, S.H., et al., *Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9*. J Clin Neurol, 2011. **7**(2): p. 69-76.
60. Galis, Z.S., et al., *Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques*. J Clin Invest, 1994. **94**(6): p. 2493-503.
61. Libby, P., *Multiple mechanisms of thrombosis complicating atherosclerotic plaques*. Clin Cardiol, 2000. **23 Suppl 6**: p. VI-3-7.
62. Libby, P., *Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S352-7.
63. Artigou, J.-Y., Monsuez, J.-J., and Cardiologie, S.f.d., *Cardiologie et maladie vasculaires* Paris, Masson, 2007.
64. Orbay, H., et al., *Positron emission tomography imaging of atherosclerosis*. Theranostics, 2013. **3**(11): p. 894-902.
65. Moghadasian, M.H., *Experimental atherosclerosis: a historical overview*. Life Sci, 2002. **70**(8): p. 855-65.
66. Narayanaswamy, M., K.C. Wright, and K. Kandarpa, *Animal models for atherosclerosis, restenosis, and endovascular graft research*. J Vasc Interv Radiol, 2000. **11**(1): p. 5-17.
67. Masashi Shiomi, T.K.a.T.I., *Genetically Modified Animal Models for Lipoprotein Research*. Biochemistry, Genetics and Molecular Biology » "Lipoproteins - Role in Health and Diseases", book edited by Sasa Frank and Gerhard Kostner, ISBN, 1997.
68. Taylor, J.M., *Transgenic rabbit models for the study of atherosclerosis*. Ann N Y Acad Sci, 1997. **811**: p. 146-52; discussion 152-4.
69. Jawien, J., *The role of an experimental model of atherosclerosis: apoE-knockout mice in developing new drugs against atherogenesis*. Curr Pharm Biotechnol, 2012. **13**(13): p. 2435-9.
70. Daugherty, A., *Mouse models of atherosclerosis*. Am J Med Sci, 2002. **323**(1): p. 3-10.
71. Veniant, M.M., S. Withycombe, and S.G. Young, *Lipoprotein size and atherosclerosis susceptibility in Apoe(-/-) and Ldlr(-/-) mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(10): p. 1567-70.
72. Veniant, M.M., et al., *Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice*. J Clin Invest, 1998. **102**(8): p. 1559-68.
73. Sanan, D.A., et al., *Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4544-9.
74. Maganto-Garcia, E., M. Tarrío, and A.H. Lichtman, *Mouse models of atherosclerosis*. Curr Protoc Immunol, 2012. **Chapter 15**: p. Unit 15 24 1-23.
75. Ishibashi, S., et al., *Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice*. J Clin Invest, 1994. **93**(5): p. 1885-93.
76. Plump, A.S., et al., *Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells*. Cell, 1992. **71**(2): p. 343-53.
77. van Vlijmen, B.J., et al., *Diet-induced hyperlipoproteinemia and atherosclerosis in apolipoprotein E3-Leiden transgenic mice*. J Clin Invest, 1994. **93**(4): p. 1403-10.

78. Powell-Braxton, L., et al., *A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet*. *Nat Med*, 1998. **4**(8): p. 934-8.
79. Plump, A.S., et al., *ApoA-I knockout mice: characterization of HDL metabolism in homozygotes and identification of a post-RNA mechanism of apoA-I up-regulation in heterozygotes*. *J Lipid Res*, 1997. **38**(5): p. 1033-47.
80. Dollery, C.M. and P. Libby, *Atherosclerosis and proteinase activation*. *Cardiovasc Res*, 2006. **69**(3): p. 625-35.
81. Puente, X.S., et al., *Human and mouse proteases: a comparative genomic approach*. *Nat Rev Genet*, 2003. **4**(7): p. 544-58.
82. Puente, X.S., et al., *A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems*. *Biochem Soc Trans*, 2005. **33**(Pt 2): p. 331-4.
83. Rao, M.B., et al., *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998. **62**(3): p. 597-635.
84. Egeblad, M. and Z. Werb, *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(3): p. 161-74.
85. Massova, I., et al., *Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification*. *FASEB J*, 1998. **12**(12): p. 1075-95.
86. Werb, Z., *ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology*. *Cell*, 1997. **91**(4): p. 439-42.
87. Maskos, K., *Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors*. *Biochimie*, 2005. **87**(3-4): p. 249-63.
88. Holmes, M.A. and B.W. Matthews, *Binding of hydroxamic acid inhibitors to crystalline thermolysin suggests a pentacoordinate zinc intermediate in catalysis*. *Biochemistry*, 1981. **20**(24): p. 6912-20.
89. Singh, R.B., et al., *Role of proteases in the pathophysiology of cardiac disease*. *Mol Cell Biochem*, 2004. **263**(1-2): p. 241-56.
90. Visse, R. and H. Nagase, *Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry*. *Circ Res*, 2003. **92**(8): p. 827-39.
91. Sternlicht, M.D. and Z. Werb, *How matrix metalloproteinases regulate cell behavior*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001. **17**: p. 463-516.
92. Klein, T. and R. Bischoff, *Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases*. *Amino Acids*, 2011. **41**(2): p. 271-90.
93. Faber, H.R., et al., *1.8 A crystal structure of the C-terminal domain of rabbit serum haemopexin*. *Structure*, 1995. **3**(6): p. 551-9.
94. Bode, W., *A helping hand for collagenases: the haemopexin-like domain*. *Structure*, 1995. **3**(6): p. 527-30.
95. Murphy, G. and H. Nagase, *Progress in matrix metalloproteinase research*. *Mol Aspects Med*, 2008. **29**(5): p. 290-308.
96. Itoh, Y., et al., *Membrane type 4 matrix metalloproteinase (MT4-MMP, MMP-17) is a glycosylphosphatidylinositol-anchored proteinase*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(48): p. 34260-6.
97. Vartak, D.G. and R.A. Gemeinhart, *Matrix metalloproteinases: underutilized targets for drug delivery*. *J Drug Target*, 2007. **15**(1): p. 1-20.

98. Marchenko, G.N. and A.Y. Strongin, *MMP-28, a new human matrix metalloproteinase with an unusual cysteine-switch sequence is widely expressed in tumors*. Gene, 2001. **265**(1-2): p. 87-93.
99. Lang, R., et al., *Substrate specificity determinants of human macrophage elastase (MMP-12) based on the 1.1 Å crystal structure*. J Mol Biol, 2001. **312**(4): p. 731-42.
100. Johnson, J.L., et al., *A selective matrix metalloproteinase-12 inhibitor retards atherosclerotic plaque development in apolipoprotein E-knockout mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 528-35.
101. Sekhon, B.S., *Matrix metalloproteinases – an overview*. Research and Reports in Biology, 2010. **1**: p. 1-20.
102. Liu, Z., et al., *The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo*. Cell, 2000. **102**(5): p. 647-55.
103. Vu, T.H. and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology*. Genes Dev, 2000. **14**(17): p. 2123-33.
104. van Hinsbergh, V.W. and P. Koolwijk, *Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(2): p. 203-12.
105. Newby, A.C., *Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques*. Trends Cardiovasc Med, 2007. **17**(8): p. 253-8.
106. Chistiakov, D.A., I.A. Sobenin, and A.N. Orekhov, *Vascular extracellular matrix in atherosclerosis*. Cardiol Rev, 2013. **21**(6): p. 270-88.
107. Fan, W.H. and M.J. Karnovsky, *Increased MMP-2 expression in connective tissue growth factor over-expression vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(12): p. 9800-5.
108. Koshikawa, N., et al., *Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5*. J Cell Biol, 2000. **148**(3): p. 615-24.
109. Austin, K.M., L. Covic, and A. Kuliopulos, *Matrix metalloproteases and PAR1 activation*. Blood, 2013. **121**(3): p. 431-9.
110. Garcia-Touchard, A., et al., *Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1119-27.
111. Johnson, J.L., et al., *Divergent effects of matrix metalloproteinases 3, 7, 9, and 12 on atherosclerotic plaque stability in mouse brachiocephalic arteries*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(43): p. 15575-80.
112. Polgar, L., *The catalytic triad of serine peptidases*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(19-20): p. 2161-72.
113. Ekici, O.D., M. Paetzel, and R.E. Dalbey, *Unconventional serine proteases: variations on the catalytic Ser/His/Asp triad configuration*. Protein Sci, 2008. **17**(12): p. 2023-37.
114. Di Cera, E., *Serine proteases*. IUBMB Life, 2009. **61**(5): p. 510-5.
115. Hedstrom, L., *Serine protease mechanism and specificity*. Chem Rev, 2002. **102**(12): p. 4501-24.
116. Rawlings, N.D., et al., *MEROPS: the peptidase database*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D320-5.
117. Zamolodchikova, T.S., *Serine proteases of small intestine mucosa--localization, functional properties, and physiological role*. Biochemistry (Mosc), 2012. **77**(8): p. 820-9.
118. Borgono, C.A., I.P. Michael, and E.P. Diamandis, *Human tissue kallikreins: physiologic roles and applications in cancer*. Mol Cancer Res, 2004. **2**(5): p. 257-80.

119. Heutinck, K.M., et al., *Serine proteases of the human immune system in health and disease*. Mol Immunol, 2010. **47**(11-12): p. 1943-55.
120. Urata, H., et al., *Identification of a highly specific chymase as the major angiotensin II-forming enzyme in the human heart*. J Biol Chem, 1990. **265**(36): p. 22348-57.
121. Dell'Italia, L.J. and A. Husain, *Dissecting the role of chymase in angiotensin II formation and heart and blood vessel diseases*. Curr Opin Cardiol, 2002. **17**(4): p. 374-9.
122. Schneider, L.A., et al., *Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin*. J Exp Med, 2007. **204**(11): p. 2629-39.
123. Waern, I., et al., *Mouse mast cell protease 4 is the major chymase in murine airways and has a protective role in allergic airway inflammation*. J Immunol, 2009. **183**(10): p. 6369-76.
124. Mellon, M.B., B.T. Frank, and K.C. Fang, *Mast cell alpha-chymase reduces IgE recognition of birch pollen profilin by cleaving antibody-binding epitopes*. J Immunol, 2002. **168**(1): p. 290-7.
125. Zhao, W., et al., *Cytokine production by skin-derived mast cells: endogenous proteases are responsible for degradation of cytokines*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2635-42.
126. Berahovich, R.D., et al., *Proteolytic activation of alternative CCRI ligands in inflammation*. J Immunol, 2005. **174**(11): p. 7341-51.
127. Wernersson, S. and G. Pejler, *Mast cell secretory granules: armed for battle*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(7): p. 478-94.
128. Lupu, F., et al., *Plasminogen activator expression in human atherosclerotic lesions*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(9): p. 1444-55.
129. Tchougounova, E., et al., *A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 9291-6.
130. Itoh, Y. and H. Nagase, *Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase*. J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 16518-21.
131. Paananen, K. and P.T. Kovanen, *Proteolysis and fusion of low density lipoprotein particles independently strengthen their binding to exocytosed mast cell granules*. J Biol Chem, 1994. **269**(3): p. 2023-31.
132. Taipale, J., et al., *Human mast cell chymase and leukocyte elastase release latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of cultured human epithelial and endothelial cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(9): p. 4689-96.
133. Takai, S., et al., *Therapeutic applications of chymase inhibitors in cardiovascular diseases and fibrosis*. Eur J Pharmacol, 2004. **501**(1-3): p. 1-8.
134. Doggrell, S.A. and J.C. Wanstall, *Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(4): p. 653-62.
135. Bot, I., et al., *Mast cell chymase inhibition reduces atherosclerotic plaque progression and improves plaque stability in ApoE^{-/-} mice*. Cardiovasc Res, 2011. **89**(1): p. 244-52.
136. Otto, H.H. and T. Schirmeister, *Cysteine Proteases and Their Inhibitors*. Chem Rev, 1997. **97**(1): p. 133-172.

137. Chapman, H.A., R.J. Riese, and G.P. Shi, *Emerging roles for cysteine proteases in human biology*. *Annu Rev Physiol*, 1997. **59**: p. 63-88.
138. Lutgens, S.P., et al., *Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease*. *FASEB J*, 2007. **21**(12): p. 3029-41.
139. Rossi, A., et al., *Comprehensive search for cysteine cathepsins in the human genome*. *Biol Chem*, 2004. **385**(5): p. 363-72.
140. Hagemann, S., et al., *The human cysteine protease cathepsin V can compensate for murine cathepsin L in mouse epidermis and hair follicles*. *Eur J Cell Biol*, 2004. **83**(11-12): p. 775-80.
141. Mason, R.W., *Emerging functions of placental cathepsins*. *Placenta*, 2008. **29**(5): p. 385-90.
142. Brömme, D.W., S., *Biology of Extracellular Matrix, Extracellular Matrix Degradation, Chapter 2 : Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis*. W.C. Parks and R.P. Mecham (eds.), 2011. **2**(Springer Edition): p. 256.
143. Turk, V., et al., *Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1824**(1): p. 68-88.
144. Turk, V.T.a.B., *Lysosomal Cysteine Proteases And Their Protein Inhibitors: Recent Developments*. *Acta Chim. Slov.*, 2008. **55**: p. 727-738.
145. Stoka, V., B. Turk, and V. Turk, *Lysosomal cysteine proteases: structural features and their role in apoptosis*. *IUBMB Life*, 2005. **57**(4-5): p. 347-53.
146. Drake, F.H., et al., *Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(21): p. 12511-6.
147. Bossard, M.J., et al., *Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(21): p. 12517-24.
148. Linnevers, C., S.P. Smeeckens, and D. Bromme, *Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8+ T-lymphocytes*. *FEBS Lett*, 1997. **405**(3): p. 253-9.
149. Wolters, P.J., et al., *Dipeptidyl peptidase I is essential for activation of mast cell chymases, but not tryptases, in mice*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(21): p. 18551-6.
150. Pham, C.T. and T.J. Ley, *Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(15): p. 8627-32.
151. Hsing, L.C. and A.Y. Rudensky, *The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation*. *Immunol Rev*, 2005. **207**: p. 229-41.
152. Maubach, G., M.C. Lim, and L. Zhuo, *Nuclear cathepsin F regulates activation markers in rat hepatic stellate cells*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(10): p. 4238-48.
153. Duarte, L.F., et al., *Histone H3.3 and its proteolytically processed form drive a cellular senescence programme*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5210.
154. Jormsjo, S., et al., *Differential expression of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Am J Pathol*, 2002. **161**(3): p. 939-45.
155. Sukhova, G.K., et al., *Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(3): p. 576-83.

156. Liu, J., et al., *Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(8): p. 1359-66.
157. Sukhova, G.K., et al., *Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice*. *J Clin Invest*, 2003. **111**(6): p. 897-906.
158. Lutgens, E., et al., *Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation*. *Circulation*, 2006. **113**(1): p. 98-107.
159. Bengtsson, E., et al., *Lack of the cysteine protease inhibitor cystatin C promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2151-6.
160. Li, W., et al., *Uptake of oxidized LDL by macrophages results in partial lysosomal enzyme inactivation and relocation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(2): p. 177-84.
161. Li, W. and X.M. Yuan, *Increased expression and translocation of lysosomal cathepsins contribute to macrophage apoptosis in atherogenesis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2004. **1030**: p. 427-33.
162. Oorni, K., et al., *Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(33): p. 34776-84.
163. Levy, E., et al., *Intestinal cholesterol transport proteins: an update and beyond*. *Curr Opin Lipidol*, 2007. **18**(3): p. 310-8.
164. Smith, L.C., H.J. Pownall, and A.M. Gotto, Jr., *The plasma lipoproteins: structure and metabolism*. *Annu Rev Biochem*, 1978. **47**: p. 751-7.
165. Fielding, C.J. and P.E. Fielding, *Molecular physiology of reverse cholesterol transport*. *J Lipid Res*, 1995. **36**(2): p. 211-28.
166. Karlsson, H., et al., *Lipoproteomics II: mapping of proteins in high-density lipoprotein using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry*. *Proteomics*, 2005. **5**(5): p. 1431-45.
167. Vaisar, T., et al., *Shotgun proteomics implicates protease inhibition and complement activation in the antiinflammatory properties of HDL*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(3): p. 746-56.
168. Kunitake, S.T., K.J. La Sala, and J.P. Kane, *Apolipoprotein A-I-containing lipoproteins with pre-beta electrophoretic mobility*. *J Lipid Res*, 1985. **26**(5): p. 549-55.
169. Asztalos, B.F., *High Density Lipoproteins, Dyslipidemia, and Coronary Heart Disease*. E.J. Schaefer (ed.). Springer Science, 2010: p. 25-32.
170. Brouillette, C.G. and G.M. Anantharamaiah, *Structural models of human apolipoprotein A-I*. *Biochim Biophys Acta*, 1995. **1256**(2): p. 103-29.
171. Bashtovyy, D., et al., *Sequence conservation of apolipoprotein A-I affords novel insights into HDL structure-function*. *J Lipid Res*, 2011. **52**(3): p. 435-50.
172. Pollard, R.D., et al., *The conformation of lipid-free human apolipoprotein A-I in solution*. *Biochemistry*, 2013. **52**(52): p. 9470-81.
173. Thomas, M.J., S. Bhat, and M.G. Sorci-Thomas, *Three-dimensional models of HDL apoA-I: implications for its assembly and function*. *J Lipid Res*, 2008. **49**(9): p. 1875-83.

174. Tricerri, M.A., et al., *Arrangement of apolipoprotein A-I in reconstituted high-density lipoprotein disks: an alternative model based on fluorescence resonance energy transfer experiments*. *Biochemistry*, 2001. **40**(16): p. 5065-74.
175. Wu, Z., et al., *The refined structure of nascent HDL reveals a key functional domain for particle maturation and dysfunction*. *Nat Struct Mol Biol*, 2007. **14**(9): p. 861-8.
176. Wu, Z., et al., *Double superhelix model of high density lipoprotein*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(52): p. 36605-19.
177. Zheng, L., et al., *Localization of nitration and chlorination sites on apolipoprotein A-I catalyzed by myeloperoxidase in human atheroma and associated oxidative impairment in ABCA1-dependent cholesterol efflux from macrophages*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(1): p. 38-47.
178. Gautier, T., Masson, D., Lagrost, L., *Métabolisme des lipoprotéines de haute densité (HDL)*. *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 2011. **3**(4): p. 267-272.
179. Zannis, V.I., et al., *HDL biogenesis, remodeling, and catabolism*. *Handb Exp Pharmacol*, 2015. **224**: p. 53-111.
180. Rader, D.J., *Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(12): p. 3090-100.
181. Favari, E., et al., *Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport*. *Handb Exp Pharmacol*, 2015. **224**: p. 181-206.
182. Kontush, A., *HDL-mediated mechanisms of protection in cardiovascular disease*. *Cardiovasc Res*, 2014. **103**(3): p. 341-9.
183. Jacquet, S., et al., *The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(21): p. 2508-15.
184. Fabre, A.C., et al., *P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport*. *Hepatology*, 2010. **52**(4): p. 1477-83.
185. Kingwell, B.A., et al., *HDL-targeted therapies: progress, failures and future*. *Nat Rev Drug Discov*, 2014. **13**(6): p. 445-64.
186. Navab, M., et al., *HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms*. *Nat Rev Cardiol*, 2011. **8**(4): p. 222-32.
187. Remaley, A.T., G.D. Norata, and A.L. Catapano, *Novel concepts in HDL pharmacology*. *Cardiovasc Res*, 2014. **103**(3): p. 423-8.
188. Tabet, F. and K.A. Rye, *High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress*. *Clin Sci (Lond)*, 2009. **116**(2): p. 87-98.
189. Bonomini, F., et al., *Atherosclerosis and oxidative stress*. *Histol Histopathol*, 2008. **23**(3): p. 381-90.
190. Kontush, A. and M.J. Chapman, *Functionally defective high-density lipoprotein: a new therapeutic target at the crossroads of dyslipidemia, inflammation, and atherosclerosis*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(3): p. 342-74.
191. Karlsson, H., A. Kontush, and R.W. James, *Functionality of HDL: antioxidation and detoxifying effects*. *Handb Exp Pharmacol*, 2015. **224**: p. 207-28.
192. Garner, B., et al., *Oxidation of high density lipoproteins. I. Formation of methionine sulfoxide in apolipoproteins AI and AII is an early event that accompanies lipid peroxidation and can be enhanced by alpha-tocopherol*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(11): p. 6080-7.

193. Garner, B., et al., *Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII.* J Biol Chem, 1998. **273**(11): p. 6088-95.
194. Liao, X.L., et al., *Neutrophils activation can be diminished by apolipoprotein A-I.* Life Sci, 2005. **77**(3): p. 325-35.
195. Gaidukov, L., et al., *ApoE induces serum paraoxonase PON1 activity and stability similar to ApoA-I.* Biochemistry, 2010. **49**(3): p. 532-8.
196. Navab, M., et al., *Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1.* J Lipid Res, 2000. **41**(9): p. 1481-94.
197. Barter, P.J., et al., *Antiinflammatory properties of HDL.* Circ Res, 2004. **95**(8): p. 764-72.
198. Chong, P.H., R. Kezele, and C. Franklin, *High-density lipoprotein cholesterol and the role of statins.* Circ J, 2002. **66**(11): p. 1037-44.
199. Baigent, C., et al., *Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins.* Lancet, 2005. **366**(9493): p. 1267-78.
200. Group, H.T.C., et al., *Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients.* N Engl J Med, 2014. **371**(3): p. 203-12.
201. Lavigne, P.M. and R.H. Karas, *The current state of niacin in cardiovascular disease prevention: a systematic review and meta-regression.* J Am Coll Cardiol, 2013. **61**(4): p. 440-6.
202. Merck., *Merck Announces HPS2-THRIVE Study of TREDAPTIVE™ (Extended-Release Niacin / Laropiprant) Did Not Achieve Primary Endpoint [Internet].* Press release 2012.
203. Niesor, E.J., et al., *Modulating cholesteryl ester transfer protein activity maintains efficient pre-beta-HDL formation and increases reverse cholesterol transport.* J Lipid Res, 2010. **51**(12): p. 3443-54.
204. van Capelleveen, J.C., et al., *Novel therapies focused on the high-density lipoprotein particle.* Circ Res, 2014. **114**(1): p. 193-204.
205. Bailey, D., et al., *RVX-208: a small molecule that increases apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein cholesterol in vitro and in vivo.* J Am Coll Cardiol, 2010. **55**(23): p. 2580-9.
206. Nicholls, S.J., et al., *ApoA-I induction as a potential cardioprotective strategy: rationale for the SUSTAIN and ASSURE studies.* Cardiovasc Drugs Ther, 2012. **26**(2): p. 181-7.
207. Resverlogix., *Resverlogix reports top-line results from ASSURE clinical trial.* . Press release 2013. <http://www.resverlogix.com/media/>.
208. Calabresi, L., et al., *Cell cholesterol efflux to reconstituted high-density lipoproteins containing the apolipoprotein A-IMilano dimer.* Biochemistry, 1999. **38**(49): p. 16307-14.
209. Tardif, J.C., et al., *Effects of reconstituted high-density lipoprotein infusions on coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial.* JAMA, 2007. **297**(15): p. 1675-82.
210. Navab, M., et al., *Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol*

- transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice.* Circulation, 2004. **109**(25): p. 3215-20.
211. Osei-Hwedieh, D.O., et al., *Apolipoprotein mimetic peptides: Mechanisms of action as anti-atherogenic agents.* Pharmacol Ther, 2011. **130**(1): p. 83-91.
 212. Bloedon, L.T., et al., *Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients.* J Lipid Res, 2008. **49**(6): p. 1344-52.
 213. Feig, J.E., et al., *High-density lipoprotein and atherosclerosis regression: evidence from preclinical and clinical studies.* Circ Res, 2014. **114**(1): p. 205-13.
 214. Bruckert, E. and B. Hansel, *HDL-c is a powerful lipid predictor of cardiovascular diseases.* Int J Clin Pract, 2007. **61**(11): p. 1905-13.
 215. Eren, E., N. Yilmaz, and O. Aydin, *High Density Lipoprotein and it's Dysfunction.* Open Biochem J, 2012. **6**: p. 78-93.
 216. Smith, J.D., *Dysfunctional HDL as a diagnostic and therapeutic target.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(2): p. 151-5.
 217. Navab, M., et al., *Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein.* J Clin Invest, 1991. **88**(6): p. 2039-46.
 218. Van Lenten, B.J., et al., *Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures.* J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2758-67.
 219. Smith, J.D., *Myeloperoxidase, inflammation, and dysfunctional high-density lipoprotein.* J Clin Lipidol, 2010. **4**(5): p. 382-8.
 220. Sorrentino, S.A., et al., *Endothelial-vasoprotective effects of high-density lipoprotein are impaired in patients with type 2 diabetes mellitus but are improved after extended-release niacin therapy.* Circulation, 2010. **121**(1): p. 110-22.
 221. Hedrick, C.C., et al., *Glycation impairs high-density lipoprotein function.* Diabetologia, 2000. **43**(3): p. 312-20.
 222. Lee-Rueckert, M. and P.T. Kovanen, *Extracellular modifications of HDL in vivo and the emerging concept of proteolytic inactivation of prebeta-HDL.* Curr Opin Lipidol, 2011. **22**(5): p. 394-402.
 223. Huang, Y., et al., *An abundant dysfunctional apolipoprotein A1 in human atheroma.* Nat Med, 2014. **20**(2): p. 193-203.
 224. Zheng, L., et al., *Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease.* J Clin Invest, 2004. **114**(4): p. 529-41.
 225. DiDonato, J.A., et al., *Site-specific nitration of apolipoprotein A-I at tyrosine 166 is both abundant within human atherosclerotic plaque and dysfunctional.* J Biol Chem, 2014. **289**(15): p. 10276-92.
 226. Pirillo, A., P. Uboldi, and A.L. Catapano, *Dual effect of hypochlorite in the modification of high density lipoproteins.* Biochem Biophys Res Commun, 2010. **403**(3-4): p. 447-51.
 227. Castro, G.R. and C.J. Fielding, *Early incorporation of cell-derived cholesterol into pre-beta-migrating high-density lipoprotein.* Biochemistry, 1988. **27**(1): p. 25-9.

228. Lee-Rueckert, M., A. von Eckardstein, and P.T. Kovanen, *The neutral protease chymase degrades apolipoprotein E from high-density lipoproteins*. Clin Chem Lab Med, 2008. **46**(3): p. 421-3.
229. Lee, M., et al., *Depletion of pre beta 1LpA1 and LpA4 particles by mast cell chymase reduces cholesterol efflux from macrophage foam cells induced by plasma*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(4): p. 1066-74.
230. Kunitake, S.T., et al., *Pre-beta high density lipoprotein. Unique disposition of apolipoprotein A-I increases susceptibility to proteolysis*. Arteriosclerosis, 1990. **10**(1): p. 25-30.
231. Lee, M., et al., *Apolipoprotein composition and particle size affect HDL degradation by chymase: effect on cellular cholesterol efflux*. J Lipid Res, 2003. **44**(3): p. 539-46.
232. Lee-Rueckert, M., et al., *Acidic extracellular environments strongly impair ABCA1-mediated cholesterol efflux from human macrophage foam cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(9): p. 1766-72.
233. Mohler, E.R., et al., *Development and progression of aortic valve stenosis: atherosclerosis risk factors--a causal relationship? A clinical morphologic study*. Clin Cardiol, 1991. **14**(12): p. 995-9.
234. Gil-Dones, F., et al., *Inside human aortic stenosis: a proteomic analysis of plasma*. J Proteomics, 2012. **75**(5): p. 1639-53.
235. Lindstedt, L., M. Lee, and P.T. Kovanen, *Chymase bound to heparin is resistant to its natural inhibitors and capable of proteolyzing high density lipoproteins in aortic intimal fluid*. Atherosclerosis, 2001. **155**(1): p. 87-97.
236. Lee, M., et al., *Mast cell tryptase degrades HDL and blocks its function as an acceptor of cellular cholesterol*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(12): p. 2086-91.
237. Ortiz-Munoz, G., et al., *HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property*. FASEB J, 2009. **23**(9): p. 3129-39.
238. Stary, H.C., *The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life*. Eur Heart J, 1990. **11 Suppl E**: p. 3-19.
239. Kaartinen, M., A. Penttila, and P.T. Kovanen, *Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture*. Circulation, 1994. **90**(4): p. 1669-78.
240. Lee-Rueckert, M., et al., *Mast cell activation in vivo impairs the macrophage reverse cholesterol transport pathway in the mouse*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(3): p. 520-7.
241. Kelley, J.L., et al., *The molecular role of mast cells in atherosclerotic cardiovascular disease*. Mol Med Today, 2000. **6**(8): p. 304-8.
242. Takai, S., et al., *Characterization of chymase from human vascular tissues*. Clin Chim Acta, 1997. **265**(1): p. 13-20.
243. Pejler, G., et al., *Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease*. Blood, 2010. **115**(24): p. 4981-90.
244. Thorpe, M., et al., *Extended cleavage specificity of the mast cell chymase from the crab-eating macaque (Macaca fascicularis): an interesting animal model for the analysis of the function of the human mast cell chymase*. Int Immunol, 2012. **24**(12): p. 771-82.
245. Sun, J., et al., *Critical role of mast cell chymase in mouse abdominal aortic aneurysm formation*. Circulation, 2009. **120**(11): p. 973-82.

246. Lee, M., et al., *Identification of domains in apoA-I susceptible to proteolysis by mast cell chymase. Implications for HDL function.* J Lipid Res, 2000. **41**(6): p. 975-84.
247. Usami, Y., et al., *Detection of chymase-digested C-terminally truncated apolipoprotein A-I in normal human serum.* J Immunol Methods, 2011. **369**(1-2): p. 51-8.
248. Usami, Y., et al., *Identification of sites in apolipoprotein A-I susceptible to chymase and carboxypeptidase A digestion.* Biosci Rep, 2013. **33**(1): p. 49-56.
249. Pejler, G., et al., *Novel insights into the biological function of mast cell carboxypeptidase A.* Trends Immunol, 2009. **30**(8): p. 401-8.
250. Choe, Y., et al., *Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities.* J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12824-32.
251. Lindstedt, L., et al., *Cathepsins F and S block HDL3-induced cholesterol efflux from macrophage foam cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(4): p. 1019-24.
252. Lindstedt, L., et al., *Matrix Metalloproteinases-3, -7, and -12, but Not -9, Reduce High Density Lipoprotein-induced Cholesterol Efflux from Human Macrophage Foam Cells by Truncation of the Carboxyl Terminus of Apolipoprotein A-I: PARALLEL LOSSES OF PRE- PARTICLES AND THE HIGH AFFINITY COMPONENT OF EFFLUX.* Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(32): p. 22627-22634.
253. Lindstedt, L. and P.T. Kovanen, *Plasmin and kallikrein reduce HDL-induced cholesterol efflux from foam cells.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **277**(3): p. 552-7.
254. Mendez, A.J. and J.F. Oram, *Limited proteolysis of high density lipoprotein abolishes its interaction with cell-surface binding sites that promote cholesterol efflux.* Biochim Biophys Acta, 1997. **1346**(3): p. 285-99.
255. Ji, Y. and A. Jonas, *Properties of an N-terminal proteolytic fragment of apolipoprotein AI in solution and in reconstituted high density lipoproteins.* J Biol Chem, 1995. **270**(19): p. 11290-7.
256. Turk, B., *Targeting proteases: successes, failures and future prospects.* Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 785-99.
257. Knuckley, B., et al., *A fluopol-ABPP HTS assay to identify PAD inhibitors.* Chem Commun (Camb), 2010. **46**(38): p. 7175-7.
258. Sanman, L.E. and M. Bogoy, *Activity-based profiling of proteases.* Annu Rev Biochem, 2014. **83**: p. 249-73.
259. Edgington, L.E., M. Verdoes, and M. Bogoy, *Functional imaging of proteases: recent advances in the design and application of substrate-based and activity-based probes.* Curr Opin Chem Biol, 2011. **15**(6): p. 798-805.
260. Verhelst, S.H. and M. Bogoy, *Chemical proteomics applied to target identification and drug discovery.* Biotechniques, 2005. **38**(2): p. 175-7.
261. Jones, L.J., et al., *Quenched BODIPY dye-labeled casein substrates for the assay of protease activity by direct fluorescence measurement.* Anal Biochem, 1997. **251**(2): p. 144-52.
262. Kore, A.R., et al., *Synthesis and application of MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Phe-CH₂Cl as potent proteinase K inhibitor.* Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19**(5): p. 1296-300.
263. Bernard, V., *Invitation à la Fluorescence Moléculaire.* First Édition, 2004. Ed.:(Édition De Boeck Université): p. 197.

264. Lakowicz, J.R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Third Edition, 2007. **Ed.: Springer** p. 923.
265. Lavis, L.D. and R.T. Raines, *Bright ideas for chemical biology*. ACS Chem Biol, 2008. **3**(3): p. 142-55.
266. Pauli, J., et al., *Novel fluorophores as building blocks for optical probes for in vivo near infrared fluorescence (NIRF) imaging*. J Fluoresc, 2010. **20**(3): p. 681-93.
267. Peng, X., et al., *A nonfluorescent, broad-range quencher dye for Forster resonance energy transfer assays*. Anal Biochem, 2009. **388**(2): p. 220-8.
268. Ishikawa-Ankerhold, H.C., R. Ankerhold, and G.P. Drummen, *Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM*. Molecules, 2012. **17**(4): p. 4047-132.
269. Olenych, S.G., et al., *The fluorescent protein color palette*. Curr Protoc Cell Biol, 2007. **Chapter 21**: p. Unit 21 5.
270. Held, P., *An Introduction to Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) Technology and its Application in Bioscience*. White Paper (Biotek), 2005: p. 1-6.
271. Van de Weert, M. and L. Stella, *Fluorescence quenching and ligand binding: A critical discussion of a popular methodology*. Journal of Molecular Structure, 2011. **998**(1-3): p. 144-150.
272. Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. Pierce Biotechnology, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, 2013. **3rd Edition. Elsevier**: p. 1146.
273. Cordes, T. and S.A. Blum, *Opportunities and challenges in single-molecule and single-particle fluorescence microscopy for mechanistic studies of chemical reactions*. Nat Chem, 2013. **5**(12): p. 993-9.
274. Amiot, C., et al., *Near-Infrared Fluorescent Materials for Sensing of Biological Targets*. Sensors, 2008. **8**(5): p. 3082-3105.
275. Resch-Genger, U., et al., *Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels*. Nat Methods, 2008. **5**(9): p. 763-75.
276. Coons, A.H., H.J. Creech, and R.N. Jones, *Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group*. Proc Soc Exp Biol Med. , 1941. **47**: p. 200-202.
277. Voss, E.W., Jr., C.J. Workman, and M.E. Mummert, *Detection of protease activity using a fluorescence-enhancement globular substrate*. Biotechniques, 1996. **20**(2): p. 286-91.
278. Pickering, A.M. and K.J. Davies, *A simple fluorescence labeling method for studies of protein oxidation, protein modification, and proteolysis*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(2): p. 239-46.
279. Schobel, U., et al., *Mechanisms of Fluorescence Quenching in Donor-Acceptor Labeled Antibody-Antigen Conjugates*. Journal of Fluorescence, 2000. **10**(2): p. 147-154.
280. Ogawa, M., et al., *In vivo target-specific activatable near-infrared optical labeling of humanized monoclonal antibodies*. Mol Cancer Ther, 2009. **8**(1): p. 232-9.
281. Mujumdar, S.R., et al., *Cyanine-labeling reagents: sulfobenzindocyanine succinimidyl esters*. Bioconjug Chem, 1996. **7**(3): p. 356-62.
282. Paganin-Gioanni, A., et al., *Fluorescence imaging agents in cancerology*. Radiol Oncol, 2010. **44**(3): p. 142-8.
283. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.

284. Lenglet, S., et al., *Molecular imaging of matrix metalloproteinases in atherosclerotic plaques*. Thromb Haemost, 2012. **107**(3): p. 409-16.
285. Peng, X., D.R. Draney, and W.M. Volcheck, *Quenched near-infrared fluorescent peptide substrate for HIV-1protease assay*. Proc. SPIE, 2006. **6097**: p. 60970F-60970F-12.
286. Kobayashi, H. and P.L. Choyke, *Target-cancer-cell-specific activatable fluorescence imaging probes: rational design and in vivo applications*. Acc Chem Res, 2011. **44**(2): p. 83-90.
287. Wellington Pham, Y.C., Ralph Weissleder, and Ching-Hsuan Tung, *Developing a Peptide-Based Near-Infrared Molecular Probe for Protease Sensing*. Bioconjugate Chem, 2004. **15**: p. 1403-1407.
288. Osterman, L., *The Next Step in Near Infrared Fluorescence: IRDye® QC-1 Dark Quencher*. LI-COR Biosciences, 2009: p. 1-8.
289. Lee, D.Y. and K.C. Li, *Molecular theranostics: a primer for the imaging professional*. AJR Am J Roentgenol, 2011. **197**(2): p. 318-24.
290. Ntziachristos, V., *Fluorescence molecular imaging*. Annu Rev Biomed Eng, 2006. **8**: p. 1-33.
291. Funovics, M., R. Weissleder, and C.H. Tung, *Protease sensors for bioimaging*. Anal Bioanal Chem, 2003. **377**(6): p. 956-63.
292. Resources, M.P., *A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES CHAPTER 1:Fluorophores and Their Amine-Reactive Derivatives*. Molecular Probes Handbook (online version) 2010. **11th Edition** (lifetechnologies.com/handbook): p. 15-96.
293. Schnaible, V. and M. Przybylski, *Identification of fluorescein-5'-isothiocyanate-modification sites in proteins by electrospray-ionization mass spectrometry*. Bioconjug Chem, 1999. **10**(5): p. 861-6.
294. Abello, N., et al., *Selective acylation of primary amines in peptides and proteins*. J Proteome Res, 2007. **6**(12): p. 4770-6.
295. Madler, S., et al., *Chemical cross-linking with NHS esters: a systematic study on amino acid reactivities*. J Mass Spectrom, 2009. **44**(5): p. 694-706.
296. Kalkhof, S. and A. Sinz, *Chances and pitfalls of chemical cross-linking with amine-reactive N-hydroxysuccinimide esters*. Anal Bioanal Chem, 2008. **392**(1-2): p. 305-12.
297. Resources, M.P., *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies chapter 2:Thiol-Reactive-Probes*.Molecular Probes Handbook (online version) 2010. **11th Edition**: p. 99-121.
298. Christopher K. Mathews, Kensal E. van Holde, and Kevin G. Ahern, *Biochemistry* 2000. **3rd Ed, Edition Benjamin Cummings**: p. 1186.
299. Bisswanger, H., *Enzyme Kinetics: Principles and Methods*. 2008. **Second Ed, Edition WILEY-VCH**: p. 293.
300. Bisswanger, H., *Enzyme Assays*. Perspectives in Science, 2014. **1**(1-6): p. 41-55.
301. Brooks, H.B., et al., *Basics of Enzymatic Assays for HTS*, in *Assay Guidance Manual*, G.S. Sittampalam, et al., Editors. 2004: Bethesda (MD).
302. Acker, M.G. and D.S. Auld, *Considerations for the design and reporting of enzyme assays in high-through put screening applications*. Perspectives in Science 2014. **1**(1-6): p. 56–73.

303. Michaelis, L., et al., *The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper*. *Biochemistry*, 2011. **50**(39): p. 8264-9.
304. Yan, S.J. and E.A. Blomme, *In situ zymography: a molecular pathology technique to localize endogenous protease activity in tissue sections*. *Vet Pathol*, 2003. **40**(3): p. 227-36.
305. Vandooren, J., et al., *Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes*. *Nat Methods*, 2013. **10**(3): p. 211-20.
306. Snoek-van Beurden, P.A. and J.W. Von den Hoff, *Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors*. *Biotechniques*, 2005. **38**(1): p. 73-83.
307. Deu, E., M. Verdoes, and M. Bogyo, *New approaches for dissecting protease functions to improve probe development and drug discovery*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(1): p. 9-16.
308. Quillard, T., et al., *Matrix metalloproteinase-13 predominates over matrix metalloproteinase-8 as the functional interstitial collagenase in mouse atheromata*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(6): p. 1179-86.
309. Lindsay, A.C. and R.P. Choudhury, *Form to function: current and future roles for atherosclerosis imaging in drug development*. *Nat Rev Drug Discov*, 2008. **7**(6): p. 517-29.
310. Rao, J., A. Dragulescu-Andrasi, and H. Yao, *Fluorescence imaging in vivo: recent advances*. *Curr Opin Biotechnol*, 2007. **18**(1): p. 17-25.
311. Calfon, M.A., et al., *Intravascular near-infrared fluorescence molecular imaging of atherosclerosis: toward coronary arterial visualization of biologically high-risk plaques*. *J Biomed Opt*, 2010. **15**(1): p. 011107.
312. Morgan, N.Y., et al., *Real time in vivo non-invasive optical imaging using near-infrared fluorescent quantum dots*. *Acad Radiol*, 2005. **12**(3): p. 313-23.
313. Bremer, C., C.H. Tung, and R. Weissleder, *In vivo molecular target assessment of matrix metalloproteinase inhibition*. *Nat Med*, 2001. **7**(6): p. 743-8.
314. Weissleder, R. and M.J. Pittet, *Imaging in the era of molecular oncology*. *Nature*, 2008. **452**(7187): p. 580-9.
315. Allport, J.R. and R. Weissleder, *Murine Lewis lung carcinoma-derived endothelium expresses markers of endothelial activation and requires tumor-specific extracellular matrix in vitro*. *Neoplasia*, 2003. **5**(3): p. 205-17.
316. Nahrendorf, M., et al., *Dual channel optical tomographic imaging of leukocyte recruitment and protease activity in the healing myocardial infarct*. *Circ Res*, 2007. **100**(8): p. 1218-25.
317. Ntziachristos, V., et al., *Fluorescence molecular tomography resolves protease activity in vivo*. *Nat Med*, 2002. **8**(7): p. 757-60.
318. Montcel, B., R. Chabrier, and P. Poulet, *Fluorescence and diffuse optical tomography: a system for small animal imaging*. *ITBM-RBM*, 2005. **26**: p. 252-254.
319. Li, B., et al., *Hybrid FMT-MRI applied to in vivo atherosclerosis imaging*. *Biomed Opt Express*, 2014. **5**(5): p. 1664-76.
320. Chen, J., et al., *In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis*. *Circulation*, 2002. **105**(23): p. 2766-71.
321. Deguchi, J.O., et al., *Inflammation in atherosclerosis: visualizing matrix metalloproteinase action in macrophages in vivo*. *Circulation*, 2006. **114**(1): p. 55-62.

322. Christen, T., et al., *Molecular imaging of innate immune cell function in transplant rejection*. *Circulation*, 2009. **119**(14): p. 1925-32.
323. Sosnovik, D.E., et al., *Fluorescence tomography and magnetic resonance imaging of myocardial macrophage infiltration in infarcted myocardium in vivo*. *Circulation*, 2007. **115**(11): p. 1384-91.
324. Nahrendorf, M., D.E. Sosnovik, and R. Weissleder, *MR-optical imaging of cardiovascular molecular targets*. *Basic Res Cardiol*, 2008. **103**(2): p. 87-94.
325. Choudhury, R.P. and E.A. Fisher, *Molecular imaging in atherosclerosis, thrombosis, and vascular inflammation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(7): p. 983-91.
326. Frangioni, J.V., *New technologies for human cancer imaging*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(24): p. 4012-21.
327. Inoue, T., et al., *Clinical study of patients undergoing paperless electroencephalography in emergency room*. *No To Hattatsu*, 2012. **44**(4): p. 305-9.
328. Ahn, S.Y., et al., *Pressure measurement in carpal tunnel syndrome : correlation with electrodiagnostic and ultrasonographic findings*. *J Korean Neurosurg Soc*, 2009. **46**(3): p. 199-204.
329. Chan, S.T., et al., *Quercetin supplementation suppresses the secretion of pro-inflammatory cytokines in the lungs of Mongolian gerbils and in A549 cells exposed to benzo[a]pyrene alone or in combination with beta-carotene: in vivo and ex vivo studies*. *J Nutr Biochem*, 2012. **23**(2): p. 179-85.
330. Nissen, S.E., et al., *Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2003. **290**(17): p. 2292-300.
331. Voight, B.F., et al., *Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study*. *Lancet*, 2012. **380**(9841): p. 572-80.
332. Landmesser, U., et al., *Increasing high-density lipoprotein cholesterol by cholesteryl ester transfer protein-inhibition: a rocky road and lessons learned? The early demise of the dal-HEART programme*. *Eur Heart J*, 2012. **33**(14): p. 1712-5.
333. Khera, A.V., et al., *Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(2): p. 127-35.
334. Rohatgi, A., et al., *HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(25): p. 2383-93.
335. Altshuler, A.E., et al., *Protease activity increases in plasma, peritoneal fluid, and vital organs after hemorrhagic shock in rats*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e32672.
336. DiDonato, J.A., et al., *Function and distribution of apolipoprotein A1 in the artery wall are markedly distinct from those in plasma*. *Circulation*, 2013. **128**(15): p. 1644-55.
337. Wagsater, D., et al., *MMP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the *Ldlr*^(-/-)*ApoB*^(100/100) mouse*. *Int J Mol Med*, 2011. **28**(2): p. 247-53.
338. Southwick, P.L., et al., *Cyanine dye labeling reagents--carboxymethylindocyanine succinimidyl esters*. *Cytometry*, 1990. **11**(3): p. 418-30.
339. Moritz F. Kircher, R.W., and Lee Josephson, *A Dual Fluorochrome Probe for Imaging Proteases*. *Bioconjugate Chem*, 2004. **15**: p. 242-248.
340. Lindstedt, L., et al., *Matrix metalloproteinases-3, -7, and -12, but not -9, reduce high density lipoprotein-induced cholesterol efflux from human macrophage foam cells by*

- truncation of the carboxyl terminus of apolipoprotein A-I. Parallel losses of pre-beta particles and the high affinity component of efflux.* J Biol Chem, 1999. **274**(32): p. 22627-34.
341. Eberini, I., et al., *Macrophage metalloproteinases degrade high-density-lipoprotein-associated apolipoprotein A-I at both the N- and C-termini.* Biochem J, 2002. **362**(Pt 3): p. 627-34.
342. Shi, H.T., et al., *Cathepsin S contributes to macrophage migration via degradation of elastic fibre integrity to facilitate vein graft neointimal hyperplasia.* Cardiovasc Res, 2014. **101**(3): p. 454-63.
343. Frangioni, J.V., *In vivo near-infrared fluorescence imaging.* Curr Opin Chem Biol, 2003. **7**(5): p. 626-34.
344. Ntziachristos, V., C. Bremer, and R. Weissleder, *Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging.* Eur Radiol, 2003. **13**(1): p. 195-208.
345. Ibarra, J.M., et al., *MMP-Activated Fluorescence Imaging Detects Early Joint Inflammation in Collagen-Antibody-Induced Arthritis in CC-Chemokine Receptor-2-Null Mice, In-Vivo.* Int J Inflam, 2011. **2011**: p. 691587.
346. Razansky, D., et al., *Multispectral optoacoustic tomography of matrix metalloproteinase activity in vulnerable human carotid plaques.* Mol Imaging Biol, 2012. **14**(3): p. 277-85.
347. O'Brien, K.D., *Pathogenesis of calcific aortic valve disease: a disease process comes of age (and a good deal more).* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(8): p. 1721-8.
348. Aikawa, E., et al., *Arterial and aortic valve calcification abolished by elastolytic cathepsin S deficiency in chronic renal disease.* Circulation, 2009. **119**(13): p. 1785-94.
349. Drinane, M.C., et al., *Plasminogen and plasmin activity in patients with coronary artery disease.* J Thromb Haemost, 2006. **4**(6): p. 1288-95.
350. Porcu, P., et al., *Circulating tissue kallikrein levels correlate with severity of carotid atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(6): p. 1104-10.
351. Mannello, F., *Serum or plasma samples? The "Cinderella" role of blood collection procedures: preanalytical methodological issues influence the release and activity of circulating matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors, hampering diagnostic trueness and leading to misinterpretation.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008. **28**(4): p. 611-4.
352. Djuric, T., et al., *Plasma levels of matrix metalloproteinase-8 in patients with carotid atherosclerosis.* J Clin Lab Anal, 2010. **24**(4): p. 246-51.
353. Salminen, A., et al., *Matrix metalloproteinase 8 degrades apolipoprotein A-I and reduces its cholesterol efflux capacity.* FASEB J, 2015. **29**(4): p. 1435-45.
354. Cox, J.M., et al., *Determination of cathepsin S abundance and activity in human plasma and implications for clinical investigation.* Anal Biochem, 2012. **430**(2): p. 130-7.
355. Hartung, D., et al., *Targeting of matrix metalloproteinase activation for noninvasive detection of vulnerable atherosclerotic lesions.* Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007. **34 Suppl 1**: p. S1-8.
356. New, S.E. and E. Aikawa, *Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification.* Circ Res, 2011. **108**(11): p. 1381-91.

357. Xu, J.M. and G.P. Shi, *Emerging role of mast cells and macrophages in cardiovascular and metabolic diseases*. *Endocr Rev*, 2012. **33**(1): p. 71-108.
358. Wypasek, E., et al., *Mast cells in human stenotic aortic valves are associated with the severity of stenosis*. *Inflammation*, 2013. **36**(2): p. 449-56.
359. Lommi, J.I., et al., *High-density lipoproteins (HDL) are present in stenotic aortic valves and may interfere with the mechanisms of valvular calcification*. *Atherosclerosis*, 2011. **219**(2): p. 538-44.
360. Vaziri, N.D., et al., *In vitro stimulation of HDL anti-inflammatory activity and inhibition of LDL pro-inflammatory activity in the plasma of patients with end-stage renal disease by an apoA-I mimetic peptide*. *Kidney Int*, 2009. **76**(4): p. 437-44.
361. Qin, S., et al., *Reverse D4F, an apolipoprotein-AI mimetic peptide, inhibits atherosclerosis in ApoE-null mice*. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2012. **17**(3): p. 334-43.
362. Getz, G.S. and C.A. Reardon, *ApoA-I mimetics: tomatoes to the rescue*. *J Lipid Res*, 2013. **54**(4): p. 878-80.
363. Hersberger, M. and A. von Eckardstein, *Low high-density lipoprotein cholesterol: physiological background, clinical importance and drug treatment*. *Drugs*, 2003. **63**(18): p. 1907-45.
364. Li, A.C. and C.K. Glass, *The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention*. *Nat Med*, 2002. **8**(11): p. 1235-42.
365. Rohrl, C. and H. Stangl, *HDL endocytosis and resecretion*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1831**(11): p. 1626-33.
366. Cavelier, C., et al., *The beta-chain of cell surface F(0)F(1) ATPase modulates apoA-I and HDL transcytosis through aortic endothelial cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012. **32**(1): p. 131-9.
367. Cavelier, C., L. Rohrer, and A. von Eckardstein, *ATP-Binding cassette transporter AI modulates apolipoprotein A-I transcytosis through aortic endothelial cells*. *Circ Res*, 2006. **99**(10): p. 1060-6.
368. Savion, N. and A. Gamliel, *Binding of apolipoprotein A-I and apolipoprotein A-IV to cultured bovine aortic endothelial cells*. *Arteriosclerosis*, 1988. **8**(2): p. 178-86.
369. Rohrer, L., et al., *Binding, internalization and transport of apolipoprotein A-I by vascular endothelial cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1761**(2): p. 186-94.
370. Guha, S. and H. Padh, *Cathepsins: fundamental effectors of endolysosomal proteolysis*. *Indian J Biochem Biophys*, 2008. **45**(2): p. 75-90.

Annexe 1:

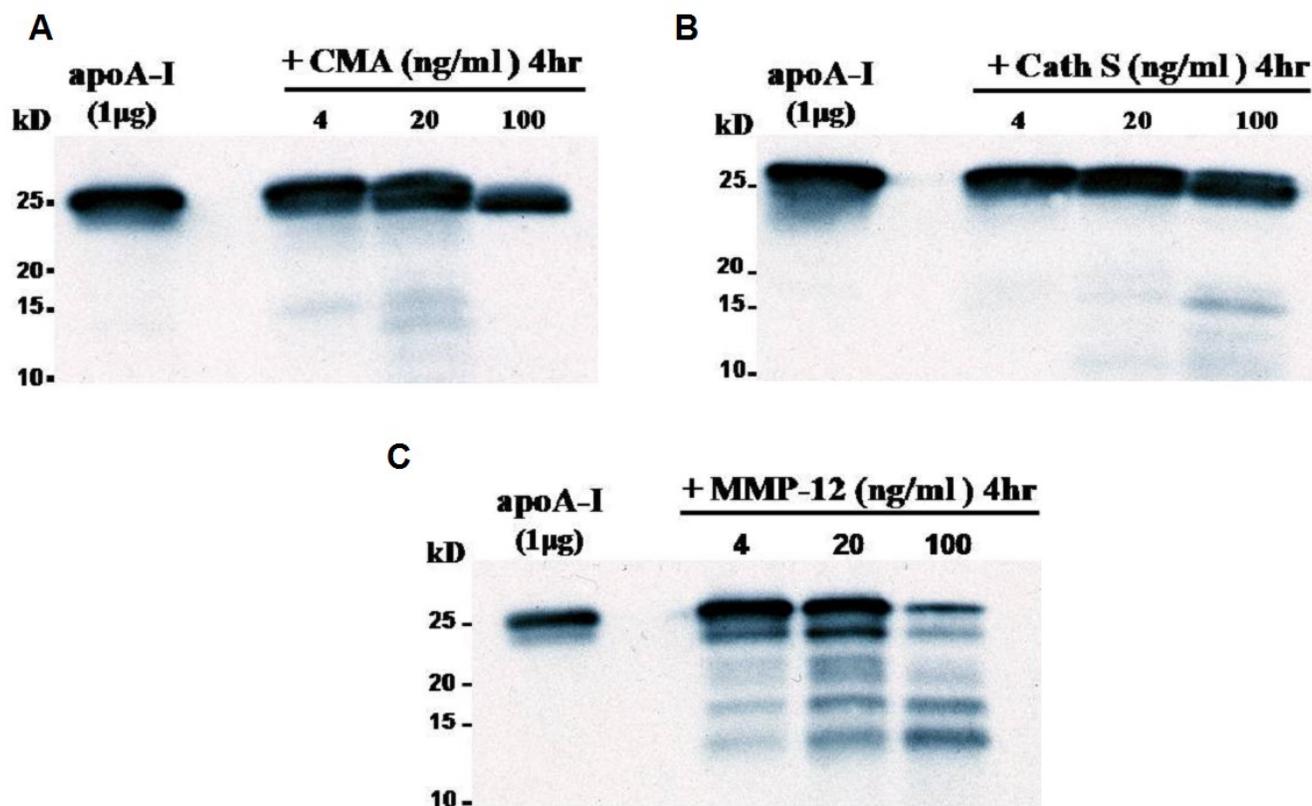


Figure 18. Profil de la dégradation de l'apoA-I (protéine native recombinante humaine) par l'activité protéolytique de la CMA (A), cathepsine S (B) et de la MMP-12 (C). L'apoA-I (5 µg/ml) a été incubée à 37 °C pendant une période de 4 hr avec des concentrations de 4, 20 et 100 ng/ml de CMA, cathepsine S et de MMP-12. Des aliquots de 1 µg ont été soumis à une électrophorèse sur SDS-PAGE 15% puis transférés sur une membrane PVDF. Un anticorps polyclonal anti-apoA-I humaine a été utilisé pour la détection des bandes. La bande au niveau de la première ligne du gel, représente une apoA-I native non dégradée par les protéases testées, est utilisée comme contrôle.

Protéases	Concentration (µg/ml)	Activité protéolytique (µmole Cy5.5 x s ⁻¹ x µg apoA-I ⁻¹)	Pourcentage de variation de l'activité protéolytique	Fluorescence totale émise (unité relative)	Pourcentage de variation de la fluorescence
Chymase	0,25	8,33E ⁻⁹	49,88	58530	16,03
	0,5	1,67E ⁻⁸		69701	
Cathepsine S	1	3,93E ⁻⁹	51,11	39030	29,74
	2	7,69E ⁻⁹		55553	
Trypsine	0,5	4,62E ⁻⁹	49,20	31288	14,94
	1	9,39E ⁻⁹		36782	

Tableau 8. Corrélation entre la variation de l'activité protéolytique durant l'activation in vitro de la sonde apoA-I-Cy5.5 et la fluorescence totale émise à la fin de la réaction. Deux fois plus de protéase (Chymase, Cathepsine S et Trypsine) incubée avec la sonde apoA-I-Cy5.5 est corrélé avec deux fois plus d'activité protéolytique, mais pas avec deux fois plus de fluorescence totale émise à la fin de la réaction.