

Université de Montréal

**Les effets de l'Angiopoietin-like 2 sur
la voie cytoprotectrice antioxydante Nrf2**

par

Youri Laplante-El Haïli

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès sciences
en Sciences Biomédicales
Option Générale

Mars, 2015

© Youri Laplante-El Haïli, 2015

Résumé

L'angiopoïétin-like 2 (angptl2) est une glycoprotéine de 64 kDa pro-inflammatoire et pro-athérogénique associée à divers maladies inflammatoires chroniques. Il est probable que l'angptl2 possède également un effet pro-oxydant, puisqu'elle stimule la production aigüe de dérivés réactifs oxygénés (DRO). Le facteur de transcription « nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 » (Nrf2) fait partie d'un mécanisme antioxydant majeur permettant de maintenir l'équilibre redox via l'induction de plusieurs gènes de l'élément de réponse antioxydante (ERA). En présence de DRO, la protéine Keap-1 se dissocie de Nrf2 et cesse de promouvoir sa dégradation protéasomale. Cette dissociation est stimulée par la protéine DJ-1 qui favorise la translocation nucléaire de Nrf2. La p38MAPK peut phosphoryler Nrf2 et promouvoir son interaction avec Keap-1.

Nous avons posé l'hypothèse selon laquelle l'angptl2 causait un stress oxydant chronique, d'abord en stimulant en aigu la production de DRO, puis en inhibant la voie antioxydante Nrf2. Nous avons étudié, par immunobuvardage de type Western sur des cellules endothéliales en culture (HUVEC), les effets de l'angptl2 recombinante (100 nM) sur les niveaux protéiques nucléaires de Nrf2, les niveaux de Keap-1 dans le cytosol et de DJ-1 dans le noyau, en absence et en présence de l'antioxydant NAC (10 µM). Nous avons également étudié l'activation de la p38MAPK.

Les niveaux nucléaires de Nrf2 n'ont pas été affectés par la stimulation aigüe (10 min) à l'angptl2 recombinante, mais ont été diminués par la stimulation chronique (24 h). L'ajout d'un agent antioxydant n'a pas altéré l'effet chronique, indiquant que les DRO ne sont pas directement impliqués. Les niveaux protéiques cytosoliques de Keap-1, protéine inhibitrice de Nrf2, et les niveaux nucléaires de DJ-1, protéine stabilisatrice de Nrf2, n'ont pas été affectés par l'angptl2 de manière significative. La phosphorylation de la p38MAPK n'a pas été non plus affectée par la stimulation aigüe ou chronique à l'angptl2. Ces données suggèrent que l'angptl2 n'a pas d'effet aigu, mais a un effet chronique inhibiteur sur la voie Nrf2, qui n'est pas associé à un effet sur Keap-1, DJ-1 ou p38MAPK.

Mots-clés : angptl2, stress oxydant, inflammation, endothélium, DJ-1, Keap-1, p38MAPK

Abstract

Angiopoietin-like 2 (angptl2) is a 64 kDa pro-inflammatory and pro-atherogenic glycoprotein associated with various chronic inflammatory diseases. It is likely that angptl2 also has a pro-oxidant property, since it stimulates the acute production of reactive oxygen species (ROS). The transcription factor nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 (Nrf2) constitutes a major antioxidant mechanism, responsible for maintaining redox balance within the cell via the induction of various genes composing the antioxidant response element (ARE). In the presence of ROS, cytosolic protein Keap-1 dissociates from Nrf2 and is thus no longer able to target Nrf2 for proteasomal degradation. The interaction between Nrf2 and Keap-1 is inhibited by DJ-1, another regulator of Nrf2, but is favoured by phosphorylation of Nrf2 by p38MAPK.

Our hypothesis was that angptl2 caused a chronic oxidative stress, at first by stimulating an acute ROS production, and later by inhibiting the Nrf2 antioxidant pathway. We studied, by Western Blot on cultured endothelial cells (HUVEC), the effects of recombinant angptl2 (100 nM) on nuclear protein levels of Nrf2, as well as cytosolic levels of Keap-1 and nuclear levels of DJ-1 in the absence and presence of the antioxidant NAC (10 μ M). We also measured the activation of p38MAPK in response to angptl2 stimulation.

Nuclear protein levels of Nrf2 were not affected by acute stimulation (10 min) by recombinant angptl2, but were diminished after chronic stimulation (24 h). The addition of an antioxidant did not alter angptl2's chronic effect on Nrf2, indicating that ROS were not directly implicated. Cytosolic levels of Keap-1 and nuclear levels of DJ-1 were not significantly affected by angptl2. Similarly, angptl2 did not affect p38MAPK phosphorylation.

These data suggest that angptl2 has no acute effect on Nrf2, but has an inhibitory chronic effect, which is not likely to involve Keap-1, DJ-1 or p38MAPK.

Keywords : angptl2, oxidative stress, inflammation, endothelium, DJ-1, Keap-1, p38MAPK

Table des matières

Résumé	ii
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vii
Liste des abréviations	viii
Remerciements	ix
1. Introduction	13
1.1 Mise en contexte	13
1.2 L'endothélium et la fonction endothéliale	14
1.2.1 L'endothélium et ses rôles physiologiques	14
1.2.1.1 Description de l'endothélium	14
1.2.1.2 Rôles de l'endothélium	14
1.2.1.2.1 Barrière.....	14
1.2.1.2.2 Hémostase	15
1.2.1.2.3 Inflammation	15
1.2.1.2.4 Tonus vasculaire.....	15
1.2.2 La fonction endothéliale et les EDRF en conditions physiologiques	16
1.2.2.1 Le NO.....	16
1.2.2.2 La PGI2	18
1.3 Réponse au stress oxydant en conditions physiologiques.....	19
1.3.1 Le métabolisme de l'O ₂ produit des dérivés réactifs de l'oxygène	19
1.3.2 Gestion des DRO par les enzymes antioxydantes.....	19
1.3.2.1 La SOD.....	19
1.3.2.2 La catalase et la GPx	20
1.3.2.3 La voie de signalisation Keap-1 - Nrf2 - ERA	20
1.3.2.3.1 La p38MAPK et Nrf2.....	22

1.4	La dysfonction endothéliale	23
1.4.1	La eNOS découplée et l'importance du NO	23
1.4.2	La dysfonction endothéliale mène aux maladies cardiovasculaires	23
1.5	L'inflammation vasculaire	25
1.5.1	Description et acteurs	25
1.5.2	L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique	26
1.6	La dysfonction endothéliale, le stress oxydant et l'inflammation : qui fait quoi?	28
1.6.1	Le stress oxydant et la dysfonction endothéliale	29
1.6.2	L'inflammation et la dysfonction endothéliale	29
1.6.3	Le stress oxydant et l'inflammation	30
1.6.4	Le NF-κB et la triade de la santé vasculaire	30
1.6.5	La triade de la santé vasculaire	31
1.7	L'angptl2	32
1.7.1	Description	32
1.7.2	Effets physiologiques	33
1.7.3	Effets pathophysiologiques	33
1.7.4	Voies de signalisation connues	36
2.	Hypothèse et objectifs de l'étude	38
2.1	Hypothèse	38
2.2	Objectifs spécifiques	38
3.	Matériel et méthodes.....	39
3.1	Culture cellulaire.....	39
3.2	Extraction protéique.....	40
3.3	Immunobuvardage de type Western	40
3.4	Analyses statistiques	44
4.	Résultats.....	45
4.1	Les effets de l'angptl2 et NAC sur les niveaux de Nrf2 nucléaires	45
4.2	Les effets de l'angptl2 et NAC sur DJ-1	47
4.3	Les effets de l'angptl2 et NAC sur Keap-1	49

4.4	Les effets de l'angptl2 et NAC sur p38MAPK	51
4.5	Les effets de l'angptl2 et NAC sur Hsp27	53
5.	Discussion	55
5.1	L'angptl2 a-t-il un effet sur la voie antioxydante Nrf2?	55
5.2	Les effets de l'angptl2 sur Nrf2 sont-ils associés à un effet sur DJ-1?	57
5.3	Les effets de l'angptl2 sur Nrf2 sont-ils associés à un effet sur Keap-1?	57
5.4	La voie de signalisation responsable des effets de l'angptl2 sur Nrf2 pourrait-elle impliquer la p38MAPK?	58
5.5	Quelles sont les limites de cette étude?	59
5.6	Quelles sont les prochaines étapes dans le cadre de l'étude de l'effet de l'angptl2 sur le stress oxydant	61
6.	Conclusion	62
7.	Bibliographie	lxiii

Liste des figures

Figure 1. Régulation de Nrf2 par Keap-1 et DJ-1	22
Figure 2. Le stress oxydant, la dysfonction endothéliale et l'inflammation interagissent entre eux pour former un environnement pro-athérosclérotique	29
Figure 3. Structure secondaire de l'angptl2	33
Figure 4. L'angptl2 induit une production rapide et massive de DRO dans les HUVEC	36
Figure 5. Effets de l'angptl2 et NAC sur les niveaux nucléaires de Nrf2.....	47
Figure 6. Effets de l'angptl2 et NAC sur les niveaux nucléaires de DJ-1	49
Figure 7. Effets de l'angptl2 et NAC sur les niveaux cytosoliques de Keap-1.....	50
Figure 8. Effets de l'angptl2 et NAC sur les niveaux cytosoliques de P-p38MAPK / T-p38MAPK	53
Figure 9. Effets de l'angptl2 et NAC sur les niveaux cytosoliques de P-Hsp27 / T-Hsp27 ...	55

Liste des abréviations

AC : Adénylate cyclase
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADP : Adénosine diphosphate
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AngII : Angiotensine II
angptl1 : Angiopoietin-like 1
angptl2 : Angiopoietin-like 2
ApoB100 : Apolipoprotéine B100
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ARNsi : Petit ARN interférent
AT1R : *Angiotensin-II receptor, type 1*
ATF2 : *Activating transcription factor 2*
ATP : Adénosine triphosphate
ATX : Athérosclérotique
BH₄ : Tétrahydrobioptérine
CaMKII : Protéine kinase Ca²⁺/calmoduline-dépendante II
CLMV : Cellule musculaire lisse vasculaire
COX : Cyclo-oxygénase
CRP : Protéine C-réactive
DCFDA : *2',7'-dichlorofluorescein diacetate*
DRO : Dérivés réactifs oxygénés
EDCF : Facteurs constrictifs dérivés de l'endothélium
EDHF : Facteurs hyperpolarisants dérivés de l'endothélium
EDRF : Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium
eNOS : *Endothelial nitric oxide synthase*
ERA : Élément de réponse antioxydante
ET-1 : Endothéline-1
FBS : Sérum de veau foetal
FEM : Fibroblastes embryonnaires murins
FGF : Facteur de croissance des fibroblastes
FLD : *Fibrinogen-like domain*
FPLC : *Fast protein liquid chromatography*
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GCs : Guanylate cyclase soluble
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
GPCR : Récepteur couplé à une protéine G
GPx : Glutathion peroxydase
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HEK : *Human Embryonic Kidney 293 cells*
HO-1 : Hème oxygénase-1
HO[•] : Radical hydroxyle
Hsp27 : *Heat shock protein 27*

HUVEC : Cellule endothéliale de veine ombilicale humaine
ICAM-1 : *Intercellular adhesion molecule-1*
IFN- γ : Interféron- γ
IL : Interleukine
Keap-1 : *Kelch-like ECH-associated protein*
LDL : Lipoprotéine de basse densité
LDLr : Récepteur aux LDL
LILRB2 : *Leukocyte immunoglobulin-like receptor B2*
M-CSF : *Macrophage colony stimulating factor*
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
MLCP : Phosphatase des chaînes légères de la myosine
NAC : N-acétylcystéine
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B : Facteur nucléaire- κ B
NO : Monoxyde d'azote
Nrf2 : *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*
Nup62 : Nucléoporine p62
O₂^{•-} : Anion superoxyde
ONOO⁻ : Peroxynitrite
oxLDL : LDL oxydé
p38MAPK : *Mitogen-activated protein kinase p38*
PBS : *Phosphate buffered saline*
PDGF : *Platelet-derived growth factor*
PGI₂ : Prostacycline
PI3K : Phosphatidyl-inositol 3 kinase
PKA : Protéine kinase A
PKG : Protéine kinase G
PLA₂ : Phospholipase A₂
qPCR : *Quantitative polymerase chain reaction*
SOD : Superoxyde dismutase
TGF- β : Facteur de croissance transformant- β
TNF- α : Facteur de nécrose tumorale α
VCAM-1 : *Vascular cellular adhesion molecule*
VEGF : vascular cellular adhesion molecule

Remerciements

À mon directeur de recherche, le **Dr. Éric Thorin**, je tiens à présenter mes remerciements les plus sincères. Dr. Thorin, dès notre première rencontre vous avez offert une place dans votre laboratoire à un étudiant perdu, un autre “réfugié”, après une première année de maîtrise difficile, et je ne serai jamais assez reconnaissant pour ce premier acte de générosité qui semblait tellement naturel et simple pour vous, mais que moi je n’oublierai jamais. Toujours très calme, optimiste malgré les résultats décevants, les problèmes techniques, et les erreurs que j’ai pu faire, je ne peux qu’admirer votre patience et être reconnaissant pour tout ce que vous m’avez appris.

J’aimerais remercier également le **Dr. Nathalie Thorin-Treescases**, que j’appelle parfois « Nathapédia » puisqu’elle en sait plus sur l’angptl2 que Wikipédia. Nathalie je vous dois un énorme merci pour tout ce que vous faites pour vos étudiants. Je vous remercie d’abord d’avoir passé autant de temps sur les différentes versions de ce mémoire, il m’aurait été impossible de faire un travail complet sans vous, et avec toutes ces notes et ratures, je pense que vous dois bien un nouveau stylo rouge. Mais au delà de la science j’aimerais souligner vos petites attentions, comme les traditionnels gâteau d’anniversaires (qu’on ne mange jamais à l’intérieur du labo, attention!) ou lorsque vous nous recevez chez vous à Noël, qui contribuent à cet esprit de famille que nous avons développés au labo, et ça, ça n’a pas de prix.

C’est justement avec cet esprit de famille en tête que je voudrais poursuivre ces remerciements. Dans notre laboratoire, je n’ai jamais eu de simples ‘collègues’, qui font leur travail chacun de leur côté. À mon premier jour, où nous avons diné au restaurant Alep sur Jean-Talon, j’étais loin de me douter que je venais de rencontrer un groupe de personnes qui dans le courant de l’année suivante deviendraient comme une deuxième famille. C’est par un strict hasard que toutes nos vies se sont croisées ici, et pourtant c’est grâce à ce hasard j’ai eu l’honneur et le privilège de rencontrer et d’apprendre à connaître des personnes incroyables avec qui j’ai vécu des moments inoubliables. Très chers amis, je vous le promets, ceci n’est qu’un au revoir.

Je remercie **Cécile Martel** pour m’avoir guidé à travers toutes les étapes de mon projet. Je te dois énormément de respect pour ton dévouement, pour ton dynamisme, pour chacune des longues journées que tu passes au labo sans jamais te plaindre (bon, tu râles parfois mais ça c’est pas pareil, c’est culturel!), alors que tu trouves toujours le temps de répondre à mes questions et tu fais tout ce que tu peux pour dîner avec nous à chaque jour. Cher Cécile, j’espère de tout cœur que tu trouveras un poste pour poursuivre ta carrière de chercheur et que tu auras appréciée ta vie au Québec, malgré la neige.

Je remercie **Albert Nguyen** (qui quittera très bientôt son poste de ‘doyen’ du labo), notamment parce qu’il est toujours en mesure de trouver une solution à mes problèmes, comme si tous les problèmes techniques possibles et imaginables lui étaient déjà arrivés auparavant. Albert, à défaut d’avoir une mémoire d’éléphant (oups, j’ai oublié!), tu es une excellente personne qui a les valeurs à la bonne place, une des personnes les plus calmes et

sereines que j'ai rencontré (impossible de t'imaginer fâché), et j'adore ton sens de l'humour et les petits tours que tu joues à tout le monde, sans jamais rater une occasion de nous faire rire. On fera plus attention avec le pool de hockey l'année prochaine.

Je remercie **Carol Yu** (in English, although you should learn French already!). You know how, in physiology, in order to study the role of objects, we often simply remove them and watch what happens? Well, as I've told you before, this was exactly the way of how I came to realize how important you were in the lab, soon after you left. Carol, you've been a true mentor to me, you taught me every technique, you've watched me go every step of the way, you've given me invaluable counsel, you kept me motivated and helped me fix - and learn from - my (many) mistakes. You already knew how much I value our friendship, I'm hoping the many laughs we shared spoke for themselves because I don't think I could put it into words; but now I hope you know how grateful I am for all the things you did for me at work. Come visit anytime, bro.

Je remercie **Xiao Yan Luo** (in English, although I should've learned Mandarin already!). Dear Xiao Yan, you already know how irreplaceable you are and how you sad I was to see you leaving, but I've never expressed how inspiring your attitude was at work. I envy your caution, your sense of organization, I was always surprised to see at what length you were ready to go to get your own work done, and then to help others finish theirs. By your dedication, you made me feel guilty if I didn't try my absolute best at every attempt because you always did. But aside from work, you're by far the sweetest, most gentle and caring person I've met in my entire life. 谢谢你为我做的一切.

Je remercie **Adeline Rignault**, ma voisine d'en face. Ma très chère Adou, nos projets étaient tellement différents qu'on n'a jamais vraiment collaboré ensemble, on ne pouvait pas s'aider l'un l'autre avec nos projets, en plus d'être tous les deux les bébés du labo. Et pourtant, en se côtoyant tous les jours on a fini par se bâtir une belle complicité, franche, comme celle qui existe entre des frère et sœur, à travers notre amour de la bouffe, notre compétition au badminton, tes blondineries quotidiennes et les tours que j'adore te jouer constamment. J'espère que tu réalises à quel point tu es une personne extraordinaire. Et c'est pas fini, si tu retournes en France, je viendrai te visiter dans ta ferme, promis.

Enfin, je remercie my great friends **Yolanda Chen** (waow!), **Sirirat Surinkaew** and her daily craziness, and **Eric Duong** the genius, notre petite nouvelle **Olivia de Montgolfier** qui ne pouvait pas tomber dans un meilleur labo, mon bro **Marc-André Méus** et mes anciennes collègues **Marie-Élaine Clavet** et **Kim Tardif** pour votre aide précieuse durant ma première année de maîtrise. Je remercie enfin toutes les autres personnes qui contribuent à faire de l'ICM un milieu de travail magnifique.

Pour terminer, je remercie évidemment mes parents, sans qui je ne me serai jamais rendu jusqu'ici, Dr. El Haïli, qui écrivait sa thèse pendant qu'elle m'apprenait à marcher, ma sœur Myriam, mon père, toute ma famille, Tiphaine pour ton support constant, et tous mes amis qui continuent de m'endurer depuis toutes ces années. Merci à tous.

*Je dédie ce mémoire à ma famille, à mes parents, et à
Ahmed El Haïli, qui disait il y a cinquante ans:
« Les études avant tout »*

1. Introduction

1.1. Mise en contexte

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité au Canada (Statistique-Canada 2011), et dans le monde (WHO 2011) enlevant la vie à un Canadien toutes les 7 minutes et étant responsables d'environ 30% des décès totaux en 2008 au Canada (Statistique-Canada 2011) et dans le monde (WHO 2011). Elles coûtent à l'économie canadienne plus de 20.9 milliards de dollars par année en traitements et coûts associés à la perte de productivité (Board of Canada, 2010). Ces maladies cardiovasculaires touchent le cœur ou les vaisseaux sanguins, incluant les infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux, les thromboembolismes et les maladies cardiaques congénitales. Les cellules endothéliales sont les cellules qui tapissent l'intérieur des vaisseaux sanguins en une monocouche, formant une barrière ayant une superficie totale estimée à 350 m² (Pries, Secomb et al. 2000) qui régule les échanges entre le sang et le tissu périvasculaire. L'importance de l'intégrité de l'endothélium est mise en évidence par les nombreuses autres fonctions de cette monocouche cellulaire : l'endothélium est antithrombotique/anticoagulant, il contrôle la réponse immunitaire inflammatoire en interagissant avec les leucocytes, et régule et contrôle le tonus vasculaire en communiquant avec les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). L'endothélium peut devenir dysfonctionnel lorsqu'il est exposé de façon chronique à des niveaux élevés de stress oxydant ou d'inflammation, et cette dysfonction endothéliale peut mener aux maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose. C'est dans ce contexte pro-inflammatoire et pro-oxydant que la surexpression de la protéine soluble angiopoïétin-like2 (angptl2) a été observée dans des cellules endothéliales isolées et cultivées provenant de patients coronariens sévères fumeurs (Farhat, Thorin-Trescases et al. 2008). L'angptl2 est une glycoprotéine de 64 kDa associée à divers maladies inflammatoires chroniques, et qui est pro-inflammatoire et pro-athérogénique (Thorin-Trescases and Thorin 2014). Notre hypothèse de travail est que l'angptl2 est également pro-oxydante, *via* un effet inhibiteur sur les mécanismes antioxydants des cellules endothéliales. Cet effet pro-oxydant, en synergie avec l'effet pro-inflammatoire, contribuerait au développement des maladies chroniques telles que l'athérosclérose.

1.2. L'endothélium et la fonction endothéliale

1.2.1. L'endothélium et ses rôles physiologiques

1.2.1.1. Description de l'endothélium

Les vaisseaux sanguins sont formés de trois couches : la tunica intima est composée de l'endothélium reposant sur la membrane basale et de tissu conjonctif, et est délimitée par la limitante élastique interne; la tunica media est située entre les limitantes élastiques internes et externes, composée de CMLV et de tissu conjonctif; finalement, l'adventice enveloppe le vaisseau dans une matrice de collagène et peut comporter des nerfs et des petits vaisseaux irriguant la paroi des artères plus épaisses.

L'endothélium est la monocouche de cellules endothéliales qui tapisse la paroi interne des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Alors que dans les années 1950, il était vu comme n'étant « [qu']un peu plus qu'une feuille de cellophane nucléée » (Florey 1966), l'endothélium occupe de nombreuses fonctions variées et vitales, si bien qu'il peut être considéré aujourd'hui comme un organe à part entière (Aird 2004) dont l'intégrité est nécessaire à une bonne santé cardiovasculaire.

1.2.1.2. Rôles de l'endothélium

1.2.1.2.1. Barrière

Tout d'abord, l'endothélium sert de barrière entre le sang et les tissus, permettant le passage sélectif de cellules sanguines, de nutriments et de molécules bioactives. Les échanges entre le sang et l'endothélium peuvent se produire de 4 façons, soit par diffusion passive à travers la cellule pour les molécules lipophiles et les gaz, par transcytose à travers des cavéoles et vésicules, par transporteurs membranaires à travers le cytoplasme des cellules endothéliales pour les grosses molécules et protéines, ou par passage intercellulaire pour les cellules, l'eau et les ions (Yuan and Rigor 2010, Mohrman and Heller 2014). Il existe trois types de jonctions qui lient les cellules endothéliales entre elles. Les jonctions GAP forment des pores qui

permettent le passage d'ions et petites molécules (<1 kDa) (Simon and Goodenough 1998) d'une cellule endothéliale à l'autre. Les jonctions serrées (« tight junctions ») sont formées majoritairement par deux types de protéines transmembranaires, les occludines et les claudines (Balda and Matter 2008). Ces jonctions serrées permettent non seulement de sceller la paroi endothéliale et d'empêcher le passage de molécules et d'ions, mais aussi de préserver la polarité des cellules en formant une barrière qui prévient les échanges de molécules transmembranaires entre les surfaces basale et apicale (Cereijido, Contreras et al. 2008). Finalement, les jonctions adhérentes, formées de cadhérines et de caténines, régulent la perméabilité vasculaire aux grosses molécules et cellules inflammatoires (Nagafuchi 2001).

1.2.1.2.2. Hémostase

En conditions physiologiques, l'endothélium possède des propriétés anticoagulantes. Il produit de nombreuses molécules qui inhibent l'activation des plaquettes et donc la formation du thrombus, comme le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂), l'ecto-adenosine diphosphatase, et la thrombomoduline (Wu and Thiagarajan 1996). Par contre, lors d'une blessure ou d'un saignement, l'endothélium participe à la formation du thrombus en produisant des facteurs prothrombotiques comme le facteur von Willebrand, nécessaire à l'adhésion plaquettaire sur l'endothélium (Handin and Wagner 1989).

1.2.1.2.3. Inflammation

L'inflammation est une réaction physiologique importante faisant partie de la réponse immunitaire innée, qui a pour rôle de protéger l'organisme contre les pathogènes étrangers et le réparer suite à une blessure. Lors de l'initiation de l'inflammation, lorsque les macrophages résidents dans le tissu détectent un antigène étranger, ils sécrètent des cytokines proinflammatoires qui activent les cellules endothéliales. Ces cellules endothéliales activées augmentent l'expression de molécules d'adhésion sur leurs membranes, qui serviront à recruter les autres cellules immunitaires qui participent à la réponse inflammatoire et à stimuler leur extravasation vers le site de l'inflammation (Serhan, Ward et al. 2010).

1.2.1.2.4. Tonus vasculaire

Les expériences du Dr. Robert Furchgott en 1980 ont été les premières à démontrer le rôle l'endothélium dans la vasodilatation (Furchgott and Zawadzki 1980). Précédemment il

avait été observé que l'acétylcholine était un facteur vasodilatateur *in vivo*, mais induisait paradoxalement une vasoconstriction *ex vivo*, sur des artères isolées (Furchgott 1955). Il s'avère que dans ces préparations *ex vivo*, l'endothélium était systématiquement endommagé, et lorsque la même expérience était répétée avec un endothélium intact, l'artère se dilatait (Furchgott and Zawadzki 1980). Cette expérience a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle l'endothélium pouvait relâcher une substance qui influencerait le tonus des CMLV, qui fut appelée EDRF pour « endothelium-derived relaxing factor ». Cette substance a ensuite été identifiée comme étant le monoxyde d'azote (NO) (Palmer, Ashton et al. 1988). D'autres EDRF ont également été identifiés, comme la PGI₂ (Siegel, Schnalke et al. 1989) ou le « Endothelium-derived hyperpolarizing factor » (EDHF) (Brandes, Schmitz-Winnenthal et al. 2000). De même, des « endothelium-derived constricting factors » (EDCF) qui induisent la vasoconstriction comme l'angiotensine II (AngII) (Britton, Ronau et al. 1986) et l'endothéline-1 (ET-1) (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988) ont également été identifiés.

L'endothélium doit préserver un équilibre entre les EDCF et les EDRF de façon à préserver un apport sanguin adéquat à tous les organes, et ce rôle de l'endothélium s'appelle la « fonction endothéliale ».

1.2.2. La fonction endothéliales et les EDRFs en conditions physiologiques

1.2.2.1. Le NO

Le monoxyde d'azote gazeux est le vasodilatateur principal produit par l'endothélium. Il est produit principalement par la NO synthase endothéliale (eNOS ou NOS de type III), une enzyme homodimérique qui transfère les électrons de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), un des substrats de la réaction, vers l'O₂ pour le réduire et oxyder la L-arginine, un acide aminé, en L-citrulline (Forstermann and Sessa 2012). La (6R-)5,6,7,8-tétrahydro-L-bioptérine (BH₄), est un cofacteur essentiel à la production de NO par la eNOS (Alderton, Cooper et al. 2001). La production de NO par les cellules endothéliales dépend également du Ca²⁺ et elle augmente lorsque les niveaux de Ca²⁺ intracellulaire ([Ca²⁺]_i) augmentent. L'acétylcholine et la bradykinine sont deux exemples de molécules qui induisent

cette augmentation du $[Ca^{2+}]_i$, en interagissant avec leurs récepteurs couplés à des protéines G (GPCR) respectifs (Colden-Stanfield, Schilling et al. 1987, Busse, Fichtner et al. 1988).

En plus d'être activée par le calcium, l'activité de la eNOS est augmentée par la phosphorylation (McCabe, Fulton et al. 2000, Fleming and Busse 2003). En effet, la eNOS dispose de plusieurs sites de phosphorylation dont la Ser1177 où la phosphorylation favorise son activité en augmentant son activité réductase et sa sensibilité au calcium (McCabe, Fulton et al. 2000, Fleming and Busse 2003). Les kinases responsables de cette phosphorylation sont Akt1 (Feliars, Chen et al. 2005), la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CaMKII) (Fleming, Fisslthaler et al. 2001), et la protéine kinase A (PKA) (Boo, Hwang et al. 2002).

Il existe de nombreux autres stimuli qui induisent l'activation de l'eNOS, comme le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) (Feliars, Chen et al. 2005), les forces de cisaillements (Boo, Hwang et al. 2002), l'adénosine diphosphate (ADP) (Hess, Kou et al. 2009), la thrombine (Thors, Halldorsson et al. 2008), la substance P (Murohara, Witzenbichler et al. 1999), l'histamine (Thors, Halldorsson et al. 2004), l'œstrogène (Kirsch, Yuhanna et al. 1999), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Thomas, Chen et al. 2002), et la sphingosine-1-phosphate (Rikitake, Hirata et al. 2002).

Le NO produit par la eNOS diffuse ensuite vers les CMLV où il active la guanylate cyclase soluble (GCs) en se liant à l'hème qui y est attaché (Arnold, Mittal et al. 1977, Ignarro, Wood et al. 1982). La GCs déphosphoryle le GTP et produit du GMP cyclique (GMPc) (Hardman and Sutherland 1969) qui sera le médiateur de la relaxation des cellules (Murad 1986). Le GMPc diminue le $[Ca^{2+}]_i$ en activant la protéine kinase dépendante du GMPc (PKG) qui phosphoryle plusieurs protéines (Lincoln, Cornwell et al. 1990). Comme le calcium est nécessaire à l'activité contractile des CMLV, la diminution du $[Ca^{2+}]_i$ entraîne la vasodilatation (Jiang and Stephens 1994). Le GMPc peut aussi affecter la contraction de la cellule sans influencer le $[Ca^{2+}]_i$, en réduisant l'activité contractile de la myosine en stimulant la déphosphorylation des chaînes légères de la myosine par les phosphatases des chaînes légères de la myosine (MLCP) (Lee, Li et al. 1997).

En plus de son effet vasodilatateur, le NO a également des propriétés anti-inflammatoires (Kubes, Suzuki et al. 1991) et anti-thrombotiques (Alheid, Frolich et al. 1987)

qui proviennent de son effet s-nitrosylant sur les résidus cystéine de plusieurs protéines (Stamler, Lamas et al. 2001), comme le facteur nucléaire- κ B (« nuclear factor- κ B », NF κ B) et d'autres protéines qui contrôlent le cycle cellulaire (Ghosh and Karin 2002).

1.2.2.2. La PGI₂

La PGI₂ est une autre molécule produite par l'endothélium capable de relaxer les CMLV. Elle provient de l'acide arachidonique, un phospholipide libéré de la membrane plasmique par la phospholipase A₂ (PLA₂) qui est métabolisé par les cyclooxygénases (COX) en prostaglandine G₂, puis en prostaglandine H₂. La prostaglandine H₂ est finalement transformée en prostacycline par la prostacycline synthétase. Le récepteur de la prostacycline dans les CMLV active l'adénylate cyclase (AC), et la protéine kinase A (PKA), ce qui entraîne une réduction des niveaux de calcium cytosolique (Mitchell, Ali et al. 2008), et donc une vasorelaxation (Jiang and Stephens 1994).

1.3. Réponse au stress oxydant en conditions physiologiques

L'endothélium en santé doit être en mesure de se protéger contre les différents stress auxquels il est naturellement exposé. Lorsque les cellules endothéliales sont exposées de façon aiguë à un environnement pro-oxydant, elles disposent de voies de défense antioxydantes afin de se protéger contre les dommages qui pourraient en résulter. Si les capacités protectrices de la cellule sont insuffisantes, l'équilibre redox de la cellule est débalancé et la cellule subit un stress oxydant. Le stress oxydant peut contribuer à la dysfonction endothéliale (Silva, Pernomian et al. 2012), dysfonction qui contribue au développement de l'athérosclérose (Bonomini, Tengattini et al. 2008), et qui se caractérise par une réduction des capacités vasodilatatrices de l'endothélium.

1.3.1. Le métabolisme de l'O₂ produit des dérivés réactifs de l'oxygène

Lors du métabolisme naturel du dioxygène, celui-ci subit une réduction de 4 électrons qui produit des métabolites oxygénés réactifs, appelés dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), ayant des réactivités et demi-vie différentes comme l'anion superoxide (O₂^{•-}), le H₂O₂, et les radicaux hydroxyle (HO[•]) (Yoshikawa and Naito 2002). Bien que ces molécules soient présentes en conditions physiologiques et qu'elles semblent avoir une fonction de signalisation, elles sont potentiellement nocives pour la cellule puisqu'elles peuvent réagir et endommager de façon aléatoire les protéines, l'ARN, l'ADN et les lipides (Sies 2013).

1.3.2. Gestion des DRO par les enzymes antioxydantes

La cellule dispose d'enzymes antioxydantes endogènes, telles que la superoxide dismutase (SOD), la catalase, et la glutathion peroxydase pour détoxifier ces molécules réactives et nocives et préserver l'équilibre redox de la cellule (Finkel and Holbrook 2000).

1.3.2.1. La SOD

La SOD est une enzyme antioxydante qui métabolise l'O₂^{•-} en catalysant la réaction suivante :

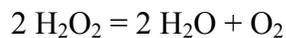


Le H_2O_2 ainsi formé est plus stable que l' $\text{O}_2^{\bullet -}$ et sera détoxifié par d'autres enzymes (Kalyanaraman 2013).

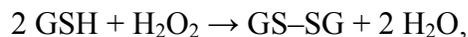
1.3.2.2. La catalase et la GPx

La catalase et la GPx sont deux enzymes qui métabolisent le H_2O_2 . La catalase est plus importante lorsque les niveaux de H_2O_2 sont faibles, alors que la GPx est plus active lorsque les niveaux de H_2O_2 sont élevés (Kalyanaraman 2013).

La réaction catalysée par la catalase est :



La réaction catalysée par la GPx est :



où GSH est le glutathion monomérique réduit et GS-SG, le disulfure de glutathion oxydé (Kalyanaraman 2013).

1.3.2.3. La voie de signalisation Keap-1 - Nrf2 - ERA

Lorsque la cellule est exposée à des espèces réactives oxygénées, elle augmente la synthèse d'enzymes antioxydantes afin de rétablir son équilibre redox. Le « nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 » (Nrf2), est un facteur de transcription exprimé de façon ubiquitaire qui se lie et active le promoteur de l'élément de réponse antioxydante (ERA) (Itoh, Chiba et al. 1997), stimulant la transcription de gènes antioxydants tels que la SOD, la GPx, la catalase, et la hème oxygénase (HO-1) (Dreger, Westphal et al. 2009). En absence de stress oxydant, la protéine « Kelch-like ECH-associated protein » (Keap-1) se lie dans le cytoplasme au Nrf2 exprimé de façon constitutive, et induit son ubiquitination et dégradation protéasomale (McMahon, Thomas et al. 2006). En revanche, lorsque la cellule est exposée à des espèces oxydantes et doit augmenter ses activités antioxydantes, Keap-1 agit comme un détecteur de stress oxydant et modifie son interaction avec Nrf2 qui n'est alors plus dégradée, migre vers le noyau et augmente la transcription de gènes antioxydants (McMahon, Thomas et al. 2006). La protéine DJ-1, aussi appelée « Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7 » (PARK7), est une protéine donc l'activité est également influencée par les niveaux

redox de la cellule (Wilson 2011) et qui inhibe l'interaction entre Keap-1 et Nrf2 (Clements, McNally et al. 2006), favorisant l'activité transcriptionnelle de Nrf2 en présence de stress oxydant (Figure 1).

Les niveaux de DJ-1 (Bitar, Liu et al. 2012) et de Keap-1 (Morales, Vargas et al. 2014) sont donc respectivement associés et inversement associés à une activité de la voie de signalisation Nrf2, traduite par la translocation nucléaire de Nrf2 et la transcription de gènes cibles comme HO-1. Il a été proposé que des pathologies telles que l'athérosclérose (Hosoya, Maruyama et al. 2005) et l'hypertension (Pour revue: (Howden 2013)) résultent d'une défaillance de la voie cytoprotectrice Nrf2-ERA, conduisant à la dysfonction endothéliale (Cheng, Siow et al. 2011), une défaillance qui a été observée dans les artères de rats âgés (Ungvari, Bailey-Downs et al. 2011).

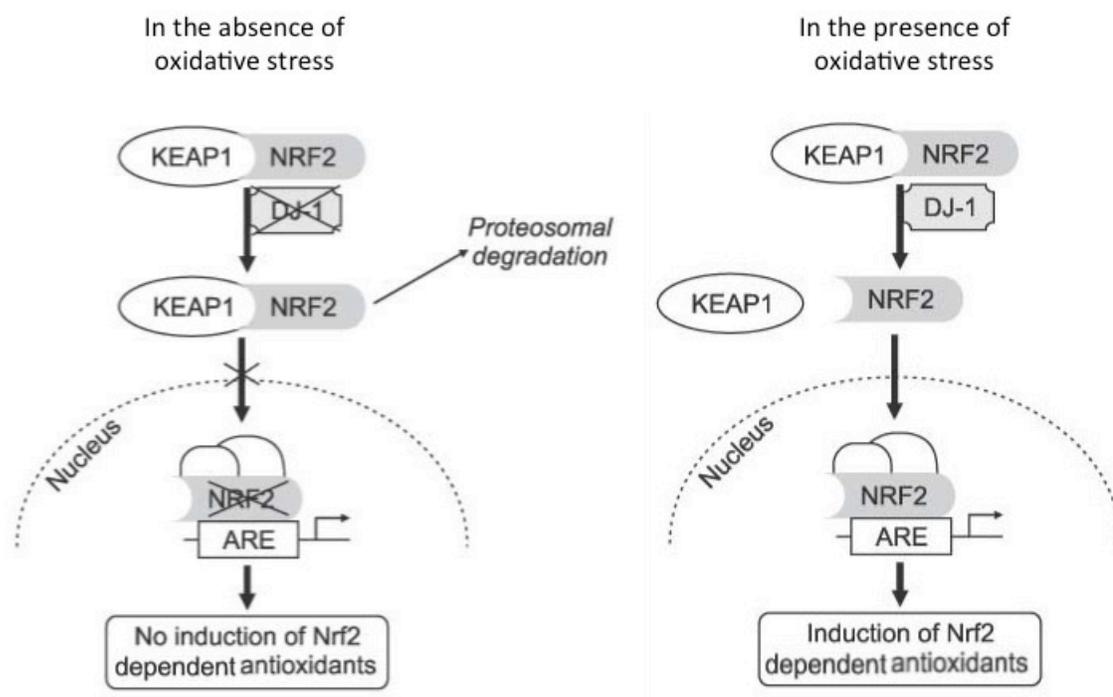


Figure 1 : Régulation de Nrf2 par Keap-1 et DJ-1. En absence de stress oxydant, Keap-1 dirige Nrf2 vers la dégradation protéasomale. En présence de stress oxydant, DJ-1 inhibe l'interaction entre Nrf2 et Keap-1 et permet à Nrf2 d'entrer dans le noyau pour induire la transcription de gènes antioxydants. Figure adaptée de (Lee 2009).

1.3.2.3.1. La p38MAPK et Nrf2

La p38 « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) est une protéine kinase qui est activée en réponse à des stress cellulaires comme l'irradiation ultraviolette (Bodero, Ye et al. 2003), les cytokines (Prickett and Brautigan 2007), le choc thermique (Murai, Hiragami et al. 2010), le choc osmotique (Kayali, Austin et al. 2000) et le stress oxydant (Yamada, Egashira et al. 2012). La p38MAPK pourrait jouer un rôle dans la signalisation de Nrf2 : il a été démontré que Nrf2 présentait dans sa séquence d'acide d'aminés des sites potentiels de phosphorylation par des MAPK (Hayes, Ellis et al. 1999), et que l'inhibition pharmacologique de p38MAPK par le SB202190 augmentait l'expression de HO-1 dans les fibroblastes embryonnaires murins (FEM) de type sauvage, mais pas dans les cellules transgéniques Nrf2^{-/-} (Naidu, Vijayan et al. 2009). De plus, la translocation nucléaire de Nrf2 était augmentée dans les FEM de souris transgéniques p38^{-/-}, par rapport à ceux de souris p38^{+/+} (Naidu, Vijayan et al. 2009). L'activation de p38MAPK induit la phosphorylation de Nrf2 et favorise son interaction avec Keap-1 *in vitro* (Keum, Yu et al. 2006). La phosphorylation par la p38MAPK aurait donc un effet inhibiteur sur la voie de signalisation Nrf2.

1.4. La dysfonction endothéliale

Lorsque l'endothélium est exposé aux différents facteurs de risques cardiovasculaires de façon chronique, sa capacité à induire la vasodilatation est réduite, et cette dysfonction est associée à un état pro-inflammatoire, pro-oxydant (Clapp, Hingorani et al. 2004) et pro-thrombotique (Bouchie, Hansen et al. 1998). C'est ce qu'on nomme la « dysfonction endothéliale », qui est propice au développement d'une plaque athérosclérotique (Landmesser, Hornig et al. 2004).

1.4.1. La eNOS découplée et l'importance du NO

Lorsque les cellules endothéliales sont exposées à un stress oxydant, les DRO diminuent la biodisponibilité du NO en le convertissant en peroxynitrite ($\text{ONOO}\cdot^-$), bloquant les effets anti-inflammatoires et anti-thrombotiques du NO (Pacher, Beckman et al. 2007). L' $\text{ONOO}\cdot^-$ ainsi formé est un composé cytotoxique oxydant qui dégrade la BH_4 , cofacteur nécessaire au bon fonctionnement de l'eNOS (Kuzkaya, Weissmann et al. 2003). Lorsque les réserves de BH_4 sont épuisées, l'eNOS entre dans un état dit « découplé », où son effet oxygénant habituel producteur de NO est remplacé par une activité réductrice qui produit alors du $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Luo, Lei et al. 2014), ayant un effet pervers additionnel qui contribue à diminuer la biodisponibilité du NO. De plus, les DRO peuvent être convertis en H_2O_2 par la SOD, et cet H_2O_2 peut réagir avec les groupements cystéine des protéines (Rhee 2006). Puisque les effets anti-inflammatoires du NO proviennent de sa capacité à réagir avec les résidus cystéine de plusieurs protéines en produisant une s-nitrosylation (Stamler, Lamas et al. 2001), le fait que ce soit le H_2O_2 et non le NO qui réagisse avec ces protéines a des conséquences néfastes pour la fonction endothéliale (Deanfield, Halcox et al. 2007). L'endothélium est donc susceptible de ne pas induire une vasodilatation appropriée à cause de la diminution de la production et biodisponibilité du NO, en plus d'entrer dans un état pro-inflammatoire et pro-oxydant.

1.4.2. La dysfonction endothéliale mène aux maladies cardiovasculaires

L'importance de l'intégrité endothéliale est mise en évidence lorsqu'on note les facteurs de risques cardiovasculaires avec lesquels la dysfonction endothéliale est associée :

l'hypercholestérolémie (Casino, Kilcoyne et al. 1993), l'hypercholestérolémie familiale (Sorensen, Celermajer et al. 1994), l'hyperlipidémie (Quyyumi, Mulcahy et al. 1997), le tabagisme (Davis, Shelton et al. 1985), l'âge (Celermajer, Sorensen et al. 1994), le diabète (Williams, Cusco et al. 1996), et la sédentarité (Hornig, Maier et al. 1996). Ces facteurs de risques semblent de plus avoir un effet additif, comme dans l'exemple de l'hypercholestérolémie et du tabagisme (Heitzer, Yla-Herttuala et al. 1996). La dysfonction endothéliale est elle-même un marqueur indépendant d'évènements cardiovasculaires (Lerman and Zeiher 2005), tels que la mort suite à une maladie cardiovasculaire, l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire ischémique, l'angine instable (Halcox, Schenke et al. 2002), et l'insuffisance cardiaque (Suwaidi, Hamasaki et al. 2000). L'étude de la dysfonction endothéliale est particulièrement intéressante dans l'athérosclérose puisque son développement est précédée par la dysfonction endothéliale (Harrison, Armstrong et al. 1987, Reddy, Nair et al. 1994). La dysfonction endothéliale peut être mesurée en clinique alors que l'athérosclérose demeure largement asymptomatique jusqu'au premier évènement cardiovasculaire (Ross 1993). La dysfonction endothéliale pourrait donc servir de marqueur précoce du développement de l'athérosclérose.

1.5. L'inflammation vasculaire

1.5.1. Description et acteurs

L'inflammation est une réponse physiologique à un dommage subi par un tissu, qui peut être occasionné par une blessure physique ou par la détection d'un pathogène étranger à l'organisme. Ce dommage stimule la cascade inflammatoire et entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire, l'activation des cellules endothéliales qui produisent des cytokines proinflammatoires et des molécules d'adhésion, auxquelles adhéreront les neutrophiles qui finiront par pénétrer l'espace périvasculaire, l'activation des macrophages et des plaquettes, et la formation d'un thrombus (Serhan, Ward et al. 2010). L'inflammation est dite aigüe ou chronique dépendamment non pas de sa durée, mais des types de cellules immunitaires qui y sont impliquées : neutrophiles, mastocytes, et plaquettes participent à l'inflammation aigüe, tandis que l'inflammation chronique est relayée par les lymphocytes, monocytes/macrophages et plasmocytes (Serhan, Ward et al. 2010). Dans les deux cas, l'inflammation a pour but de réparer un dommage présent ou potentiel, et donc une fois la blessure guérie, le processus inflammatoire doit se terminer par un mécanisme crucial et hautement régulé. En effet, si la réponse inflammatoire se prolonge au-delà de son mandat, le tissu est inévitablement endommagé par les cellules immunitaires elles-mêmes (Serhan, Ward et al. 2010).

L'inflammation aigüe débute avec la reconnaissance du pathogène par les macrophages résidents qui sécrètent des médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines, les leucotriènes, le facteur d'activation plaquettaire et des cytokines comme le facteur de nécrose tumorale α (« tumor necrosis factor α », TNF- α) (Serhan, Ward et al. 2010). Ces facteurs contribuent à l'activation des cellules endothéliales qui promeuvent l'extravasation des neutrophiles en exposant sur leurs membranes des molécules d'adhésion comme l'« intercellular adhesion molecule 1 » (ICAM-1), P-sélectine et E-sélectine, alors que les neutrophiles activés augmentent l'expression sur leurs membranes de molécules d'adhésion comme l'intégrine CD11b/CD18 et les ligands des sélectines P et E (PSGL-1 et ESL-1) (Serhan, Ward et al. 2010). L'endothélium activé sécrète également le facteur tissulaire qui active les plaquettes et mène à la formation du thrombus. La perméabilité du vaisseau est

augmentée en déliant les liaisons serrées, ce qui permet aux protéines et à l'eau d'entrer dans l'espace extravasculaire (Serhan, Ward et al. 2010). Les neutrophiles sont attirés vers l'espace sous-endothélial par des chimioattractants comme C5a, des cytokines comme l'interleukine (IL)-1 β et TNF- α , des chimiokines CXC, du collagène et peptides bactériens (Serhan, Ward et al. 2010).

Durant l'inflammation chronique, les molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales sont reconnues par les lymphocytes et monocytes qui migrent à travers l'endothélium (Serhan, Ward et al. 2010). Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes et sécrètent des anticorps, et les monocytes se différencient en macrophages qui, comme les lymphocytes, sécrètent des facteurs activateurs de lymphocytes, monocytes et macrophages, et stimulent la production de collagène par les fibroblastes (Serhan, Ward et al. 2010).

1.5.2. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique

L'inflammation est grandement impliquée dans toutes les étapes du développement de l'athérosclérose, de l'oxydation des « low-density lipoproteins » (LDL) dans la paroi vasculaire jusqu'à la rupture de la plaque fibreuse. Or l'athérosclérose est la cause primaire de maladie cardiovasculaire et d'accident vasculaire cérébral, étant la cause sous-jacente de jusqu'à 50% des décès annuels dans les sociétés occidentales (Lusis 2000).

Le LDL est un complexe lipide-protéine sphérique de densité faible (comparativement aux HDL) qui transporte le cholestérol dans le sang. L'hyperlipidémie et l'hypercholestérolémie entraînent l'infiltration de LDL dans l'intima, où les protéoglycanes de l'intima se lient aux protéines du LDL *via* des interactions ioniques (Tabas, Williams et al. 2007), ce qui constitue la première étape cruciale de développement de la plaque athéromateuse (Skalen, Gustafsson et al. 2002). Le LDL est ensuite oxydé par des enzymes pro-oxydantes diverses ou par les DRO générés durant l'inflammation, ce qui modifie les composants du LDL en d'autres biomolécules capables d'initier une réponse inflammatoire, stimulant la production de molécules d'adhésion sur l'endothélium comme la E-sélectine (Hwang, Ballantyne et al. 1997) et « vascular cellular adhesion molecule » (VCAM-1) (Li, Cybulsky et al. 1993), et de cytokines comme TNF- α , interféron- γ (IFN- γ), CCL2 (ou MCP-

1), CCL5, CXCL10 et CX3CL1, qui contribueront à attirer d'autres lymphocytes T et monocytes dans l'intima (Zernecke, Shagdarsuren et al. 2008). Les monocytes migrent ainsi dans l'espace sous-endothélial et se différencient en macrophages sous l'influence du « macrophage colony stimulating factor » (M-CSF) (Qiao, Tripathi et al. 1997), puis phagocytent le LDL oxydé (oxLDL) jusqu'à devenir des cellules spumeuses (« foam cells ») caractéristiques des stries lipidiques qui stimulent la réponse inflammatoire. Les cellules dendritiques rejoignent l'espace sous endothélial et contribuent à la réponse inflammatoire, elles qui ont généralement pour rôle de présenter les antigènes aux lymphocytes pour initier une réponse immunitaire acquise (Murphy, Travers et al. 2007). Lorsque les cellules dendritiques sont activées dans les stries lipidiques par tous les stimuli proinflammatoires, elles présentent les LDL phagocytés comme étant des pathogènes étrangers, et activent les lymphocytes dans les nœuds lymphatiques (Stemme, Faber et al. 1995, Niessner, Sato et al. 2006). Les lymphocytes T ainsi activés jouent un rôle clé dans la pathogénèse de l'athérosclérose (Hansson and Hermansson 2011). Les cellules spumeuses sécrètent du « platelet-derived growth factor » (PDGF), et les cellules endothéliales sécrètent du « fibroblast growth factor » (FGF) (Falcone, McCaffrey et al. 1993), qui vont tous deux attirer les CMLV et stimuler leur prolifération (Louis and Zahradka 2010). Au fil du temps les CMLV sécrètent du collagène qui formera la capsule fibreuse, qui est affaiblie par les métalloprotéinases relâchées par les macrophages et devient alors propice à la rupture (Shah, Falk et al. 1995). Enfin, la plaque se rompt et relâche divers facteurs prothrombotiques dans la lumière du vaisseau, formant un thrombus (Libby 2002) qui occlut le vaisseau de façon complète, obstruant le flux en aval de la plaque, ou bien de façon partielle, causant un thromboembolisme qui occlura le flux ailleurs dans la circulation (Fuster, Stein et al. 1990)

Ainsi, l'athérosclérose est une maladie profondément inflammatoire impliquant toutes les branches de l'immunité innée et acquise.

1.6. La dysfonction endothéliale, le stress oxydant et l'inflammation : qui fait quoi?

Nous avons vu que dans la dysfonction endothéliale, l'équilibre redox était débalancé et que l'endothélium subissait un stress oxydant. La dysfonction endothéliale est fortement associée à (et précède) l'athérosclérose, maladie inflammatoire chronique. Comment donc plaçons-nous ces trois paramètres que sont l'inflammation, le stress oxydant et la dysfonction endothéliale, de façon à obtenir un portrait cohérent de la pathogénèse de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires auxquelles ces trois facteurs sont associés?

Nous verrons dans cette section un résumé des effets que chaque membre de cette « triade de la santé vasculaire », telle que proposée par Wadley et al. (Wadley, Veldhuijzen van Zanten et al. 2013), pourrait avoir sur les deux autres, avec un rapide survol des mécanismes qui pourraient être impliqués (Figure 2).

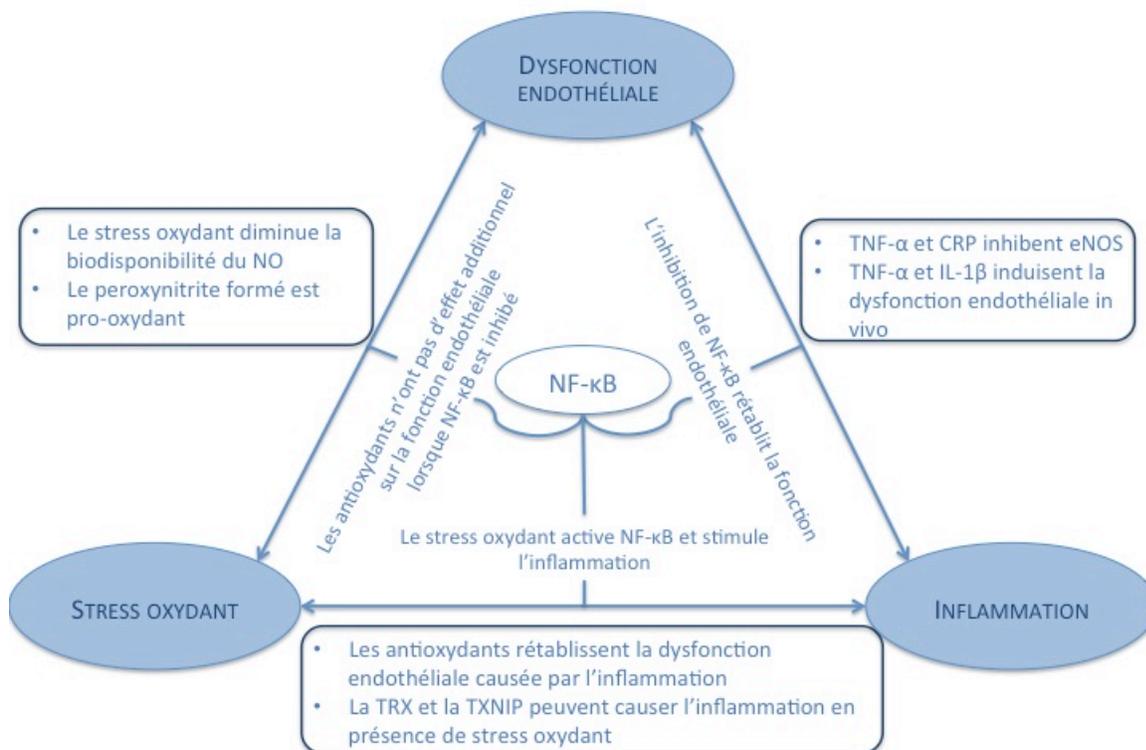


Figure 2 : Le stress oxydant, la dysfonction endothéliale et l'inflammation interagissent entre eux pour former un environnement pro-athérosclérotique. Le NF-κB pourrait être la voie de signalisation centrale à l'interaction entre les trois paramètres.

TRX : thiorédoxine; TXNIP : protéine interagissant avec la thiorédoxine; Figure adaptée de (Wadley, Veldhuijzen van Zanten et al. 2013)

1.6.1. Le stress oxydant et la dysfonction endothéliale

Chez les hommes de 60 ans, le stress oxydant est fortement associé à une réduction de la fonction endothéliale (Donato, Eskurza et al. 2007). Cette association pourrait être due aux modifications que le stress oxydant cause aux LDL, puisque le taux de LDL oxydés est associé à la dysfonction endothéliale et à la rigidité artérielle (Brinkley, Nicklas et al. 2009). De plus, le NO qui est la molécule clé de la fonction endothéliale mais ayant des fonctions allant au delà de son effet sur le GMPc des CMLV, réagit en présence de stress oxydant et plus précisément de $O_2^{\cdot-}$ pour former du $ONOO^{\cdot-}$ qui peut modifier les résidus tyrosine des protéines (Rubbo, Trostchansky et al. 2002). Le stress oxydant peut donc directement contribuer à la dysfonction endothéliale en réduisant la biodisponibilité du NO. De plus, si les protéines nitrosylées en question sont celles qui forment le LDL, le LDL oxydé/modifié par le $ONOO^{\cdot-}$ peut être phagocyté par les macrophages et contribuer à la progression de la plaque athérosclérotique (Rubbo, Trostchansky et al. 2002).

1.6.2. L'inflammation et la dysfonction endothéliale

Bien qu'il ne semble pas exister de consensus dans la littérature, il est probable que ce soit l'inflammation qui soit à l'origine de la dysfonction endothéliale, et non l'inverse. Le TNF- α et la protéine C-réactive (« C-reactive protein », CRP) sont des molécules impliquées dans l'inflammation dont l'expression augmente avec l'âge (Roubenoff, Harris et al. 1998) et, dans le cas de TNF- α , avec le taux de graisse abdominale (Trayhurn and Wood 2005). Ces deux molécules formeraient un lien important entre l'inflammation et la dysfonction endothéliale puisque plusieurs publications relatent leurs effets inhibiteurs sur la transcription et l'activité de l'eNOS (Singh, Devaraj et al. 2007, Zhang, Park et al. 2009). De plus, le TNF- α et l'IL-1 β induisent la dysfonction endothéliale chez l'homme *in vivo* (Bhagat and Vallance 1997), tout comme l'inflammation induite par la vaccination (Clapp, Hingorani et al. 2004), mais pas lorsque la vaccination est précédée par l'injection d'une forte dose d'aspirine

(Kharbanda, Walton et al. 2002). Dans les cellules endothéliales de veine saphène, la CRP augmente la production de l'endothéline-1, un EDCF (Verma, Li et al. 2002). Finalement, les cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-35 inhibent la dysfonction endothéliale (Shao, Cheng et al. 2014).

1.6.3. Le stress oxydant et l'inflammation

Les interactions entre le stress oxydant et l'inflammation ne sont pas encore bien comprises par la communauté scientifique, mais il semblerait que cette interaction existe et que l'un pourrait être une cause directe de l'autre, et vice-versa (Kim, Montagnani et al. 2006). Le NF- κ B semble faire partie du lien entre les deux voies car il est activé en réponse aux DRO (Donato, Eskurza et al. 2007) et aux cytokines proinflammatoires comme le TNF- α , le TNF- β et l'IL-1 (Osborn, Kunkel et al. 1989, Hohmann, Remy et al. 1990). De plus, NF- κ B stimule la transcription de gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-6 et le TNF- α .

Une autre voie de signalisation possible qui lie les deux membres de notre triade est la thiorédoxine (TRX), une oxydoréductase capable de neutraliser les DRO (Go, Ziegler et al. 2007) et d'augmenter l'expression d'autres enzymes antioxydantes (Burke-Gaffney, Callister et al. 2005). La TRX est liée à la protéine interagissant avec la thiorédoxine (TXNIP) qui détecte les niveaux redox et se détache de TRX en présence de DRO (Zhou, Tardivel et al. 2010). Suite à cela, la TRX est libre d'exercer son effet antioxydant, mais TXNIP est aussi libre de jouer un rôle pro-inflammatoire, augmentant l'activité de l'IL-1 β (Zhou, Tardivel et al. 2010). La TRX elle-même pourrait également avoir un rôle pro-inflammatoire, augmentant la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 α , l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α et l'IL-2 (Schenk, Vogt et al. 1996). De plus, dans les CMLV d'artère pulmonaire de rat, la surexpression de TXNIP est associée avec une diminution de la vasodilatation dépendante du NO (Schulze, Liu et al. 2006), confirmant le rôle délétère de cette voie.

1.6.4. Le NF- κ B et la triade de la santé vasculaire

La voie de signalisation pro-inflammatoire NF- κ B pourrait être celle qui lie les trois membres de notre triade. En plus de lier l'inflammation et le stress oxydant (voir paragraphe

5.3), le NF- κ B a été associé à la réduction de la vasodilatation dépendante de l'endothélium due à l'âge (Pierce, Lesniewski et al. 2009). En effet, chez les adultes en surpoids, l'inhibition pharmacologique de NF- κ B avec la salsalate a augmenté de façon dramatique la vasodilatation dépendante de l'endothélium en réponse à l'augmentation du débit sanguin (Pierce, Lesniewski et al. 2009). Cette augmentation de la fonction endothéliale est probablement due à un effet sur le stress oxydant puisque l'ajout d'un antioxydant a eu un effet vasodilatateur sur le groupe placebo, mais pas d'effet additionnel sur le groupe traité (Pierce, Lesniewski et al. 2009).

Il existe toutefois des résultats contradictoires : le traitement avec la sulfasalazine, un autre inhibiteur de NF κ B, n'a pas renversé la dysfonction endothéliale de patients coronariens (Tabit, Holbrook et al. 2012). Mais comme toutes les études, celle-ci présente ses limitations, comme le faible échantillonnage (n=5), l'utilisation d'une seule dose d'inhibiteur et la possibilité d'interaction entre la sulfasalazine avec d'autres médicaments (Tabit, Holbrook et al. 2012).

1.6.5. La triade de la santé vasculaire

Les résultats de l'étude menée par Clapp et al. indiquent que la dysfonction endothéliale serait causée par l'inflammation, mais que le stress oxydant a un rôle à jouer dans cette dysfonction endothéliale causée par l'inflammation (Clapp, Hingorani et al. 2004). En effet, l'injection d'un vaccin contre la typhoïde induisant une réponse inflammatoire a diminué la vasodilatation dépendante de l'endothélium dans les artères de l'avant-bras ainsi que la biodisponibilité du NO, et la fonction endothéliale n'a pas été rétablie par la L-arginine, substrat de la eNOS, mais a été partiellement retrouvée en présence d'acide ascorbique, un agent antioxydant (Clapp, Hingorani et al. 2004).

Notre protéine d'intérêt, l'angptl2, pourrait avoir un effet sur chacun des membres de la triade, elle qui est est pro-inflammatoire, fort probablement impliquée dans la dysfonction endothéliale et également potentiellement pro-oxydante.

1.7. L'angptl2

1.7.1. Description

L'angptl2 fait partie de la famille des « angiopoietin-like proteins », qui compte 8 glycoprotéines ayant une structure similaire aux angiopoïétines, soit un domaine « helical coiled-coiled » en son extrémité N-terminale et une courte séquence peptidique la reliant au domaine homologue au fibrinogène (« fibrinogen-like domain », FLD) du côté de l'extrémité C-terminale (Kim, Moon et al. 1999), à l'exception de l'angptl8 qui n'a pas de FLD (Quagliarini, Wang et al. 2012). L'angptl2 est une glycoprotéine de 493 acides aminés ayant un poids moléculaire de 64 kDa (Kim, Moon et al. 1999) (Figure 3). Chez l'homme, son ARNm est exprimé en grande quantité dans le tissu adipeux (Tabata, Kadomatsu et al. 2009), le cœur, l'intestin grêle, la rate, l'estomac, et en quantité plus faible dans le colon, les ovaires, la glande surrénale, le muscle squelettique et la prostate (Kim, Moon et al. 1999). La protéine est exprimée dans les cellules endothéliales, mais peu dans les CMLV (Farhat, Thorin-Trescases et al. 2013). Elle est sécrétée dans le sang à des concentrations d'environ 1 à 3 ng/mL chez l'humain sain (Thorin-Trescases and Thorin 2014). Dans les adipocytes, il a été démontré que l'angptl2 était sécrétée de manière rythmique et qu'elle suivait un rythme circadien (Kitazawa, Nagano et al. 2011, Kadomatsu, Uragami et al. 2013). L'identité de son/ses récepteur(s) demeure incertaine, mais l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Tabata, Kadomatsu et al. 2009) et le « leukocyte immunoblogulin-like receptor B2 » (LILRB2) (Zheng, Umikawa et al. 2012) ont été proposés comme candidats, dans les cellules endothéliales et dans les cellules souches hématopoïétiques, respectivement.

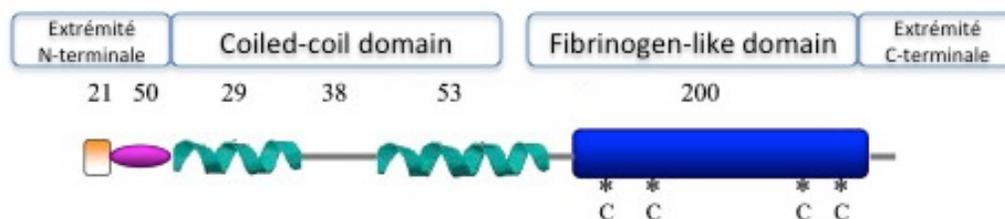


Figure 3 : Structure secondaire de l'angptl2, avec le domaine hydrophobe (en rose) à l'extrémité N-Terminale, le domaine « coiled-coil » (en vert) et le domaine homologue au fibrinogène (en bleu). Figure adaptée de (Dhanabal, Jeffers et al. 2005).

1.7.2. Effets physiologiques

Comme les angiopoïétines, l'angptl2 est pro-angiogénique (Kim, Moon et al. 1999), et l'angiogénèse est nécessaire entre autres à la formation normale de l'arbre vasculaire durant le développement embryonnaire. L'angptl2 dispose également de propriétés anti-apoptotiques tel que démontré dans les cellules endothéliales de poisson-zèbre knockdown pour angptl1 et angptl2 lors de l'angiogénèse, puis confirmé *in vitro* (Kubota, Oike et al. 2005). L'effet anti-apoptotique de l'angptl2 a aussi été démontré dans les macrophages qui subissent un stress comme la privation de sérum (Swain, Wottawa et al. 2014). L'angptl2 a également un effet pro-vasculogénique (stimule la formation *de novo* de vaisseaux à partir de cellules souches) sur les cellules formant des colonies endothéliales provenant du sang de cordon ombilical humain (Richardson, Robbins et al. 2014). De plus, l'angptl2 augmente la survie et l'expansion de cellules souches hématopoïétiques dérivées de la moelle osseuse (Zheng, Umikawa et al. 2012). Dans le cytosol, l'angptl2 augmente la sensibilité à l'angiotensine II en induisant le recyclage du récepteur à l'angiotensine II de type 1A (AT₁R) vers la membrane plasmique (Guo, Chenier et al. 2003). Finalement l'angptl2 est anti-thrombotique: elle inhibe l'agrégation plaquettaire stimulée par des agonistes comme la CRP, la thrombine ou l'ADP (Fan, Shi et al. 2014).

1.7.3. Effets pathophysiologiques

Malgré ses effets physiologiques, la production d'angptl2 à des concentrations trop élevées peut avoir des effets pathologiques. L'effet majeur de l'angptl2 est son effet pro-inflammatoire, et c'est à travers lui que l'angptl2 contribue au développement de plusieurs maladies chroniques comme le cancer, le diabète, l'athérosclérose, le syndrome métabolique, l'arthrite rhumatoïde, la dermatomyosite, l'inflammation de la cornée, l'insuffisance rénale chronique, l'anévrisme aortique, et l'hyperplasie néo-intimale (pour revue (Thorin-Trescases and Thorin 2014)).

Les niveaux circulants d'angptl2 sont plus faibles chez les volontaires sains que chez les patients atteints de la maladie coronarienne (Tabata, Kadomatsu et al. 2009, Farhat, Thorin-Trescases et al. 2013), et sont positivement corrélés avec la sévérité de la maladie

(Oike and Tabata 2009). Notre groupe a démontré une augmentation de l'adhésion de leucocytes sur l'endothélium isolé de souris athérosclérotiques n'exprimant pas le récepteur aux LDL mais surexprimant l'apolipoprotéine ApoB100 humaine (LDLr^{-/-}, hApoB100^{+/+}; ATX) après avoir été exposé *ex vivo* à l'angptl2 recombinante (Farhat, Thorin-Trescases et al. 2013). De plus, l'infusion chronique d'angptl2 chez ces souris ATX a augmenté la taille de la plaque athérosclérotique et l'expression de molécules d'adhésion et de cytokines pro-inflammatoires (Farhat, Thorin-Trescases et al. 2013). Notre laboratoire a également récemment rapporté l'implication de l'angptl2 dans la dysfonction endothéliale, en démontrant d'une part une dysfonction aigüe en présence d'angptl2, qui peut être prévenue par la co-incubation des artères isolées avec l'antioxydant N-acétylcystéine (NAC), et d'autre part une préservation de la production de NO dans les artères de souris knockdown pour l'angptl2 après un régime riche en graisse (« high-fat diet »), préservation de NO qui n'était pas observée chez les souris contrôles (Yu, Luo et al. 2014). Un autre groupe a récemment démontré que l'angptl2 dérivé des cellules endothéliales accélérât l'inflammation vasculaire en activant la voie de signalisation de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ /NF κ B, entraînant ainsi la dysfonction endothéliale, une diminution de la phosphorylation de eNOS, et l'athérosclérose (Horio, Kadomatsu et al. 2014).

Ces résultats sont à la base de la théorie de l'implication de l'angptl2 dans la dysfonction endothéliale qui, de concert avec un environnement pro-inflammatoire, précède le développement de la plaque athéromateuse.

Dans un modèle de souris qui surexpriment angptl2 spécifiquement dans les cellules épithéliales de la peau (souris transgéniques K14-angptl2), l'angptl2 accélère le développement des carcinomes squameux induits par blessure chimique (Aoi, Endo et al. 2011), qui sont caractérisés par une augmentation de la peroxydation des lipides, un marqueur de stress oxydant (Aoi, Endo et al. 2014). Ceci suggère un lien entre l'angptl2 et le stress oxydant. De plus, des données préliminaires de notre laboratoire indiquent que la stimulation aigüe de cellules endothéliales de veine ombilicale (« human umbilical vein endothelial cells », HUVEC) avec de l'angptl2 recombinante induit une production massive de DRO (Farhat et al., données non publiées) (Figure 4). Ces données suggèrent que l'angptl2, si présente de façon chronique, pourrait affecter l'équilibre redox de la cellule en faveur du stress

oxydant. Il est donc légitime de se poser la question suivante : le rôle de l'angptl2 dans le développement de la dysfonction endothéliale et l'athérosclérose est-il dû seulement à son action pro-inflammatoire, ou également à son action pro-oxydante?

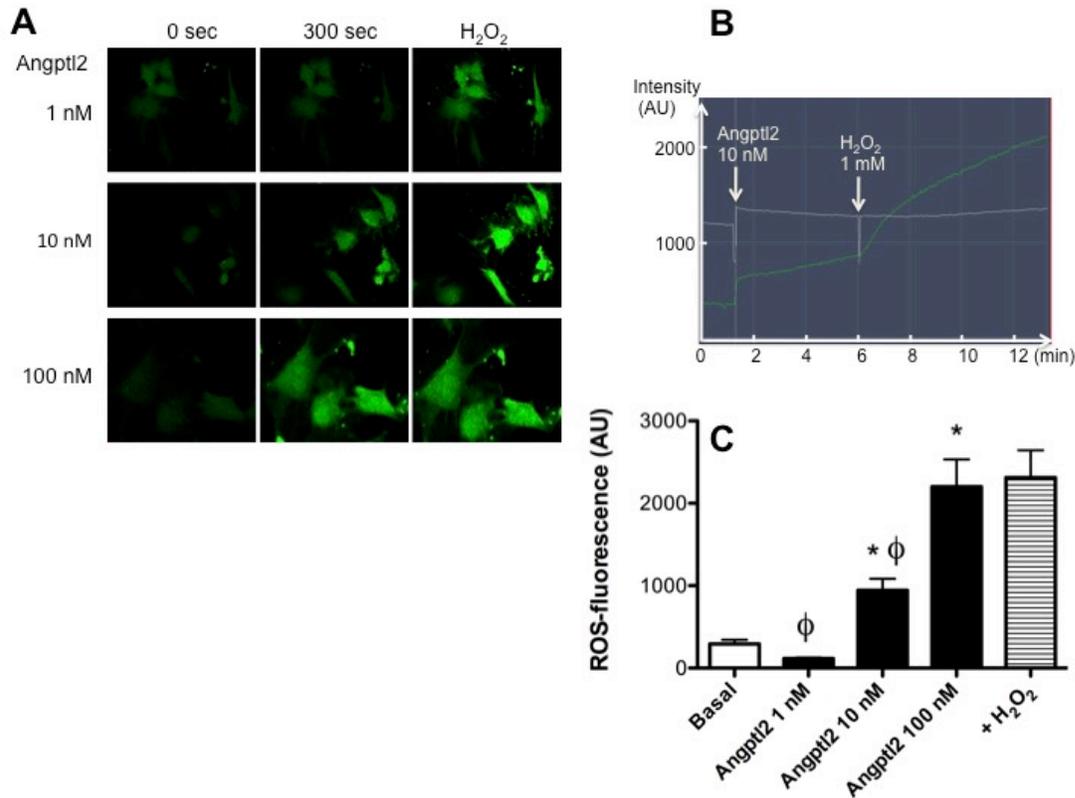


Figure 4 : L'angptl2 induit une production rapide et massive de DRO dans les HUVEC (A) Images de microscopie confocale montrant le niveau de fluorescence au DCFDA induite par les DRO avant (0 sec) et après (300 sec) l'ajout d'angptl2 recombinante sur des HUVECs à 1, 10 et 100 nM. Une forte dose (1mM) d'H₂O₂ a été ajoutée par la suite pour montrer le niveau maximal de fluorescence détectable. (B) Suivi de la fluorescence au cours du temps durant 5 min après l'ajout de 10 nM d'angptl2 recombinante, puis 7 min après l'ajout du H₂O₂. (C) Les effets de l'angptl2 recombinante sur la fluorescence au DCFDA induite par les DRO est dose-dépendante. À 100 nM, l'angptl2 induit une production de DRO comparable à celle induite par le H₂O₂. Les données sont des moyennes ± erreur-type de la moyenne, 2 à 3 itérations, et plus de 6 cellules observées individuellement pour chaque condition. *: p<0.05 versus la condition basale; φ: p<0.05 versus H₂O₂.

1.7.4. Voies de signalisation connues

Le récepteur de l'angptl2 n'ayant pas encore été clairement identifié, les voies de signalisation responsables de ses différents effets n'ont pas été élucidées avec certitude. Certaines voies ont toutefois été caractérisées.

L'angptl2 active la voie du facteur de croissance transformant- β (« transforming growth factor, TGF- β) / Smad pour induire la fibrose et l'hypertrophie du *ligamentum flavum*. En effet, l'étirement *ex vivo* du *ligamentum flavum* entraîne l'expression d'angptl2 et active la voie de signalisation TGF- β /Smad; lorsque l'expression d'angptl2 est bloquée par siRNA, la voie TGF- β /Smad est bloquée (Nakamura, Okada et al. 2014). La voie phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K)/Akt pourrait être responsable des effets anti-apoptotiques (Kubota, Oike et al. 2005). Dans les cellules endothéliales, l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ semble relayer les effets pro-inflammatoires de l'angptl2, en provoquant la translocation nucléaire du facteur de transcription NF κ B, qui augmente la transcription de gènes inflammatoires tels que l'IL-6 et le TNF- α , et les molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1 (Tabata, Kadomatsu et al. 2009). La transcription du gène codant pour l'angptl2 est augmentée par le facteur de transcription activé 2 (« activated transcription factor 2 », ATF2) et par le facteur de transcription c-Jun, qui sont tous deux activés en présence de DRO (Aoi, Endo et al. 2014). Or, l'activation de NF- κ B par l'angptl2 pourrait causer une production de DRO (Aoi, Endo et al. 2014), et donc l'angptl2 pourrait induire indirectement la transcription de son propre gène (Aoi, Endo et al. 2011, Endo, Nakano et al. 2012, Aoi, Endo et al. 2014). D'autres données de notre laboratoire renforcent cette notion d'implication des DRO dans l'expression de l'angptl2 : l'ajout de l'antioxydant NAC sur des cellules endothéliales isolées de patients atteints de maladie coronarienne a significativement réduit l'expression d'angptl2 (Farhat, Thorin-Trescases et al. 2013). À l'inverse, dans un environnement pro-oxydant comme chez les fumeurs, l'expression d'angptl2 dans les cellules endothéliales était significativement augmenté (Farhat, Thorin-Trescases et al. 2008). De plus, dans les artères de souris isolées, la dysfonction endothéliale induite par l'angptl2 est prévenue en présence de NAC (Yu, Luo et al. 2014). Les DRO semblent donc être importants dans la signalisation de l'angptl2, mais également dans celle qui contrôle l'expression d'angptl2.

Finalement, la p38MAPK est impliquée dans l'activité pro-métastatique de l'angptl2 dans l'ostéosarcome (Odagiri, Kadomatsu et al. 2014), mais pas dans ses effets anti-apoptotiques dans les cellules endothéliales (Kubota, Oike et al. 2005). La voie de signalisation p38 est généralement activée dans la signalisation de réponse aux différents stress auxquels les cellules font face, tels que l'irradiation, le choc thermique, l'exposition aux rayons ultraviolets, les cytokines proinflammatoires, le stress osmotique (Obata, Brown et al. 2000).

L'angiopoïétin-like 2 exerce donc plusieurs rôles physiologiques et pathophysiologiques, étant pro-inflammatoire et pro-oxydant. Dans les cellules endothéliales, l'inflammation et le stress oxydant sont impliqués dans le développement de la dysfonction endothéliale. Ces trois facteurs sont intimement interreliés et tous impliqués dans la pathogénèse de l'athérosclérose. Il est donc permis de croire que le rôle pro-athérosclérotique de l'angptl2 passe par son rôle pro-inflammatoire qui agit en synergie avec son effet pro-oxydant. Ce rôle pro-oxydant a très peu été étudié, et fait l'objet de ce mémoire de maîtrise.

2. Hypothèse et objectifs de l'étude

2.1. Hypothèse

L'angptl2 est une glycoprotéine pro-inflammatoire, pro-athérosclérotique et dont l'expression est favorisée dans un environnement pro-oxydant. Des données préliminaires du laboratoire montrent que l'angptl2 stimule de façon aiguë la production de DRO dans des cellules endothéliales en culture, et induit une dysfonction endothéliale *ex vivo* qui peut être prévenue par le NAC.

Nous émettons l'hypothèse que l'angptl2 cause un stress oxydant chronique, d'abord en induisant en aigu la production de DRO, puis en inhibant la voie antioxydante protectrice endogène Nrf2.

2.2. Objectifs spécifiques

- Étudier les variations de l'expression de Nrf2, de son inhibiteur Keap-1 et de son activateur DJ-1 dans les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) en présence d'angptl2 recombinante, à court terme (10 min) et à plus long terme (24 h).
- Étudier le rôle des DRO dans la signalisation d'angptl2 en les neutralisant avec l'ajout d'un antioxydant exogène, le NAC.
- Étudier les variations de l'activité de la p38MAPK (phosphorylation) en réponse à l'angptl2.

3. Matériel et méthodes

3.1. Culture cellulaire

Nous avons utilisé des cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC) (Lonza) au passage 4, décongelées au passage 3 dans un pétri 100 x 20 mm (Sarstedt) dans le milieu de culture EGM-2 10% sérum de veau fœtal (« fetal bovine serum », FBS), préparé à partir de EBM-2 Basal Medium (Lonza) auquel ont été ajoutés les facteurs de croissance de la trousse EGM-2 SingleQuot Kit et de FBS 10%. Les passages de cellules ont ensuite été effectués en rinçant au PBS, puis en appliquant 1 mL de 0,05% Trypsine-EDTA (Gibco) à 37°C pendant 1 minute, qui a ensuite été neutralisée avec 9 mL de milieu EGM-2 10% FBS. Les cellules ont ensuite été réparties dans les différents puits des plaques de 6 puits (Sarstedt). Une fois arrivées à 80% de confluence, les cellules ont été exposées au milieu sans sérum EBM-2 1% Penicillin-Streptomycin (P-S) pendant 16h (pour les cellules stimulées 10 minutes) ou 4h (pour les cellules stimulées 24h). Ce milieu a ensuite été aspiré, puis remplacé par le milieu sans sérum avec ou sans Angptl2 recombinante 100 nM, et avec ou sans l'antioxydant NAC (Sigma) 10 µM. La solution stock de NAC a été dissoute dans le milieu sans sérum EBM-2 puis conservée à -20°C. La concentration d'angptl2 recombinante (100 nM) a été choisie en fonction de son effet maximal sur la production de DRO (Figure 4).

La procédure de la préparation de la solution stock d'Angptl2 recombinante dans notre laboratoire est détaillée dans l'article méthodologique du Dr. Farhat (Farhat, Mamarbachi et al. 2014). Brièvement, les cellules « Human Embryonic Kidney » 293 (HEK) ont été transfectées avec le gène de l'angptl2 recombinante, et produisaient donc l'angptl2 contenant de la GST, qui sécrétaient l'angptl2 –GST recombinante dans le milieu de culture. Ce milieu a été récolté tous les 2-3 jours, la protéine a été isolée par chromatographie liquide de protéine rapide (« Fast protein liquid chromatography », FPLC) sur une colonne GST, concentrée par filtration centrifuge et purifiée par dialyse. Durant cette procédure, le tampon utilisé lors de la dialyse a été récolté, et par la suite utilisé comme contrôle négatif de l'angptl2 : les cellules qui ne sont pas exposées à l'angptl2 sont exposées au tampon de dialyse.

3.2. Extraction protéique

La trousse NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit (Thermo Scientific) a été utilisée afin de séparer les extraits protéiques du cytoplasme de ceux du noyau. Aux trois solutions (Cytoplasmic Extraction Reagent I ou CER I, CER II, et Nuclear Extraction Reagent ou NER), 1 μ M de microcystine (Cayman Chemical) et 1X de Halt™ Protease Inhibitor Cocktail (provenant du Protease Inhibitor Cocktail Kit, Thermo Scientific) ont été ajoutés.

Les cellules ont été exposées à 100 μ L par puits de CER I 10 minutes sur glace, pendant lesquelles elles ont été décollées du puits à l'aide d'un grattoir à cellules (Sarstedt) et transférées dans des tubes. Après un vortex, 5,5 μ L de CER II ont été ajoutés avant une incubation d'une minute sur glace. Après une centrifugation de 5 minutes à 16000 x g à 4°C, le surnageant a été prélevé, qui contient alors la fraction protéique cytoplasmique. Celle-ci a ensuite été nettoyée de tous les débris cellulaires à l'aide d'une centrifugation additionnelle de 10 minutes à 16000 x g à 4°C.

Le culot a ensuite été rincé (et non resuspendu) avec 20 μ L de CER I pour enlever les résidus de fraction cytoplasmique, puis centrifugé à nouveau. Il a ensuite été resuspendu dans 20 μ L de NER en laissant agir 40 minutes sur glace avec un vortex toutes les 10 minutes. Enfin, une dernière centrifugation de 10 minutes nous a donné dans le surnageant la fraction protéique nucléaire.

Les échantillons protéiques cytosoliques et nucléaires ont été stockés à -20°C.

3.3. Immunobuvardage de type Western

Les concentrations en protéines des échantillons ont été mesurées par la méthode de Bradford (Biorad). Pour chaque gel, nous avons eu besoin de 20 μ g par échantillon. Cette étape a été effectuée seulement sur les échantillons cytoplasmiques, car les échantillons nucléaires n'étaient pas suffisamment riches en protéines pour permettre de faire un Bradford avant l'immunobuvardage. Dans leur cas, on a utilisé l'intégralité des échantillons (20 μ L) pour chaque expérience. Après avoir prélevé 20 μ g par échantillon, du tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 20 mM β -glycérophosphate, 20 mM fluorure de sodium, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 % Triton, 1 μ M microcystine) a été ajouté de façon à ce que les

volumes soient les mêmes dans chaque tube. Ensuite, le tampon de chargement 4X (loading buffer) (0,2 M Tris-HCl, 10 % SDS, 2 M β -mercaptoéthanol, 41,2 % sucrose, 4 mM EGTA, 0,03 % bleu de bromophénol) a été ajouté avant d'incuber les échantillons durant 10 minutes à 98°C.

Afin d'obtenir un n=1 pour chaque protéine d'intérêt, on a eu besoin de deux gels identiques dans lesquels ont été chargés les mêmes extraits cytoplasmiques, et un troisième gel pour y charger les extraits nucléaires. Les trois migrations ont été faites dans des gels dénaturants 15 % acrylamide SDS-PAGE (0,375 M Tris, 0,1 % SDS, 15 % acrylamide, 0,1 % N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine /TEMED, 1 % ammonium persulfate) précédés par des gels de concentration (5 % acrylamide) à 200 V dans un tampon de migration (running buffer) (25 mM Trizma Base, 192 mM glycine, 0,1 % SDS) jusqu'à ce que le front de migration sorte du gel.

Une fois les protéines séparées en fonction de leur poids moléculaire, elles ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,45 μ m (Biorad) en appliquant un courant de 100 V pendant 90 minutes dans un tampon de transfert (25 mM Trizma base, 192 mM glycine, 20 % méthanol, 0,1 % SDS).

Lorsque le transfert s'est terminé, les protéines ont été fixées sur la membrane grâce à une incubation à température ambiante durant 10 minutes avec agitation faible dans une solution de fixation (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,05 % glutaraldéhyde, 0,1 % Tween).

Les membranes ont été brièvement rincées dans du TBST (Tris Buffered Saline with Tween) (25 mM Trizma base, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, pH=7,5) puis incubées 1 minute dans une solution de Rouge Ponceau (0,1 % Ponceau S (Aldrich Chemicals), 5 % acide acétique) afin de colorer les protéines de façon non spécifique. Cette étape permet de s'orienter lors de l'étape suivante qui consiste à couper les membranes avec une lame de scalpel de façon à utiliser simultanément des anticorps primaires qui reconnaissent des protéines de poids moléculaires différents. Les membranes contenant les protéines cytoplasmiques ont été coupées à quatre endroits : à 75 kDa, 50 kDa, entre 37 et 25 kDa, et à

20 kDa. La membrane contenant les protéines nucléaires a également été coupée à quatre endroits : à 75 kDa, 50 kDa, 25 kDa, et 20 kDa.

Toutes ces membranes ont ensuite été incubées dans la solution de blocage (TBST, 5% lait déshydraté, pH=7,3), afin de réduire les liaisons non-spécifiques entre les anticorps primaires et la nitrocellulose, durant 2 heures à température ambiante avec agitation faible.

Les membranes ont par la suite été exposées aux différents anticorps primaires dilués dans la solution de blocage durant 18 heures à 4°C avec une faible agitation. Les protéines étudiées par immunobuvardage de type Western dans cette étude sont Keap-1 (69 kDa), Phospho-p38 MAPK (38 kDa), p38MAPK (38 kDa), Phospho-Hsp27 (27 kDa), Hsp27 (27 kDa), Nrf2 (57 kDa) et DJ-1 (19,9 kDa). Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

Pour les protéines cytoplasmiques :

- Keap-1 (Santa Cruz, #sc-15246) dilution 1 : 100
- Phospho-p38 MAPK (Cell Signalling, #9211) dilution 1 : 2 000
- p38 MAPK (Cell Signalling, #8690) dilution 1 : 20 000
- Phospho-Hsp27 (Cell Signalling, #2401) dilution 1 : 2000
- Hsp27 (Enzo Life Sciences, #ADI-SPA-803) dilution 1 : 30 000

Pour les protéines nucléaires :

- Nrf-2 (Santa Cruz, #sc-722) dilution 1 : 2 000
- DJ-1 (Cell Signalling, #2134) dilution 1 : 100

Les membranes Phospho-p38 MAPK, p38 MAPK et Nrf2 ont été plus tard « strippées » afin d'y appliquer d'autres anticorps primaires reconnaissant des protéines codées par des gènes ménagers ou « housekeeping genes » qui serviront de témoin de charge (« loading control ») : la protéine Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) pour les membranes cytoplasmiques et la Nucléoporine p62 (Nup62) pour la membrane nucléaire. Le « stripping » consiste en deux incubations de 15 minutes dans une solution 0,2 M NaOH avec

agitation, avec entre les deux un rinçage de 5 minutes au TBST. Les anticorps primaires utilisés à cette étape sont les suivants :

- GAPDH (Life Technologies/Ambion, #AM4300) 1 : 1 000 000
- Nup62 (BD Transduction Laboratories, #610497) 1 : 2000

Une fois l'incubation avec les anticorps primaires terminée, les membranes ont été rincées au TBST 3 fois 5 minutes à température ambiante avec agitation forte. Elles ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires adéquats couplés à la peroxydase de raifort (« horseradish peroxidase ») dilués 1 : 10 000 dans la solution de blocage durant 2 heures à température ambiante avec agitation faible. Les anticorps secondaires utilisés sont les suivants :

- Goat anti-rabbit pour p38MAPK, Phospho-p38MAPK, Hsp27, Phospho-Hsp27, Nrf2 et DJ-1
- Goat anti-mouse pour GAPDH et Nup62
- Donkey anti-goat pour Keap-1

Après cette incubation avec les anticorps secondaires, une autre étape de rinçage au TBST (3 fois 5 minutes) a permis d'enlever les anticorps liés de manière non-spécifique avant d'incuber la membrane durant 1 minute dans une solution de « Enhanced Chemiluminescence Substrate » (ECL, Perkin Elmer). Les membranes ont par la suite été recouvertes d'une feuille d'acétate de cellulose puis d'un film (Hyblot CL, Harvard Apparatus Canada), qui a été développé, fixé et scanné. Les fichiers ont été analysés à l'aide du logiciel Quantity One (Bio-Rad). Le scanneur utilisé nous a donné pour chaque bande une intensité de signal (appelée « volume ») qui est quantitative car l'appareil est calibré.

Afin de pouvoir comparer les films de deux « n » différents entre eux, la valeur de « 1 » a été assignée au volume de la bande correspondant à l'échantillon 10 min contrôle (sans angptl2 et sans NAC). Les données de chaque bande correspondent donc aux valeurs de volume relatives aux échantillons 10 min contrôle.

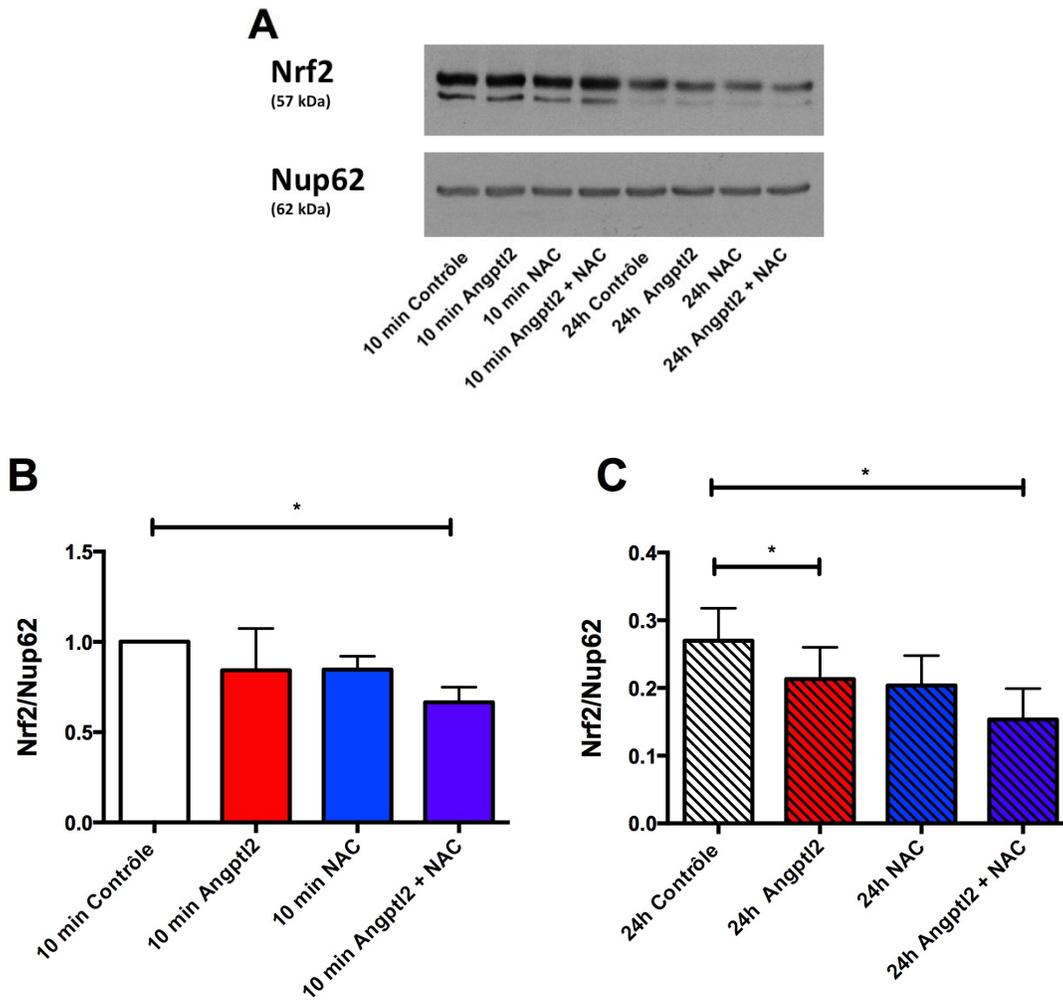
3.4. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism 6. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur-type de la moyenne. Les tests statistiques utilisés sont des tests de t pairés pour comparer les valeurs au sein d'un même groupe de durée de traitement, comme par exemple 10 min contrôle vs 10 min Angptl2 + NAC. Pour comparer deux durées de traitement entre elles, comme par exemple 10 min contrôle vs 24 h contrôle, on a utilisé des tests de t non-pairés.

4. Résultats

4.1. Les effets de l'angptl2 et NAC sur les niveaux de Nrf2 nucléaires

Les niveaux nucléaires de Nrf2 ne sont pas affectés après 10 min d'exposition à l'angptl2 (Figure 5B), mais ils sont diminués après 24 h ($p < 0,05$) (Figure 5C). Après 10 min et 24 h de stimulation à l'angptl2, Nrf2 diminue en présence de NAC et d'angptl2, par rapport au contrôle non traité ($p < 0,05$) (Figures 5B et 5C). Le NAC seul n'a aucun effet, après 10 min et 24 h (Figures 5B, 5C, et 5E). Les niveaux de Nrf2 sont plus faibles après 24 h qu'après 10 min de stimulation, dans toutes les conditions (Figures 5D et 5E). Un exemple de gel est illustré sur la Figure 5A.



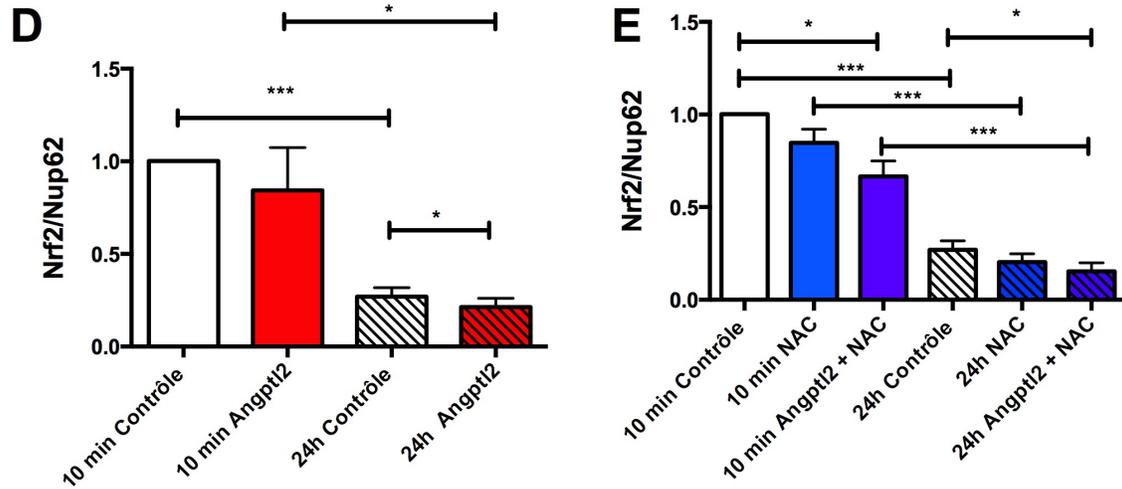
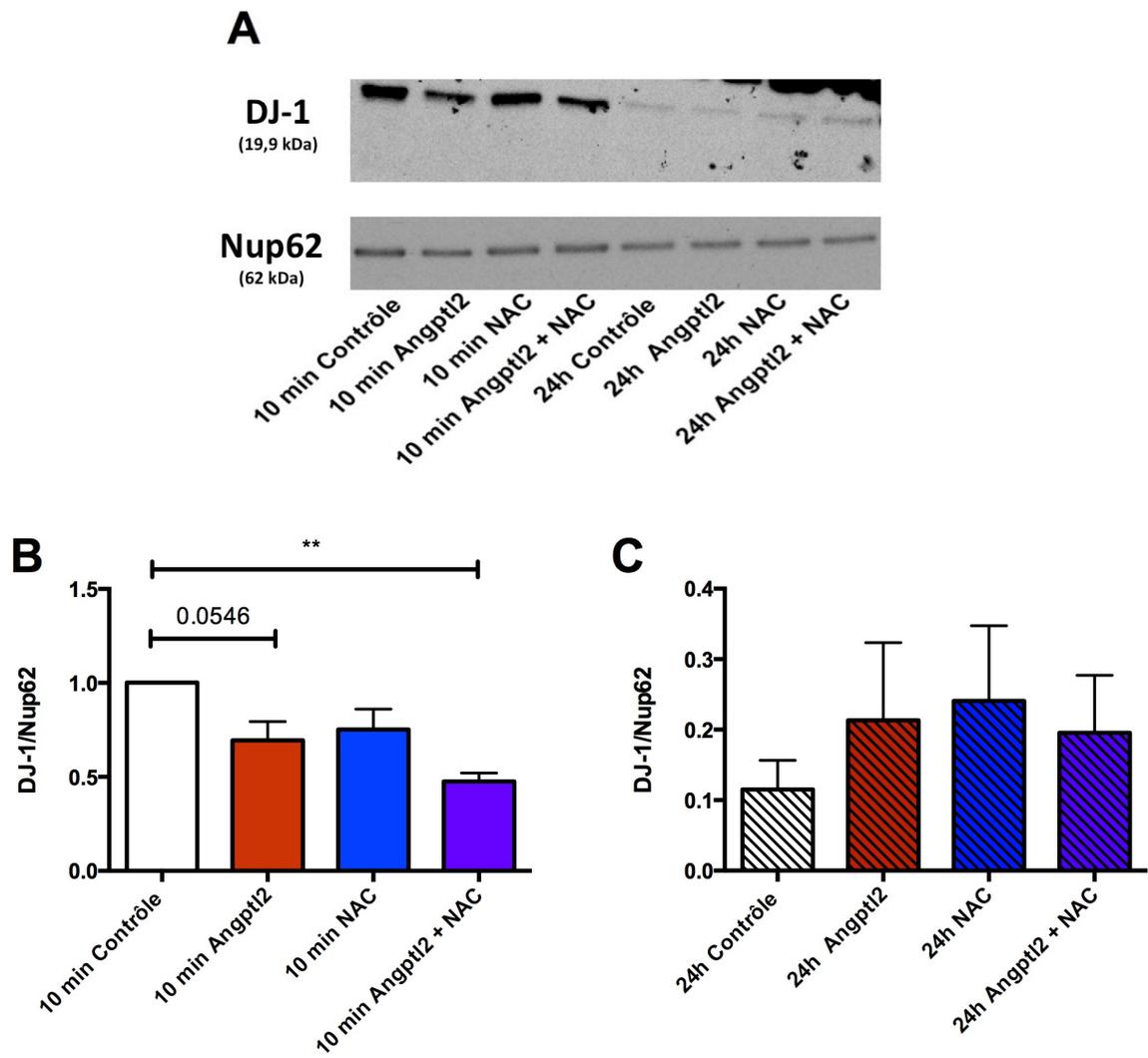


Figure 5. Effets de l'angptl2 et NAC sur les niveaux nucléaires de Nrf2, mesurés par immunobuvardage de type Western, normalisés sur Nup62. (A) Exemple de film représentatif des résultats, montrant l'intensité du signal de Nrf2 et de Nup62. L'impact de 10 min (B) et de 24 h (C) de traitement avec l'angptl2 est illustré. Les différences entre 10 min et 24 h avec ou sans angptl2 (D) et les effets du NAC à 10 min et 24 h (E) sont également présentés. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur type de la moyenne, $n=5$, valeurs p calculées avec test de t pairé pour les figures B et C, et avec le test de t non pairé pour les figures D et E, pour comparer entre 10 min et 24 h. (* : $p<0,05$; *** : $p<0,001$).

4.2. Les effets de l'angptl2 et NAC sur DJ-1

DJ-1 est la protéine stabilisatrice de Nrf2, qui permet sa translocation vers le noyau. L'expression de DJ-1 pourrait donc, en théorie, suivre celle de Nrf2.

L'angptl2 n'a pas d'effet statistiquement significatif sur les niveaux nucléaires de DJ-1 après 10 min ou 24 h de stimulation, bien qu'il y ait une tendance à la diminution de DJ-1 après 10 min ($p=0,0546$) (Figures 6A, 6B et 6C). Seul, le NAC n'a aucun d'effet à 10 min et 24 h (Figure 6E). Combinés, l'angptl2 et le NAC diminuent DJ-1 après 10 min ($p<0,01$) mais pas après 24 h (Figures 6B et 6C). Les niveaux de DJ-1 sont plus faibles après 24 h qu'après 10 min de stimulation, dans toutes les conditions ($p<0,05$) (Figures 6A, 6D et 6E).



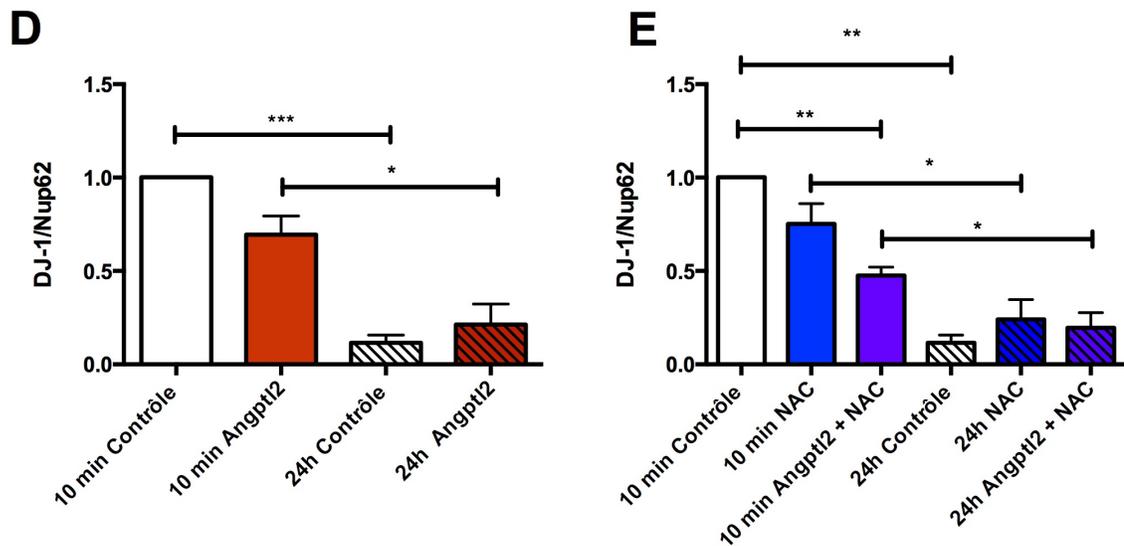
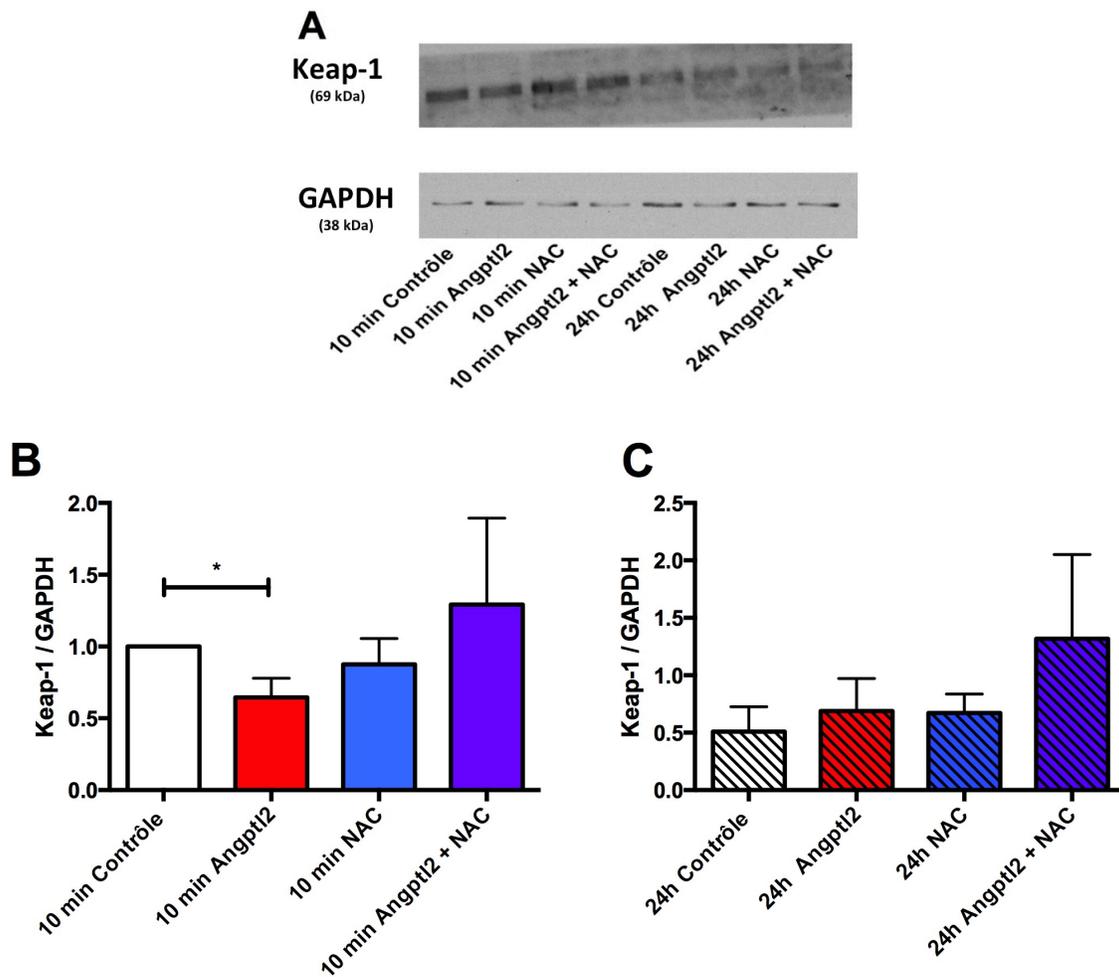


Figure 6. Effets de l'angpt12 et NAC sur les niveaux nucléaires de DJ-1, mesurés par immunobuvardage de type Western, normalisés sur Nup62. (A) Exemple de film représentatif des résultats, montrant l'intensité du signal de DJ-1 et de Nup62. L'impact de 10 min (B) et de 24 h (C) de traitement avec l'angpt12 est illustré. Les différences entre 10 min et 24 h avec ou sans angpt12 (D) et les effets du NAC avec ou sans angpt12 à 10 min et 24 h (E) sont également présentés. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur type de la moyenne, $n=4$, valeurs p calculées avec test de t pairé pour les figures B et C, et avec le test de t non pairé pour les figures D et E pour comparer entre 10 min et 24 h. (* : $p<0,05$; ** : $p<0,01$; *** : $p<0,001$)

4.3. Les effets de l'angptl2 et NAC sur Keap-1

Keap-1 est une protéine cytosolique qui inhibe Nrf2 en absence de stress oxydant en la dirigeant vers la dégradation protéasomale. L'expression cytosolique de Keap-1 pourrait donc, en théorie, varier de façon inverse aux niveaux nucléaires de Nrf2.

Les niveaux cytosoliques de Keap-1 semblent être diminués en présence d'angptl2 par rapport au contrôle non traité après 10 min de stimulation ($p < 0,05$) (Figure 7B), mais pas après 24 h (Figure 7C). Le NAC seul, et le NAC en présence d'angptl2 n'ont aucun d'effet après 10 min et 24 h de stimulation (Figures 7B et 7C). Les niveaux de Keap-1 sont plus faibles après 24 h qu'après 10 min de stimulation, pour les conditions contrôles seulement ($p < 0,05$) (Figures 7D et 7E).



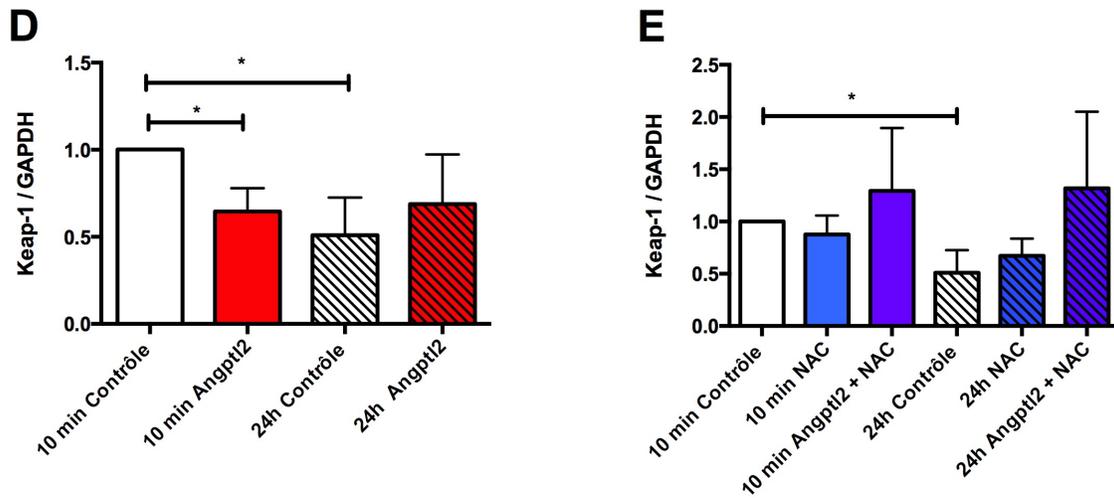
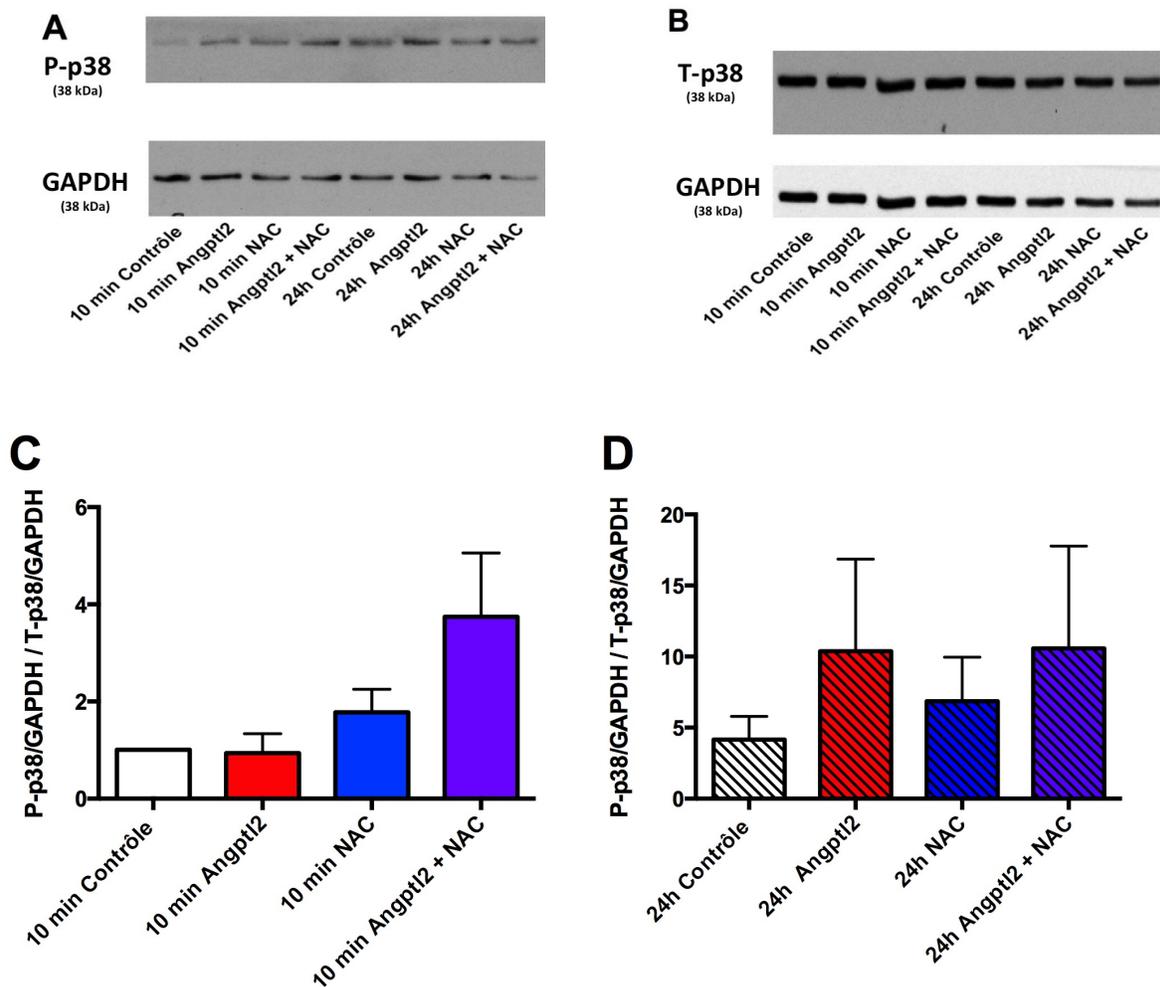


Figure 7. Effets de l'angptl2 et NAC sur les niveaux cytosoliques de Keap-1, mesurés par immunobuvardage de type Western, normalisés sur GAPDH. (A) Exemple de film représentatif des résultats, montrant l'intensité du signal de Keap-1 et de GAPDH. L'impact de 10 min (B) et de 24 h (C) de traitement avec l'angptl2 est illustré. Les différences entre 10 min et 24 h avec ou sans angptl2 (D) et les effets du NAC avec ou sans angptl2 à 10 min et 24 h (E) sont également présentés. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur type de la moyenne, $n=6$, valeurs p calculées avec test de t pairé pour les figures B et C, et avec le test de t non pairé pour les figures D et E pour comparer entre 10 min et 24 h. (* : $p < 0,05$)

4.4. Les effets de l'angptl2 et NAC sur p38MAPK

La p38MAPK est une protéine impliquée dans plusieurs réponses cellulaires face au stress, et est phosphorylée lorsqu'elle est activée. Or Nrf2 peut être phosphorylée par la p38MAPK. L'angptl2 pourrait, en théorie, avoir un effet sur Nrf2 à travers p38MAPK.

L'angptl2 seul, le NAC seul, et l'angptl2 en présence du NAC n'ont eu aucun effet statistiquement significatif sur la phosphorylation de p38MAPK (Figures 8A, B, C, D, E, F). La phosphorylation de p38MAPK ne varie pas de façon statistiquement significative entre 10 min et 24 h, dans aucune des conditions (Figures 8E et 8F).



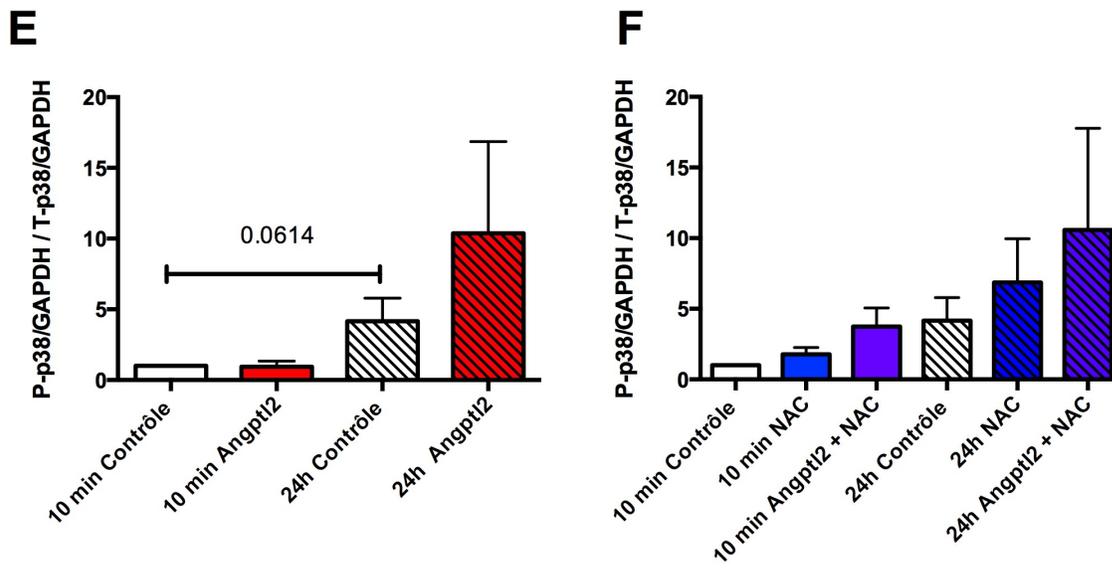
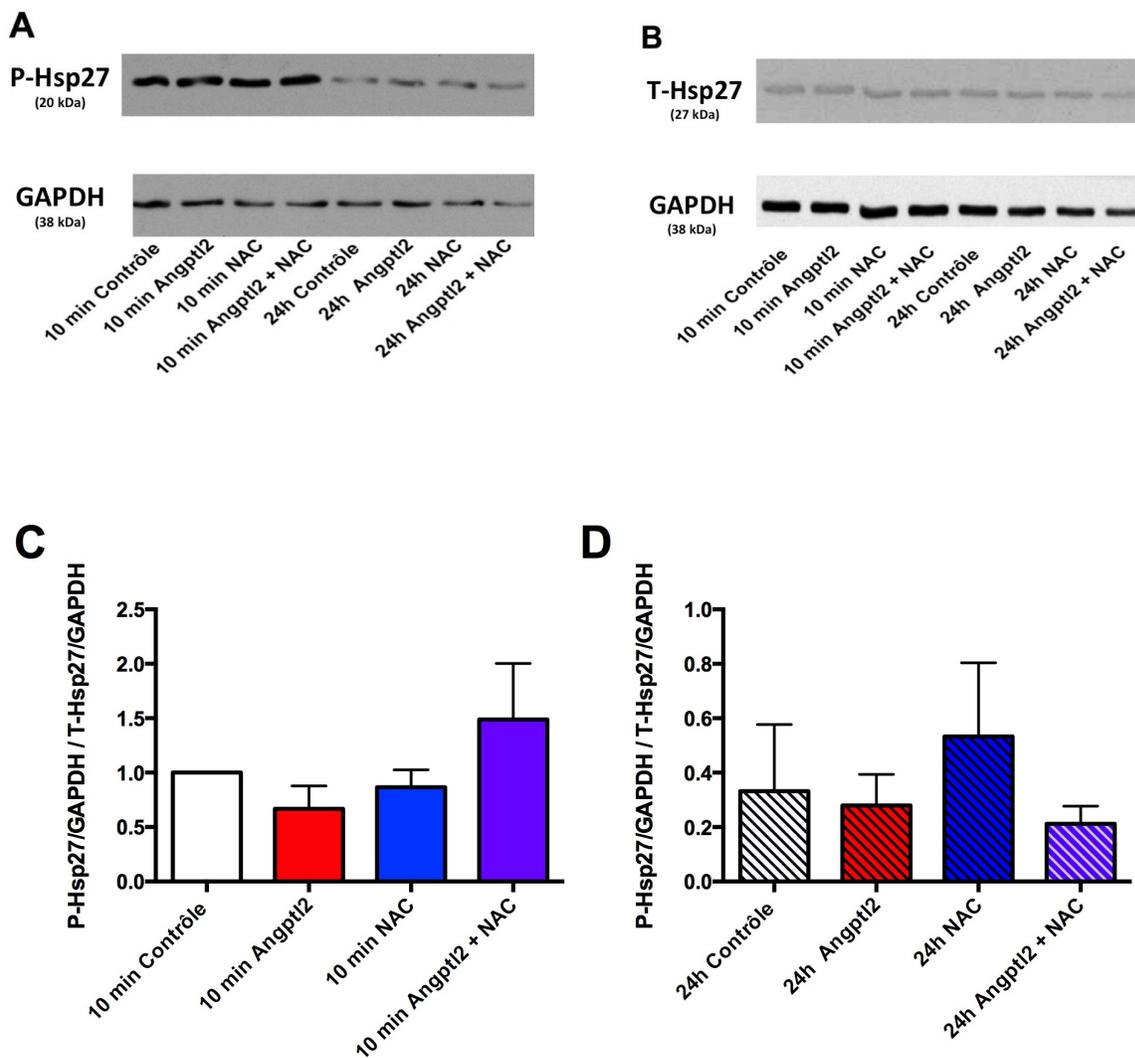


Figure 8. Effets de l'angptl2 et NAC sur les niveaux cytosoliques de P-p38MAPK / T-p38MAPK, mesurés par immunobuvardage de type Western et normalisés sur leurs GAPDH respectifs. (A-B) Exemple de film représentatif des résultats, montrant l'intensité du signal de P-p38, T-p38, et les GAPDH respectifs. L'impact de 10 min (C) et de 24 h (D) de traitement avec l'angptl2 est illustré. Les différences entre 10 min et 24 h avec ou sans angptl2 (E) et les effets du NAC avec ou sans angptl2 à 10 min et 24 h (F) sont également présentés. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur type de la moyenne, n=6, valeurs p calculées avec test de t pairé pour les figures C et D, et avec le test de t non pairé pour les figures E et F pour comparer entre 10 min et 24 h. (* : p<0,05).

4.5. Les effets de l'angpt12 et NAC sur Hsp27

Hsp27 est une « heat shock protein » activée lorsqu'elle est phosphorylée par la p38MAPK. Nous avons étudié la phosphorylation de Hsp27 afin de vérifier si, lorsque la p38MAPK était activée, une de ses protéines cibles (Hsp27) serait phosphorylée.

L'angpt12 seul, le NAC seul, et le NAC en présence d'angpt12 n'ont eu aucun effet sur la phosphorylation d'Hsp27 après 10 min (Figure 9C) et après 24 h de stimulation (Figure 9D). La phosphorylation de Hsp27 diminue entre les contrôles 10 min et 24 h ($p < 0,05$) (Figure 9E et 9F), de même qu'entre les conditions angpt12+NAC à 10 min et 24 h ($p < 0,05$) (Figure 9F). Un exemple de gels est illustré sur les Figures 9A et 9B.



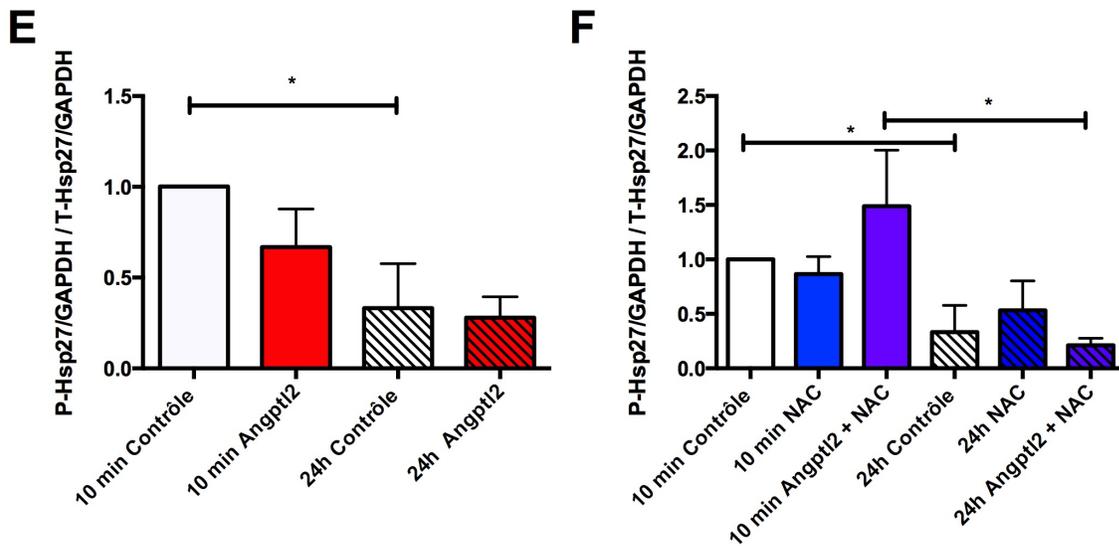


Figure 9. Effets de l'angpt12 et NAC sur les niveaux cytosoliques de P-Hsp27 / T-Hsp27, mesurés par immunobuvardage de type Western, normalisés sur leurs GAPDH respectifs. (A-B) Exemple de film représentatif des résultats, montrant l'intensité du signal de P-Hsp27, T-Hsp27 et leurs GAPDH respectifs. L'impact de 10 min (C) et de 24 h (D) de traitement avec l'angpt12 est illustré. Les différences entre 10 min et 24 h avec ou sans angpt12 (E) et les effets du NAC avec ou sans angpt12 à 10 min et 24 h (F) sont également présentés. Les résultats sont présentés en moyenne \pm erreur type de la moyenne, $n=5$, valeurs p calculées avec test de t pairé pour les figures C et D, et avec le test de t non pairé pour les figures E et F pour comparer entre 10 min et 24 h. (* : $p<0,05$).

5. Discussion

Ce projet de recherche avait pour but d'étudier les effets de l'angptl2 sur la voie de défense antioxydante Nrf2 dans les cellules endothéliales. Il existe dans la littérature très peu d'études qui se sont penchées sur la question du stress oxydant et des DRO dans le contexte de l'angptl2, et aucune étude ne mentionne Nrf2. À travers cette discussion nous allons passer à travers les résultats afin de tenter de trouver une réponse aux questions que nous nous étions posées. Étant donné les résultats, mitigés, détaillés dans la section précédente, l'hypothèse de travail sera réétudiée. Ensuite, comme toutes les études scientifiques, celles qui ont été conduites dans le cadre de ce projet comportent des limites, qui seront explorées vers la fin de cette discussion.

5.1. L'angptl2 a-t-il un effet sur la voie antioxydante Nrf2?

L'angptl2 à 10 min n'affecte pas la translocation nucléaire de Nrf2, mais la diminue à 24 h (Figure 5C). Il semblerait donc que la voie Nrf2 ne soit pas affectée par l'angptl2 en aigu, mais qu'elle soit légèrement inhibée par une stimulation à plus long terme.

La translocation nucléaire de Nrf2 est stimulée par un équilibre redox pro-oxydant, qui est détecté à la fois par Keap-1 et par DJ-1, et qui résulte en une inhibition de l'interaction entre Keap-1 et Nrf2, permettant ainsi à Nrf2 d'entrer dans le noyau et d'activer la transcription des gènes antioxydants de l'ERA (McMahon, Thomas et al. 2006, Wilson 2011). Or, des données préliminaires de notre laboratoire indiquent que la stimulation à l'angptl2, avec la dose de 100 nM utilisée dans cette étude, induit une production massive et instantanée de DRO, comparable à celle induite par une forte dose de H₂O₂ (Farhat et al., données non publiées) (Figure 4). On pourrait donc s'attendre à ce que cette production de DRO en aigu soit suffisante pour activer la voie Nrf2 et promouvoir sa translocation nucléaire. Pourtant, nos résultats vont à l'encontre de cette hypothèse, ne montrant pas d'effet aigu de l'angptl2 sur l'expression nucléaire de Nrf2 après 10 min de stimulation (Figure 5B).

Les expériences avec le NAC avaient pour but de voir si les effets potentiels de l'angptl2 sur Nrf2 étaient prévenus par l'ajout d'un antioxydant, ce qui aurait démontré l'implication des DRO dans cette voie de signalisation. Le NAC en présence d'angptl2 n'a présenté aucune différence par rapport à la condition traitée à l'angptl2 seul, mais cette condition (NAC+angptl2) montre une diminution des niveaux de Nrf2 nucléaires par rapport au contrôle non traité, après une stimulation aiguë et chronique. Dans les conditions stimulées en aigu, ce dernier résultat (Contrôle vs NAC+angptl2), à lui seul, ne présente pas à mes yeux de valeur particulière puisqu'il n'y a pas de différences avec les autres conditions. Par contre, en stimulation chronique, l'angptl2 seul inhibe Nrf2, mais exerce le même effet en présence de NAC. Les DRO ne seraient donc pas impliqués dans l'effet inhibiteur de l'angptl2 chronique sur la voie Nrf2. Nous pensons que l'angptl2 pourrait causer une production de DRO qui à long terme finirait par représenter un stress oxydant trop important pour que la voie Nrf2 soit en mesure de le rééquilibrer. Le fait que le NAC n'ait eu aucun effet indique que cela ne semble pas être le cas, et donc que l'angptl2 inhibe la voie Nrf2 *via* une autre voie de signalisation.

On observe une diminution importante des niveaux nucléaires de Nrf2 entre toutes les conditions à 10 min et les conditions correspondantes à 24 h. Cette diminution semble témoigner du fait qu'il existe des limites dans le modèle utilisé, dans lequel les cellules sont dans un environnement de stress, possiblement un stress oxydant, qui inhibe la voie Nrf2. Pourtant, l'ajout du NAC, qui est un antioxydant, n'empêche pas cette diminution de Nrf2, indiquant que celle-ci peut ne pas être reliée au stress oxydant. Toutefois, il faut considérer le fait que les conditions « 10 min » sont privées de sérum pendant 16 h avant de subir une stimulation de 10 min, alors que les conditions « 24 h » sont privées de sérum pendant 4 h avant de subir une stimulation de 24 h pour un total de 28 h sans sérum. Ces deux conditions sont donc bien différentes et ne devraient pas être comparées directement l'une à l'autre.

5.2. Les effets de l'angptl2 sur Nrf2 sont-ils associés à un effet sur DJ-1?

DJ-1 est un stimulateur de la voie antioxydante Nrf-2 qui, en présence de DRO, inhibe l'interaction entre Keap-1 et Nrf2 et empêche la dégradation protéasomale de Nrf2. Il est possible que l'angptl2 ait un effet sur Nrf2 à travers un effet sur DJ-1, puisque certains résultats de notre étude sur DJ-1 sont corrélés avec ceux de Nrf2 : les niveaux nucléaires de DJ-1 sont plus faibles à 24 h qu'à 10 min, et ce dans toutes les conditions. De plus, la stimulation aigue à l'angptl2 en présence de NAC diminue les niveaux nucléaires de DJ-1 par rapport au contrôle non traité, de façon similaire à l'effet observé sur Nrf2.

Par contre, l'effet inhibiteur de l'angptl2 à 24 h sur Nrf2 n'est pas observé sur DJ-1, nous observons plutôt une tendance inverse (non significative). Somme toute, les niveaux nucléaires de DJ-1 n'évoluent pas exactement de la même façon que ceux de Nrf2.

Nous avons étudié l'expression de DJ-1 en mesurant les niveaux protéiques nucléaires de DJ-1, en se basant sur la logique que DJ-1 pourrait faciliter l'entrée de Nrf2 dans le noyau en s'associant physiquement avec Nrf2 (Farhat 2013). Mais à ma connaissance, il n'a jamais été expressément démontré que DJ-1 escortait physiquement Nrf2 dans le noyau, seulement qu'il inhibait son interaction avec Keap-1 dans le cytosol et augmentait ainsi les niveaux nucléaires et l'activité de Nrf2 (Clements, McNally et al. 2006). En effet, le groupe de Clements et al. a démontré que bien que DJ-1 soit nécessaire à la stabilité et à l'activité de Nrf2, DJ-1 ne co-précipitait pas avec Nrf2, ni avec Keap-1 (Clements, McNally et al. 2006). À ma connaissance, les niveaux nucléaires de DJ-1 n'ont jamais été étudiés auparavant, et ne reflètent donc pas nécessairement les niveaux nucléaires de Nrf2.

5.3. Les effets de l'angptl2 sur Nrf2 sont-ils associés à un effet sur Keap-1?

Keap-1 est une protéine cytosolique inhibitrice de la voie Nrf2 qui dirige Nrf2 vers la dégradation protéasomale en absence de DRO. Par conséquent, on pourrait s'attendre à ce qu'une diminution des niveaux nucléaires de Nrf2 (telle que celle observée après 24 h de stimulation à l'angptl2 par rapport au contrôle) puisse être corrélée à une augmentation des niveaux cytosoliques de Keap-1, mais cela ne semble pas être le cas. La stimulation aigue à

l'angptl2 diminue l'expression cytosolique de Keap-1, mais la stimulation chronique n'a pas eu d'effet. Au contraire, nous avons observé une inhibition de la voie Nrf2 après une stimulation chronique, mais pas aigue, avec l'angptl2. De plus, on observe des niveaux de Keap-1 cytosoliques plus faibles après 24 h qu'après 10 min de stimulation dans la condition contrôle non traitée, incompatibles avec la diminution des niveaux nucléaires de Nrf2.

Comme dans le cas de DJ-1, il n'a cependant pas été démontré que les niveaux cytosoliques de Keap-1 étaient influencés par le stress oxydant, mais uniquement que son interaction avec Nrf2 était inhibée en présence de stress oxydant. Le groupe de Watai et al. a démontré que la stimulation de fibroblastes embryonnaires murins au diéthyl maléate, un agent électrophile pro-oxydant (Kiely, Wang et al. 2002), n'a pas affecté les niveaux cytosoliques de Keap-1, mais a augmenté les niveaux nucléaires de Nrf2, tels que mesurés par immunobuvardage de type Western (Watai, Kobayashi et al. 2007). L'observation des niveaux cytosoliques de Keap-1 n'est donc pas forcément la méthode appropriée pour mesurer l'influence de Keap-1 sur la voie Nrf2, bien qu'on puisse concevoir le fait que l'expression de Keap-1 soit corrélée avec son activité.

5.4. La voie de signalisation responsable des effets de l'angptl2 sur Nrf2 pourrait-elle impliquer la p38MAPK?

Nous avons émis l'hypothèse que la p38MAPK était impliquée dans l'effet de l'angptl2 sur la voie Nrf2. En effet, l'activation de la p38MAPK augmente la phosphorylation de Nrf2 et favorise l'interaction entre Nrf2 et Keap-1 *in vitro*, ce qui inhibe la voie antioxydante Nrf2 (Keum, Yu et al. 2006). Nous avons démontré que la stimulation chronique à l'angptl2 avait un effet inhibiteur sur la voie Nrf2, et cet effet pourrait donc potentiellement impliquer la p38MAPK. Hsp27 est une « heat shock protein » activée lorsqu'elle est phosphorylée par la p38MAPK. Nous avons étudié la phosphorylation de Hsp27 afin de vérifier que la phosphorylation de la p38MAPK se traduirait par une augmentation de son activité, soit une augmentation de la phosphorylation de Hsp27.

Toutefois, nos résultats sur la phosphorylation de la p38MAPK présentent des variabilités trop élevées pour pouvoir conclure, mais il semble que l'angptl2 n'ait aucun effet

sur la phosphorylation de la p38MAPK. La phosphorylation de Hsp27 n'est pas plus convaincante : les seules conclusions que l'on peut tirer sont une diminution de la phosphorylation d'Hsp27 après 24 h de stimulation par rapport à 10 min, et ce dans les conditions contrôle et angptl2+NAC. Dans l'ensemble, ces résultats ne semblent pas indiquer une implication de la p38MAPK dans les effets de l'angptl2 sur la voie Nrf2.

5.5. Quelles sont les limites de cette étude?

Les limites de cette étude incluent d'abord l'activité biologique de la protéine recombinante synthétisée et purifiée dans le laboratoire. En effet, l'angptl2 recombinante produite n'est pas testée systématiquement avant les expériences, une étape qui devrait à l'avenir être incluse dans les protocoles d'utilisation de la protéine. Un exemple de test de la fonction de la protéine serait un QPCR mesurant les niveaux d'expression de gènes pro-inflammatoires normalement induits par l'angptl2 tels que l'IL-6 ou le TNF- α , tel que démontré précédemment dans le laboratoire par le Dr. Farhat (Farhat, Thorin-Trescases et al. 2013). La variabilité des résultats obtenus dans notre étude en utilisant différents lots d'angptl2 recombinante souligne l'importance de ce test. De plus, le processus de production de la protéine est long et offre un rendement relativement faible (Farhat, Mamarbachi et al. 2014), ce qui limite les quantités pouvant être utilisés pour des tests d'activité biologique. Cependant, puisque l'angptl2 recombinante n'est pas disponible commercialement, sauf dans des formes clivées et non glycosylées, qui sont donc biologiquement inactives, notre protéine recombinante est la seule alternative.

Une autre limite de l'étude se trouve dans les conditions de culture cellulaire, qui devraient peut-être inclure un contrôle des niveaux d'O₂, particulièrement important pour une étude sur le stress oxydant. Dans notre hypothèse nous avons évoqué le fait que l'angptl2 pourrait avoir un effet aigu différent de son effet chronique sur la voie Nrf2, nous avons donc choisi de stimuler les cellules durant 10 min avec de l'angptl2 recombinante et de considérer que cette durée représenterait une exposition aiguë. Par contre, pour l'effet chronique, il était techniquement impossible d'aller au delà de 24 h de stimulation, les cellules en culture ne supportant pas la privation de sérum durant plus de 28 h. Il est possible que dans un

environnement où les niveaux d'oxygène sont mieux contrôlés, on puisse poursuivre le traitement plus longtemps et observer un effet plus marqué de l'angptl2. En effet, l'incubateur utilisé dans le laboratoire n'est pas muni d'un dispositif de mesure et de contrôle de l'O₂ qui se situe donc autour de 20%. Estrada et al ont démontré qu'à 20% d'O₂, les cellules souches mésenchymateuses humaines cultivées pendant plusieurs semaines présentaient un stress oxydant élevé et des dommages à l'ADN (Estrada, Albo et al. 2012). Les cellules que nous avons utilisées dans notre étude étaient des cellules endothéliales provenant de la veine ombilicale humaine, où la teneur en O₂ se situe *in vivo* autour des 3,2% (Carreau, El Hafny-Rahbi et al. 2011). Nos conditions de culture placent donc ces cellules dans un environnement fortement pro-oxydant par rapport aux conditions *in vivo*, qui pourrait ne pas être approprié pour étudier des mécanismes dépendants des niveaux redox comme Nrf2.

Cependant, ce sont dans ces mêmes conditions qu'a été conduite l'expérience du Dr. Farhat sur la production aigüe de DRO induite par l'angptl2, ce qui indique bien que dans cet environnement, l'angptl2 peut tout de même causer un stress oxydant mesurable et non masqué par le stress oxydant « basal » induit par les conditions de culture cellulaire. De plus, l'ajout de NAC durant la culture n'a pas eu d'effet majeur, suggérant que le stress oxydant « basal » n'était pas aussi élevé que l'on pourrait le croire.

La méthode de l'immunobuvardage de type Western permet la quantification des niveaux d'expression protéique. Pourtant, dans les cas de DJ-1 et Keap-1, l'évolution des niveaux protéiques n'a jamais été étudiée dans le cadre de Nrf2. En effet, bien que ce raisonnement soit logique, il n'existe pas de preuves dans la littérature d'une variation des niveaux nucléaires de DJ-1 ou des niveaux cytosoliques de Keap-1 lorsque les niveaux nucléaires de Nrf2 varient. Nous avons tout de même décidé d'étudier la variation des niveaux protéiques de DJ-1 et Keap-1 pour des raisons techniques : les échantillons protéiques étaient déjà disponibles (les même que ceux utilisés pour Nrf2), et les expériences pouvaient se faire parallèlement à celles sur Nrf2.

Lors d'un immunobuvardage de type Western, une limite potentielle réside dans la qualité des anticorps utilisés. Dans cette étude, l'anticorps Keap-1 nécessitait un temps d'exposition du film très long (4 h ou « overnight »), et produisait des bandes diffuses et tachées (Figure 7A). Par conséquent, les résultats de Keap-1 ont présenté une forte variabilité, de sorte que les seuls résultats statistiquement significatifs ont impliqué la condition 10 min contrôle, à laquelle nous avons artificiellement fixé une valeur de « 1 », sans aucune variation. Globalement, il semble que l'angptl2, le NAC, l'angptl2 en présence de NAC et les différences de durée de stimulation n'ont aucun effet sur les niveaux cytosoliques de Keap-1.

5.6. Quelles sont les prochaines étapes dans le cadre de l'étude de l'effet de l'angptl2 sur le stress oxydant?

Je crois que le projet présenté ici n'a pas répondu avec certitude à la question initiale, qui reste encore valide : est-ce que l'angptl2 inhibe la voie antioxydante Nrf2 dans les cellules endothéliales? Il vaudrait la peine de réétudier l'effet de l'angptl2 recombinante sur les niveaux nucléaires de Nrf2, mais cette fois en vérifiant systématiquement l'activité biologique de la protéine recombinante produite, et ce pour chaque lot, avant chaque expérience. L'effet de NAC mérite également d'être réétudié, afin de déterminer le rôle des DRO. Par contre, afin d'étudier l'implication de DJ-1 ou de Keap-1, il serait plus approprié d'utiliser des ARNsi afin d'interférer avec l'expression de ces protéines, et donc de créer des cellules DJ-1 knockdown ou Keap-1 knockdown.

6. Conclusion

L'angptl2 est une glycoprotéine qui présente des propriétés pro-inflammatoires, et qui semble également être pro-oxydante. La voie antioxydante cytoprotectrice Nrf2 est un mécanisme important de défense contre le stress oxydant, et son inhibition pourrait être impliquée dans les effets pro-oxydants de l'angptl2. Les effets de l'angptl2 sur cette voie antioxydante, ainsi que sur d'autres voies de défense antioxydantes méritent d'être évalués, au vu de l'importance de l'inflammation et du stress oxydant dans la pathogénèse des maladies cardiovasculaires.

7. Bibliographie

- Aird, W. C. (2004). "Endothelium as an organ system." *Crit Care Med* **32**(5 Suppl): S271-279.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." *Biochem J* **357**(Pt 3): 593-615.
- Alheid, U., J. C. Frolich and U. Forstermann (1987). "Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets." *Thromb Res* **47**(5): 561-571.
- Aoi, J., M. Endo, T. Kadomatsu, K. Miyata, M. Nakano, H. Horiguchi, A. Ogata, H. Odagiri, M. Yano, K. Araki, M. Jinnin, T. Ito, S. Hirakawa, H. Ihn and Y. Oike (2011). "Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis." *Cancer Res* **71**(24): 7502-7512.
- Aoi, J., M. Endo, T. Kadomatsu, K. Miyata, A. Ogata, H. Horiguchi, H. Odagiri, T. Masuda, S. Fukushima, M. Jinnin, S. Hirakawa, T. Sawa, T. Akaike, H. Ihn and Y. Oike (2014). "Angiopoietin-like protein 2 accelerates carcinogenesis by activating chronic inflammation and oxidative stress." *Mol Cancer Res* **12**(2): 239-249.
- Arnold, W. P., C. K. Mittal, S. Katsuki and F. Murad (1977). "Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(8): 3203-3207.
- Balda, M. S. and K. Matter (2008). "Tight junctions at a glance." *J Cell Sci* **121**(Pt 22): 3677-3682.
- Bhagat, K. and P. Vallance (1997). "Inflammatory cytokines impair endothelium-dependent dilatation in human veins in vivo." *Circulation* **96**(9): 3042-3047.
- Bitar, M. S., C. Liu, A. Ziaei, Y. Chen, T. Schmedt and U. V. Jurkunas (2012). "Decline in DJ-1 and decreased nuclear translocation of Nrf2 in Fuchs endothelial corneal dystrophy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**(9): 5806-5813.
- Bodero, A. J., R. Ye and S. P. Lees-Miller (2003). "UV-light induces p38 MAPK-dependent phosphorylation of Bcl10." *Biochem Biophys Res Commun* **301**(4): 923-926.
- Bonomini, F., S. Tengattini, A. Fabiano, R. Bianchi and R. Rezzani (2008). "Atherosclerosis and oxidative stress." *Histol Histopathol* **23**(3): 381-390.
- Boo, Y. C., J. Hwang, M. Sykes, B. J. Michell, B. E. Kemp, H. Lum and H. Jo (2002). "Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **283**(5): H1819-1828.
- Bouchie, J. L., H. Hansen and E. P. Feener (1998). "Natriuretic factors and nitric oxide suppress plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. Role of cGMP in the regulation of the plasminogen system." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**(11): 1771-1779.
- Brandes, R. P., F. H. Schmitz-Winnenthal, M. Feletou, A. Godecke, P. L. Huang, P. M. Vanhoutte, I. Fleming and R. Busse (2000). "An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(17): 9747-9752.
- Brinkley, T. E., B. J. Nicklas, A. M. Kanaya, S. Satterfield, E. G. Lakatta, E. M. Simonsick, K. Sutton-Tyrrell and S. B. Kritchevsky (2009). "Plasma oxidized low-density lipoprotein levels and arterial stiffness in older adults: the health, aging, and body composition study." *Hypertension* **53**(5): 846-852.
- Britton, S. L., T. F. Ronau and P. J. Metting (1986). "Evaluation of angiotensins II and III as vasoconstrictors in the hepatic and hindlimb vasculatures of dogs." *Proc Soc Exp Biol Med* **181**(1): 125-130.
- Burke-Gaffney, A., M. E. Callister and H. Nakamura (2005). "Thioredoxin: friend or foe in human disease?" *Trends Pharmacol Sci* **26**(8): 398-404.
- Busse, R., H. Fichtner, A. Luckhoff and M. Kohlhardt (1988). "Hyperpolarization and increased free calcium in acetylcholine-stimulated endothelial cells." *Am J Physiol* **255**(4 Pt 2): H965-969.
- Carreau, A., B. El Hafny-Rahbi, A. Matejuk, C. Grillon and C. Kieda (2011). "Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia." *J Cell Mol Med* **15**(6): 1239-1253.
- Casino, P. R., C. M. Kilcoyne, A. A. Quyyumi, J. M. Hoeg and J. A. Panza (1993). "The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients." *Circulation* **88**(6): 2541-2547.

Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, D. J. Spiegelhalter, D. Georgakopoulos, J. Robinson and J. E. Deanfield (1994). "Aging is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women." J Am Coll Cardiol **24**(2): 471-476.

Cereijido, M., R. G. Contreras, L. Shoshani, D. Flores-Benitez and I. Larre (2008). "Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype." Biochim Biophys Acta **1778**(3): 770-793.

Cheng, X., R. C. Siow and G. E. Mann (2011). "Impaired redox signaling and antioxidant gene expression in endothelial cells in diabetes: a role for mitochondria and the nuclear factor-E2-related factor 2-Kelch-like ECH-associated protein 1 defense pathway." Antioxid Redox Signal **14**(3): 469-487.

Clapp, B. R., A. D. Hingorani, R. K. Kharbanda, V. Mohamed-Ali, J. W. Stephens, P. Vallance and R. J. MacAllister (2004). Inflammation-induced endothelial dysfunction involves reduced nitric oxide bioavailability and increased oxidant stress.

Clements, C. M., R. S. McNally, B. J. Conti, T. W. Mak and J. P. Ting (2006). "DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(41): 15091-15096.

Colden-Stanfield, M., W. P. Schilling, A. K. Ritchie, S. G. Eskin, L. T. Navarro and D. L. Kunze (1987). "Bradykinin-induced increases in cytosolic calcium and ionic currents in cultured bovine aortic endothelial cells." Circ Res **61**(5): 632-640.

Davis, J. W., L. Shelton, D. A. Eigenberg, C. E. Hignite and I. S. Watanabe (1985). "Effects of tobacco and non-tobacco cigarette smoking on endothelium and platelets." Clin Pharmacol Ther **37**(5): 529-533.

Deanfield, J. E., J. P. Halcox and T. J. Rabelink (2007). "Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance." Circulation **115**(10): 1285-1295.

Dhanabal, M., M. Jeffers, W. J. LaRochelle and H. S. Lichenstein (2005). "Angioarrestin: A unique angiopoietin-related protein with anti-angiogenic properties." Biochemical and Biophysical Research Communications **333**(2): 308-315.

Donato, A. J., I. Eskurza, A. E. Silver, A. S. Levy, G. L. Pierce, P. E. Gates and D. R. Seals (2007). "Direct evidence of endothelial oxidative stress with aging in humans: relation to impaired endothelium-dependent dilation and upregulation of nuclear factor-kappaB." Circ Res **100**(11): 1659-1666.

Dreger, H., K. Westphal, A. Weller, G. Baumann, V. Stangl, S. Meiners and K. Stangl (2009). "Nrf2-dependent upregulation of antioxidative enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor-mediated cardioprotection." Cardiovasc Res **83**(2): 354-361.

Endo, M., M. Nakano, T. Kadomatsu, S. Fukuhara, H. Kuroda, S. Mikami, T. Hato, J. Aoi, H. Horiguchi, K. Miyata, H. Odagiri, T. Masuda, M. Harada, H. Horio, T. Hishima, H. Nomori, T. Ito, Y. Yamamoto, T. Minami, S. Okada, T. Takahashi, N. Mochizuki, H. Iwase and Y. Oike (2012). "Tumor cell-derived angiopoietin-like protein ANGPTL2 is a critical driver of metastasis." Cancer Res **72**(7): 1784-1794.

Estrada, J. C., C. Albo, A. Benguria, A. Dopazo, P. Lopez-Romero, L. Carrera-Quintanar, E. Roche, E. P. Clemente, J. A. Enriquez, A. Bernad and E. Samper (2012). "Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis." Cell Death Differ **19**(5): 743-755.

Falcone, D. J., T. A. McCaffrey, A. Haimovitz-Friedman, J. A. Vergilio and A. C. Nicholson (1993). "Macrophage and foam cell release of matrix-bound growth factors. Role of plasminogen activation." J Biol Chem **268**(16): 11951-11958.

Fan, X., P. Shi, J. Dai, Y. Lu, X. Chen, X. Liu, K. Zhang, X. Wu, Y. Sun, K. Wang, L. Zhu, C. C. Zhang, J. Zhang, G. Q. Chen, J. Zheng and J. Liu (2014). "Paired immunoglobulin-like receptor B regulates platelet activation." Blood **124**(15): 2421-2430.

Farhat, N. (2013). Angiopoietine-like 2 : un facteur circulant pro-oxydant et pro-inflammatoire qui contribue au développement de l'athérosclérose. PhD, Université de Montréal

Farhat, N., A. Mamarbachi, E. Thorin and B. Allen (2014). "Cloning, expression and purification of functionally active human angiopoietin-like protein 2." SpringerPlus **3**(1): 337.

Farhat, N., N. Thorin-Trescases, M. Mamarbachi, L. Villeneuve, C. Yu, C. Martel, N. Duquette, M. Gayda, A. Nigam, M. Juneau, B. G. Allen and E. Thorin (2013). "Angiopoietin-like 2 promotes atherosclerosis in mice." J Am Heart Assoc **2**(3): e000201.

Farhat, N., N. Thorin-Trescases, G. Voghel, L. Villeneuve, M. Mamarbachi, L. P. Perrault, M. Carrier and E. Thorin (2008). "Stress-induced senescence predominates in endothelial cells isolated from atherosclerotic chronic smokers." Can J Physiol Pharmacol **86**(11): 761-769.

Feliers, D., X. Chen, N. Akis, G. G. Choudhury, M. Madaio and B. S. Kasinath (2005). "VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells." Kidney Int **68**(4): 1648-1659.

Finkel, T. and N. J. Holbrook (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." Nature **408**(6809): 239-247.

Fleming, I. and R. Busse (2003). "Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **284**(1): R1-12.

Fleming, I., B. Fisslthaler, S. Dimmeler, B. E. Kemp and R. Busse (2001). "Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity." Circ Res **88**(11): E68-75.

Florey (1966). "The endothelial cell." Br Med J **2**(5512): 487-490.

Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." Eur Heart J **33**(7): 829-837, 837a-837d.

Furchgott, R. F. (1955). "The pharmacology of vascular smooth muscle." Pharmacol Rev **7**(2): 183-265.

Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.

Fuster, V., B. Stein, J. A. Ambrose, L. Badimon, J. J. Badimon and J. H. Chesebro (1990). "Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts." Circulation **82**(3 Suppl): II47-59.

Ghosh, S. and M. Karin (2002). "Missing pieces in the NF-kappaB puzzle." Cell **109** Suppl: S81-96.

Go, Y. M., T. R. Ziegler, J. M. Johnson, L. Gu, J. M. Hansen and D. P. Jones (2007). "Selective protection of nuclear thioredoxin-1 and glutathione redox systems against oxidation during glucose and glutamine deficiency in human colonic epithelial cells." Free Radic Biol Med **42**(3): 363-370.

Guo, D. F., I. Chenier, V. Tardif, S. N. Orlov and T. Inagami (2003). "Type 1 angiotensin II receptor-associated protein ARAP1 binds and recycles the receptor to the plasma membrane." Biochem Biophys Res Commun **310**(4): 1254-1265.

Halcox, J. P., W. H. Schenke, G. Zalos, R. Mincemoyer, A. Prasad, M. A. Waclawiw, K. R. Nour and A. A. Quyyumi (2002). "Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction." Circulation **106**(6): 653-658.

Handin, R. I. and D. D. Wagner (1989). "Molecular and cellular biology of von Willebrand factor." Prog Hemost Thromb **9**: 233-259.

Hansson, G. K. and A. Hermansson (2011). "The immune system in atherosclerosis." Nat Immunol **12**(3): 204-212.

Hardman, J. G. and E. W. Sutherland (1969). "Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate." J Biol Chem **244**(23): 6363-6370.

Harrison, D. G., M. L. Armstrong, P. C. Freiman and D. D. Heistad (1987). "Restoration of endothelium-dependent relaxation by dietary treatment of atherosclerosis." J Clin Invest **80**(6): 1808-1811.

Hayes, J. D., E. M. Ellis, G. E. Neal, D. J. Harrison and M. M. Manson (1999). "Cellular response to cancer chemopreventive agents: contribution of the antioxidant responsive element to the adaptive response to oxidative and chemical stress." Biochem Soc Symp **64**: 141-168.

Heitzer, T., S. Yla-Herttuala, J. Luoma, S. Kurz, T. Munzel, H. Just, M. Olschewski and H. Drexler (1996). "Cigarette smoking potentiates endothelial dysfunction of forearm resistance vessels in patients with hypercholesterolemia. Role of oxidized LDL." Circulation **93**(7): 1346-1353.

Hess, C. N., R. Kou, R. P. Johnson, G. K. Li and T. Michel (2009). "ADP signaling in vascular endothelial cells: ADP-dependent activation of the endothelial isoform of nitric-oxide synthase requires the expression but not the kinase activity of AMP-activated protein kinase." J Biol Chem **284**(47): 32209-32224.

Hohmann, H. P., R. Remy, B. Poschl and A. P. van Loon (1990). "Tumor necrosis factors-alpha and -beta bind to the same two types of tumor necrosis factor receptors and maximally activate the transcription factor NF-kappa B at low receptor occupancy and within minutes after receptor binding." J Biol Chem **265**(25): 15183-15188.

Horio, E., T. Kadomatsu, K. Miyata, Y. Arai, K. Hosokawa, Y. Doi, T. Ninomiya, H. Horiguchi, M. Endo, M. Tabata, H. Tazume, Z. Tian, O. Takahashi, K. Terada, M. Takeya, H. Hao, N. Hirose, T. Minami, T. Suda, Y. Kiyohara, H. Ogawa, K. Kaikita and Y. Oike (2014). "Role of endothelial cell-derived angptl2 in vascular inflammation leading to endothelial dysfunction and atherosclerosis progression." Arterioscler Thromb Vasc Biol **34**(4): 790-800.

Hornig, B., V. Maier and H. Drexler (1996). "Physical training improves endothelial function in patients with chronic heart failure." Circulation **93**(2): 210-214.

Hosoya, T., A. Maruyama, M. I. Kang, Y. Kawatani, T. Shibata, K. Uchida, E. Warabi, N. Noguchi, K. Itoh and M. Yamamoto (2005). "Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells." J Biol Chem **280**(29): 27244-27250.

Howden, R. (2013). "Nrf2 and Cardiovascular Defense." Oxidative Medicine and Cellular Longevity **2013**: 10.

Hwang, S. J., C. M. Ballantyne, A. R. Sharrett, L. C. Smith, C. E. Davis, A. M. Gotto, Jr. and E. Boerwinkle (1997). "Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study." Circulation **96**(12): 4219-4225.

Ignarro, L. J., K. S. Wood and M. S. Wolin (1982). "Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(9): 2870-2873.

Itoh, K., T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto and Y. Nabeshima (1997). "An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements." Biochem Biophys Res Commun **236**(2): 313-322.

Jiang, H. and N. L. Stephens (1994). "Calcium and smooth muscle contraction." Mol Cell Biochem **135**(1): 1-9.

Kadomatsu, T., S. Uragami, M. Akashi, Y. Tsuchiya, H. Nakajima, Y. Nakashima, M. Endo, K. Miyata, K. Terada, T. Todo, K. Node and Y. Oike (2013). "A molecular clock regulates angiotensin-like protein 2 expression." PLoS One **8**(2): e57921.

Kalyanaraman, B. (2013). "Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms." Redox Biol **1**(1): 244-257.

Kayali, A. G., D. A. Austin and N. J. Webster (2000). "Stimulation of MAPK cascades by insulin and osmotic shock: lack of an involvement of p38 mitogen-activated protein kinase in glucose transport in 3T3-L1 adipocytes." Diabetes **49**(11): 1783-1793.

Keum, Y. S., S. Yu, P. P. Chang, X. Yuan, J. H. Kim, C. Xu, J. Han, A. Agarwal and A. N. Kong (2006). "Mechanism of action of sulforaphane: inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms contributing to the induction of antioxidant response element-mediated heme oxygenase-1 in human hepatoma HepG2 cells." Cancer Res **66**(17): 8804-8813.

Kharbanda, R. K., B. Walton, M. Allen, N. Klein, A. D. Hingorani, R. J. MacAllister and P. Vallance (2002). "Prevention of inflammation-induced endothelial dysfunction: a novel vasculo-protective action of aspirin." Circulation **105**(22): 2600-2604.

Kiely, P. D., J. C. Wang, C. J. Kelly, C. Condron, R. G. Watson and D. J. Bouchier-Hayes (2002). "Diethylmaleate, a pro-oxidant, attenuates experimental ischaemia-reperfusion-induced lung injury." Br J Surg **89**(4): 482-485.

Kim, I., S. O. Moon, K. N. Koh, H. Kim, C. S. Uhm, H. J. Kwak, N. G. Kim and G. Y. Koh (1999). "Molecular cloning, expression, and characterization of angiotensin-related protein. angiotensin-related protein induces endothelial cell sprouting." J Biol Chem **274**(37): 26523-26528.

Kim, J. A., M. Montagnani, K. K. Koh and M. J. Quon (2006). "Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms." Circulation **113**(15): 1888-1904.

Kirsch, E. A., I. S. Yuhanna, Z. Chen, Z. German, T. S. Sherman and P. W. Shaul (1999). "Estrogen acutely stimulates endothelial nitric oxide synthase in H441 human airway epithelial cells." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(4): 658-666.

Kitazawa, M., M. Nagano, K. H. Masumoto, Y. Shigeyoshi, T. Natsume and S. Hashimoto (2011). "Angiotensin-like 2, a circadian gene, improves type 2 diabetes through potentiation of insulin sensitivity in mice adipocytes." Endocrinology **152**(7): 2558-2567.

Kubes, P., M. Suzuki and D. N. Granger (1991). "Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 4651-4655.

Kubota, Y., Y. Oike, S. Satoh, Y. Tabata, Y. Niikura, T. Morisada, M. Akao, T. Urano, Y. Ito, T. Miyamoto, N. Nagai, G. Y. Koh, S. Watanabe and T. Suda (2005). "Cooperative interaction of Angiotensin-like proteins 1 and 2 in zebrafish vascular development." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(38): 13502-13507.

Kuzkaya, N., N. Weissmann, D. G. Harrison and S. Dikalov (2003). "Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase." J Biol Chem **278**(25): 22546-22554.

Landmesser, U., B. Hornig and H. Drexler (2004). "Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?" Circulation **109**(21 Suppl 1): II27-33.

Lee, M. R., L. Li and T. Kitazawa (1997). "Cyclic GMP causes Ca²⁺ desensitization in vascular smooth muscle by activating the myosin light chain phosphatase." J Biol Chem **272**(8): 5063-5068.

Lee, S. Y. (2009). "Literature Review of COPD 2008." Tuberc Respir Dis **67**(1): 1-7.

Lerman, A. and A. M. Zeiher (2005). "Endothelial function: cardiac events." Circulation **111**(3): 363-368.

Li, H., M. I. Cybulsky, M. A. Gimbrone, Jr. and P. Libby (1993). "An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium." Arterioscler Thromb **13**(2): 197-204.

Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." Nature **420**(6917): 868-874.

Lincoln, T. M., T. L. Cornwell and A. E. Taylor (1990). "cGMP-dependent protein kinase mediates the reduction of Ca²⁺ by cAMP in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol **258**(3 Pt 1): C399-407.

Louis, S. F. and P. Zahradka (2010). "Vascular smooth muscle cell motility: From migration to invasion." Exp Clin Cardiol **15**(4): e75-85.

Luo, S., H. Lei, H. Qin and Y. Xia (2014). "Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling." Curr Pharm Des **20**(22): 3548-3553.

Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." Nature **407**(6801): 233-241.

McCabe, T. J., D. Fulton, L. J. Roman and W. C. Sessa (2000). "Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation." J Biol Chem **275**(9): 6123-6128.

McMahon, M., N. Thomas, K. Itoh, M. Yamamoto and J. D. Hayes (2006). "Dimerization of substrate adaptors can facilitate cullin-mediated ubiquitylation of proteins by a "tethering" mechanism: a two-site interaction model for the Nrf2-Keap1 complex." J Biol Chem **281**(34): 24756-24768.

Mitchell, J. A., F. Ali, L. Bailey, L. Moreno and L. S. Harrington (2008). "Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium." Experimental Physiology **93**(1): 141-147.

Mohrman, D. E. and L. J. Heller (2014). Chapter 6. The Peripheral Vascular System. Cardiovascular Physiology, 8e. New York, NY, The McGraw-Hill Companies.

Morales, P., R. Vargas, L. A. Videla and V. Fernandez (2014). "Nrf2 activation in the liver of rats subjected to a preconditioning sub-chronic iron protocol." Food Funct **5**(2): 243-250.

Murad, F. (1986). "Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation." J Clin Invest **78**(1): 1-5.

Murai, H., F. Hiragami, K. Kawamura, H. Motoda, Y. Koike, S. Inoue, K. Kumagishi, A. Ohtsuka and Y. Kano (2010). "Differential response of heat-shock-induced p38 MAPK and JNK activity in PC12 mutant and PC12 parental cells for differentiation and apoptosis." Acta Med Okayama **64**(1): 55-62.

Murohara, T., B. Witzenbichler, I. Spyridopoulos, T. Asahara, B. Ding, A. Sullivan, D. W. Losordo and J. M. Isner (1999). "Role of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cell migration." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(5): 1156-1161.

Murphy, K., P. Travers and M. Walport (2007). Janeway's Immunobiology 7th Edition.

Nagafuchi, A. (2001). "Molecular architecture of adherens junctions." Current opinion in cell biology **13**(5): 600-603.

Naidu, S., V. Vijayan, S. Santoso, T. Kietzmann and S. Immenschuh (2009). "Inhibition and genetic deficiency of p38 MAPK up-regulates heme oxygenase-1 gene expression via Nrf2." J Immunol **182**(11): 7048-7057.

Nakamura, T., T. Okada, M. Endo, T. Kadomatsu, T. Taniwaki, A. Sei, H. Odagiri, T. Masuda, T. Fujimoto, T. Nakamura, Y. Oike and H. Mizuta (2014). "Angiopoietin-like protein 2 induced by mechanical stress accelerates degeneration and hypertrophy of the ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis." PLoS One **9**(1): e85542.

Niessner, A., K. Sato, E. L. Chaikof, I. Colmegna, J. J. Goronzy and C. M. Weyand (2006). "Pathogen-sensing plasmacytoid dendritic cells stimulate cytotoxic T-cell function in the atherosclerotic plaque through interferon-alpha." Circulation **114**(23): 2482-2489.

Obata, T., G. E. Brown and M. B. Yaffe (2000). "MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway." Crit Care Med **28**(4 Suppl): N67-77.

Odagiri, H., T. Kadomatsu, M. Endo, T. Masuda, M. S. Morioka, S. Fukuhara, T. Miyamoto, E. Kobayashi, K. Miyata, J. Aoi, H. Horiguchi, N. Nishimura, K. Terada, T. Yakushiji, I. Manabe, N. Mochizuki, H. Mizuta and Y. Oike (2014). "The secreted protein ANGPTL2 promotes metastasis of osteosarcoma cells through integrin alpha5beta1, p38 MAPK, and matrix metalloproteinases." Sci Signal **7**(309): ra7.

Oike, Y. and M. Tabata (2009). "Angiopoietin-like proteins--potential therapeutic targets for metabolic syndrome and cardiovascular disease." Circ J **73**(12): 2192-2197.

Osborn, L., S. Kunkel and G. J. Nabel (1989). "Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2336-2340.

Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.

Palmer, R. M., D. S. Ashton and S. Moncada (1988). "Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine." Nature **333**(6174): 664-666.

Pierce, G. L., L. A. Lesniewski, B. R. Lawson, S. D. Beske and D. R. Seals (2009). "Nuclear factor- κ B activation contributes to vascular endothelial dysfunction via oxidative stress in overweight/obese middle-aged and older humans." Circulation **119**(9): 1284-1292.

Prickett, T. D. and D. L. Brautigan (2007). "Cytokine Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Apoptosis Is Opposed by alpha-4 Targeting of Protein Phosphatase 2A for Site-Specific Dephosphorylation of MEK3." Molecular and Cellular Biology **27**(12): 4217-4227.

Pries, A. R., T. W. Secomb and P. Gaetgens (2000). "The endothelial surface layer." Pflügers Archiv **440**(5): 653-666.

Qiao, J. H., J. Tripathi, N. K. Mishra, Y. Cai, S. Tripathi, X. P. Wang, S. Imes, M. C. Fishbein, S. K. Clinton, P. Libby, A. J. Lusis and T. B. Rajavashisth (1997). "Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice." Am J Pathol **150**(5): 1687-1699.

Quagliarini, F., Y. Wang, J. Kozlitina, N. V. Grishin, R. Hyde, E. Boerwinkle, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, J. C. Cohen and H. H. Hobbs (2012). "Atypical angiopoietin-like protein that regulates ANGPTL3." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(48): 19751-19756.

Quyyumi, A. A., D. Mulcahy, N. P. Andrews, S. Husain, J. A. Panza and R. O. Cannon, 3rd (1997). "Coronary vascular nitric oxide activity in hypertension and hypercholesterolemia. Comparison of acetylcholine and substance P." Circulation **95**(1): 104-110.

Reddy, K. G., R. N. Nair, H. M. Sheehan and J. M. Hodgson (1994). "Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis." J Am Coll Cardiol **23**(4): 833-843.

Rhee, S. G. (2006). "Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling." Science **312**(5782): 1882-1883.

Richardson, M. R., E. P. Robbins, S. Vemula, P. J. Critser, C. Whittington, S. L. Voytik-Harbin and M. C. Yoder (2014). "Angiopoietin-like protein 2 regulates endothelial colony forming cell vasculogenesis." Angiogenesis **17**(3): 675-683.

Rikitake, Y., K. Hirata, S. Kawashima, M. Ozaki, T. Takahashi, W. Ogawa, N. Inoue and M. Yokoyama (2002). "Involvement of endothelial nitric oxide in sphingosine-1-phosphate-induced angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(1): 108-114.

Ross, R. (1993). "The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s." Nature **362**(6423): 801-809.

Roubenoff, R., T. B. Harris, L. W. Abad, P. W. Wilson, G. E. Dallal and C. A. Dinarello (1998). "Monocyte cytokine production in an elderly population: effect of age and inflammation." J Gerontol A Biol Sci Med Sci **53**(1): M20-26.

Rubbo, H., A. Trostchansky, H. Botti and C. Batthyany (2002). "Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein." Biol Chem **383**(3-4): 547-552.

Schenk, H., M. Vogt, W. Droge and K. Schulze-Osthoff (1996). "Thioredoxin as a potent costimulus of cytokine expression." J Immunol **156**(2): 765-771.

Schulze, P. C., H. Liu, E. Choe, J. Yoshioka, A. Shalev, K. D. Bloch and R. T. Lee (2006). "Nitric oxide-dependent suppression of thioredoxin-interacting protein expression enhances thioredoxin activity." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2666-2672.

Serhan, C. N., P. A. Ward and D. W. Gilroy (2010). Fundamentals of Inflammation, Cambridge University Press.

Shah, P. K., E. Falk, J. J. Badimon, A. Fernandez-Ortiz, A. Mailhac, G. Villareal-Levy, J. T. Fallon, J. Regnstrom and V. Fuster (1995). "Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques. Potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture." Circulation **92**(6): 1565-1569.

Shao, Y., Z. Cheng, X. Li, V. Chernaya, H. Wang and X. F. Yang (2014). "Immunosuppressive/anti-inflammatory cytokines directly and indirectly inhibit endothelial dysfunction- a novel mechanism for maintaining vascular function." J Hematol Oncol **7**(1): 80.

Siegel, G., F. Schnalke, G. Stock and J. Grote (1989). "Prostacyclin, endothelium-derived relaxing factor and vasodilatation." Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res **19**: 267-270.

Sies, H. (2013). Oxidative stress, Elsevier.

Silva, B. R., L. Pernomian and L. M. Bendhack (2012). "Contribution of oxidative stress to endothelial dysfunction in hypertension." Front Physiol **3**: 441.

Simon, A. M. and D. A. Goodenough (1998). "Diverse functions of vertebrate gap junctions." Trends Cell Biol **8**(12): 477-483.

Singh, U., S. Devaraj, J. Vasquez-Vivar and I. Jialal (2007). "C-reactive protein decreases endothelial nitric oxide synthase activity via uncoupling." J Mol Cell Cardiol **43**(6): 780-791.

Skalen, K., M. Gustafsson, E. K. Rydberg, L. M. Hulthen, O. Wiklund, T. L. Innerarity and J. Boren (2002). "Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis." Nature **417**(6890): 750-754.

Sorensen, K. E., D. S. Celermajer, D. Georgakopoulos, G. Hatcher, D. J. Betteridge and J. E. Deanfield (1994). "Impairment of endothelium-dependent dilation is an early event in children with familial hypercholesterolemia and is related to the lipoprotein(a) level." J Clin Invest **93**(1): 50-55.

Stamler, J. S., S. Lamas and F. C. Fang (2001). "Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism." Cell **106**(6): 675-683.

Statistique-Canada (2011). "Mortalité: liste sommaire des causes 2008." Numéro au catalogue No 84F0209X.

Stemme, S., B. Faber, J. Holm, O. Wiklund, J. L. Witztum and G. K. Hansson (1995). "T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 3893-3897.

Suwaidi, J. A., S. Hamasaki, S. T. Higano, R. A. Nishimura, D. R. Holmes, Jr. and A. Lerman (2000). "Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction." Circulation **101**(9): 948-954.

Swain, L., M. Wottawa, A. Hillemann, A. Beneke, H. Odagiri, K. Terada, M. Endo, Y. Oike, K. Farhat and D. M. Katschinski (2014). "Prolyl-4-hydroxylase domain 3 (PHD3) is a critical terminator for cell survival of macrophages under stress conditions." J Leukoc Biol **96**(3): 365-375.

Tabas, I., K. J. Williams and J. Boren (2007). "Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications." Circulation **116**(16): 1832-1844.

Tabata, M., T. Kadomatsu, S. Fukuhara, K. Miyata, Y. Ito, M. Endo, T. Urano, H. J. Zhu, H. Tsukano, H. Tazume, K. Kaikita, K. Miyashita, T. Iwawaki, M. Shimabukuro, K. Sakaguchi, T. Ito, N. Nakagata, T. Yamada, H. Katagiri, M. Kasuga, Y. Ando, H. Ogawa, N. Mochizuki, H. Itoh, T. Suda and Y. Oike (2009). "Angiopoietin-like protein 2 promotes chronic adipose tissue inflammation and obesity-related systemic insulin resistance." Cell Metab **10**(3): 178-188.

Tabit, C. E., M. Holbrook, S. M. Shenouda, M. M. Dohadwala, M. E. Widlansky, A. A. Frame, B. H. Kim, M. A. Duess, M. A. Kluge, A. Levit, J. F. Keaney, Jr., J. A. Vita and N. M. Hamburg (2012). "Effect of sulfasalazine on inflammation and endothelial function in patients with established coronary artery disease." Vasc Med **17**(2): 101-107.

Thomas, S. R., K. Chen and J. F. Keaney, Jr. (2002). "Hydrogen peroxide activates endothelial nitric-oxide synthase through coordinated phosphorylation and dephosphorylation via a phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway." J Biol Chem **277**(8): 6017-6024.

Thorin-Trescases, N. and E. Thorin (2014). "Angiopoietin-like-2: a multifaceted protein with physiological and pathophysiological properties." Expert Reviews in Molecular Medicine **16**: null-null.

Thors, B., H. Halldorsson, G. Jonsdottir and G. Thorgeirsson (2008). "Mechanism of thrombin mediated eNOS phosphorylation in endothelial cells is dependent on ATP levels after stimulation." Biochim Biophys Acta **1783**(10): 1893-1902.

Thors, B., H. Halldorsson and G. Thorgeirsson (2004). "Thrombin and histamine stimulate endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation at Ser1177 via an AMPK mediated pathway independent of PI3K-Akt." FEBS Lett **573**(1-3): 175-180.

Trayhurn, P. and I. S. Wood (2005). "Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity." Biochem Soc Trans **33**(Pt 5): 1078-1081.

Ungvari, Z., L. Bailey-Downs, D. Sosnowska, T. Gautam, P. Koncz, G. Losonczy, P. Ballabh, R. de Cabo, W. E. Sonntag and A. Csiszar (2011). "Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response." Am J Physiol Heart Circ Physiol **301**(2): H363-372.

Verma, S., S. H. Li, M. V. Badiwala, R. D. Weisel, P. W. Fedak, R. K. Li, B. Dhillon and D. A. Mickle (2002). "Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein." Circulation **105**(16): 1890-1896.

Wadley, A. J., J. J. Veldhuijzen van Zanten and S. Aldred (2013). "The interactions of oxidative stress and inflammation with vascular dysfunction in ageing: the vascular health triad." Age (Dordr) **35**(3): 705-718.

Watai, Y., A. Kobayashi, H. Nagase, M. Mizukami, J. McEvoy, J. D. Singer, K. Itoh and M. Yamamoto (2007). "Subcellular localization and cytoplasmic complex status of endogenous Keap1." Genes to Cells **12**(10): 1163-1178.

WHO (2011). "Global status report on noncommunicable diseases, World Health Organization."

Williams, S. B., J. A. Cusco, M. A. Roddy, M. T. Johnstone and M. A. Creager (1996). "Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus." J Am Coll Cardiol **27**(3): 567-574.

Wilson, M. A. (2011). "The role of cysteine oxidation in DJ-1 function and dysfunction." Antioxid Redox Signal **15**(1): 111-122.

Wu, K. K. and P. Thiagarajan (1996). "Role of endothelium in thrombosis and hemostasis." Annu Rev Med **47**: 315-331.

Yamada, T., N. Egashira, A. Bando, Y. Nishime, Y. Tonogai, M. Imuta, T. Yano and R. Oishi (2012). "Activation of p38 MAPK by oxidative stress underlying epirubicin-induced vascular endothelial cell injury." Free Radic Biol Med **52**(8): 1285-1293.

Yanagisawa, M., H. Kurihara, S. Kimura, Y. Tomobe, M. Kobayashi, Y. Mitsui, Y. Yazaki, K. Goto and T. Masaki (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**(6163): 411-415.

Yoshikawa, T. and Y. Naito (2002). "What Is Oxidative Stress?" Oxidative Stress: 271.

Yu, C., X. Luo, N. Farhat, C. Daneault, N. Duquette, C. Martel, J. Lambert, N. Thorin-Trescases, C. D. Rosiers and E. Thorin (2014). "Lack of angiopoietin-like-2 expression limits the metabolic stress induced by a high-fat diet and maintains endothelial function in mice." J Am Heart Assoc **3**(4).

Yuan, S. and R. Rigor (2010). Regulation of Endothelial Barrier Function. Chapter 4, The Endothelial Barrier, Morgan & Claypool Life Sciences.

Zernecke, A., E. Shagdarsuren and C. Weber (2008). "Chemokines in atherosclerosis: an update." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(11): 1897-1908.

Zhang, H., Y. Park, J. Wu, X. Chen, S. Lee, J. Yang, K. C. Dellsperger and C. Zhang (2009). "Role of TNF-alpha in vascular dysfunction." Clin Sci (Lond) **116**(3): 219-230.

Zheng, J., M. Umikawa, C. Cui, J. Li, X. Chen, C. Zhang, H. Huynh, X. Kang, R. Silvany, X. Wan, J. Ye, A. P. Canto, S. H. Chen, H. Y. Wang, E. S. Ward and C. C. Zhang (2012). "Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development." Nature **485**(7400): 656-660.

Zhou, R., A. Tardivel, B. Thorens, I. Choi and J. Tschopp (2010). "Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation." Nat Immunol **11**(2): 136-140.