



Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par l'Université Paul Sabatier - Toulouse III**  
**Discipline ou spécialité : Physiopathologie**

Présentée et soutenue par

***CAMARE Caroline***

Le 5 mai 2014

**ROLE DE LA VOIE SPHINGOMYELINASE NEUTRE DE TYPE 2 /  
SPHINGOSINE KINASE 1 / SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE  
DANS L'EFFET ANGIOGENIQUE DES LDL OXYDEES**

## **JURY**

***M. CHAP Hugues*** - Professeur Université Paul Sabatier Toulouse

***M. GUEANT Jean-Louis*** – Professeur Université Nancy

***Mme. CALIGIURI Giuseppina*** – Directeur de Recherche INSERM Paris

***Mme. GUERIN Maryse***– Directeur de Recherche INSERM Paris

***M. SALVAYRE Robert*** – Professeur Université Paul Sabatier Toulouse

**Ecole doctorale Biologie Santé Biotechnologie**  
**Unité de recherche Inserm/UPS UMR 1048 I2MC**

**Directeur de Thèse : Pr. SALVAYRE Robert et Dr NEGRE-SALVAYRE Anne**

**Rapporteurs : Pr GUEANT Jean Louis, Dr CALIGIURI Giuseppina, Dr GUERIN Maryse**





# THÈSE

En vue de l'obtention du

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**

**Délivré par l'Université Paul Sabatier - Toulouse III**  
**Discipline ou spécialité : Physiopathologie**

Présentée et soutenue par

***CAMARE Caroline***

Le 5 mai 2014

**ROLE DE LA VOIE SPHINGOMYELINASE NEUTRE DE TYPE 2 /  
SPHINGOSINE KINASE 1 / SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE  
DANS L'EFFET ANGIOGENIQUE DES LDL OXYDEES**

## **JURY**

**M. CHAP Hugues** - *Professeur Université Paul Sabatier Toulouse*  
**M. GUEANT Jean-Louis** - *Professeur Université Nancy*  
**Mme. CALIGIURI Giuseppina** - *Directeur de Recherche INSERM Paris*  
**Mme. GUERIN Maryse** - *Directeur de Recherche INSERM Paris*  
**M. SALVAYRE Robert** - *Professeur Université Paul Sabatier Toulouse*

**Ecole doctorale Biologie Santé Biotechnologie**  
**Unité de recherche Inserm/UPS UMR 1048 I2MC**

**Directeur de Thèse : Pr. SALVAYRE Robert et Dr NEGRE-SALVAYRE Anne**

**Rapporteurs : Pr GUEANT Jean Louis, Dr CALIGIURI Giuseppina, Dr GUERIN Maryse**



A ma fille,  
A mes parents,  
A Mathieu, à Charles.



Ce travail a été réalisé au sein de l'équipe 10 de l'UMR UPS/INSERM 1048 dirigée par le Docteur Anne Nègre-Salvayre.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Monsieur le Professeur Jean-Louis Guéant, Madame le Docteur Giuseppina Caligiuri et Madame le Docteur Maryse Guérin, qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail. Merci pour vos remarques constructives. Permettez-moi de vous adresser ma reconnaissance la plus sincère.

Je remercie Monsieur le Professeur Hugues Chap, d'avoir accepté la présidence de ce jury de thèse. Merci pour votre disponibilité, vos conseils avisés et surtout votre soutien dans mon projet hospitalo-universitaire. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude et de mon respect le plus sincère.

Merci à Madame le Docteur Anne Nègre-Salvayre de m'avoir accueillie dans son équipe de recherche il y a cinq ans pour mon master-2-recherche, et de m'avoir donné l'opportunité de poursuivre mes travaux de recherche à ses côtés dans le cadre de ma thèse. Merci pour tous vos conseils, vos idées et le partage de votre expérience scientifique. Merci d'avoir accepté la co-direction de cette thèse et de m'avoir guidée au quotidien dans la réalisation de ce travail.

Je remercie Monsieur le Professeur Robert Salvayre d'avoir dirigé cette thèse. Merci pour l'intérêt permanent que vous avez porté à ce travail, pour vos idées scientifiques et remarques toujours pertinentes ainsi que pour votre disponibilité. Je vous suis également très reconnaissante pour votre soutien dans mon projet de carrière hospitalo-universitaire. Vous m'avez accueillie dans votre service comme Assistante-Hospitalo-Universitaire, me permettant ainsi de me former à la biochimie médicale et à la pédagogie. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez témoignée en me donnant cette opportunité.

La réalisation de ce travail n'aurait pu se faire sans la présence, la participation et la collaboration d'un grand nombre de personnes que je tiens également à remercier.

Je remercie le Docteur Françoise Maupas-Schwalm qui m'a encadré pour mon master-2-recherche et m'a donné envie de poursuivre la recherche fondamentale dans le cadre de la thèse. Françoise, je te remercie pour ta rigueur, ton énergie, et le soutien sans faille que tu m'as apporté en toute situation. Merci pour tous nos échanges scientifiques, médicaux, et pédagogiques. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi.

Merci à tout le personnel de l'équipe 10 : les chercheurs, Nathalie et Cécile ; le personnel technique, Elodie, Mélanie, Marie-Hélène, Corinne, Audrey, Christophe, Thomas, Julien, Nancy, Myriam, Virginie ; les étudiants, Magali, Christel, Pauline, Sandra, Jean, Bertrand, et les anciens, Cécile, Raphaël, Carole, Aurélie, ainsi que toutes les autres personnes de l'équipe, pour leur gentillesse et leur bonne humeur au quotidien.

Merci aux secrétaires Gisèle et Nassera, et aussi Eve et Danièle.

Merci également à tout le personnel du laboratoire de Biochimie de Ranguel, biologistes, techniciens et secrétaires qui ont toujours fait preuve de bienveillance à mon égard. Je remercie particulièrement mes collègues, Cécile, Françoise, Anne-Valérie, Jean-Marie, Nadine, Samir, Morgane, Martine, pour leur soutien à tous les niveaux dans les mois précédant la soutenance.

Et enfin, je remercie chaleureusement mes proches, ma famille et mes amis, pour leur soutien sans faille, leur réconfort, leurs encouragements et tout le reste..... Merci de croire en moi.



« La première chose qu'on regarde est rarement la dernière chose qu'on voit..... »  
(Grégoire Delacourt)



## RESUME

L'athérosclérose et ses complications cardiovasculaires représentent la principale cause de morbi-mortalité dans les pays développés et posent un problème majeur de santé publique. De nombreux facteurs de risque, ont été décrits, en particulier l'hypercholestérolémie liée aux LDL circulantes. L'oxydation de ces LDL constitue une étape déterminante dans le processus d'athérogenèse.

Dans la paroi des artères de moyen et gros calibre, on observe un réseau microvasculaire (les vasa vasorum) localisé au niveau de l'adventice et qui a pour rôle d'apporter oxygène et nutriments aux couches les plus externes de la paroi artérielle. Alors que ces microcapillaires ne sont pas retrouvés au niveau de la media et de l'intima des artères normales, il se produit une neovascularisation en regard de l'hyperplasie intimale des artères athéroscléreuses. Les LDL oxydées, par leur effet proangiogénique, peuvent contribuer à cette neovascularisation qui participerait à l'expansion de la plaque mais augmenterait aussi le risque d'hémorragies intraplaques ainsi que le risque de rupture et d'accidents athérothrombogènes.

Le mécanisme angiogénique des LDLox est peu connu, et l'implication de la sphingosine-1-phosphate (S1P), un second messenger de la voie des sphingolipides, impliqué dans l'angiogenèse, n'a pas été rapporté dans l'angiogenèse induite par les LDLox.

Le but de ce travail est d'évaluer l'implication et les mécanismes d'activation de la voie des sphingolipides, avec la génération consécutive de S1P, dans l'effet pro-angiogénique des LDL oxydées sur les cellules endothéliales microvasculaires.

Dans une première partie nous avons montré un effet biphasique des LDL oxydées sur les HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells), avec un effet proangiogénique à faibles doses (20 à 50 µg/ml) et une absence d'angiogenèse pour des doses plus élevées non encore toxiques (100 µg/ml). Au-delà de ces doses, nous observons un effet toxique, comme cela a déjà été précédemment décrit. L'inhibition par siRNA de l'expression de SK1 (sphingosine kinase-1 impliquée dans la génération de S1P) et l'utilisation d'un anticorps bloquant de la S1P (*Sphingomab*<sup>TM</sup>), permettent d'inhiber efficacement la tubulogenèse des cellules endothéliales induite par les LDLox *in vitro*. L'angiogenèse chez la souris C57/B16 (étudiée par Matrigel plugs contenant des LDL oxydées), est efficacement prévenue par l'administration de l'anticorps bloquant *Sphingomab*<sup>TM</sup>, définissant le rôle majeur de ce lipide bioactif dans le signal angiogénique des LDLox *in vitro* et *in vivo*. Sur un plan mécanistique, l'activation de SK1 et l'angiogenèse induite par les LDLox sont bloquées par l'utilisation d'anticorps bloquants anti-CD36 et anti-LOX-1 montrant l'implication des récepteurs scavengers des LDLox dans cette signalisation. L'utilisation d'un inhibiteur de l'activité kinase du VEGFR2 bloque dans une même proportion l'angiogenèse induite par les LDLox et par de la S1P exogène, évoquant une transactivation du VEGFR par les récepteurs membranaires de la S1P, en l'absence de synthèse de VEGF par les HMEC-1 sous l'effet des LDLox.

Dans une deuxième partie nous avons montré que la génération de S1P consécutive à l'activation de la SK1 sous l'effet des LDLox, est étroitement liée à l'activation en amont de la nSMase2 dans des cellules endothéliales *in vitro*, impliquant également le stress oxydant et p38MAPK. L'utilisation d'un inhibiteur chimique de la nSMase2 bloque efficacement l'angiogenèse induite par les LDLox *in vitro*, ainsi que l'activation de SK1. Le time-course de génération de ROS et de phosphorylation de p38 dans les HMEC-1 soumises à des doses angiogéniques de LDLox est plus précoce que l'activation des enzymes de la voie des sphingolipides. L'utilisation des antioxydants NAC et trolox ainsi qu'un inhibiteur de phospho-p38MPAK bloquent à la fois la tubulogenèse et l'activation de nSMase2 et de SK1 *in vitro*, évoquant leur implication dans cette signalisation en amont de la voie des sphingolipides.

Dans une troisième partie nous avons étudié le lien entre l'activation de la voie des sphingolipides par les LDLox et la connexine-43, protéine constitutive des jonctions gap permettant la transduction d'une signalisation entre cellules adjacentes. Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des connexines, nous avons obtenu une inhibition efficace de l'activation de la SK1 et de la tubulogenèse induite par les LDLox *in vitro*, permettant d'évoquer la participation des jonctions gap dans la transduction du signal angiogène des LDLox impliquant la génération de S1P. En perspective à ce travail, nous projetons d'approfondir les mécanismes impliquant la connexine-43 dans cette signalisation notamment par rapport à la nSMase2 et à p38MPAK et d'établir un lien avec le développement de la vascularisation des plaque *in vivo* à l'aide de marquage de SK1 ou connexine-43 sur des échantillons d'artériectomie carotidienne.

Ces travaux mettent en évidence de nouvelles cibles (S1P, connexine-43) impliquées dans le mécanisme de la néoangiogenèse intraplaque, évoquant de nouvelles perspectives thérapeutiques pour limiter les complications athérothrombogènes grévant de façon importante le pronostic des patients atteints d'athérosclérose.



## ABSTRACT

Atherosclerosis and relative complications represent the main cause of morbi-mortality in western countries and arise a major problem for public health. Many risk factors have been described, in particular hypercholesterolemia linked to circulating LDL. The oxidation of LDL constitutes a decisive stage in atherogenesis.

The vascular wall of the medium and large arteries is vascularized by a microcapillaries plexus (vasa vasorum) located in adventice, and in charge to bring oxygen and nutrients to the most external layers of the arterial wall. Although, no capillaries are found in the intima or media of normal arteries, we observe neovascularization under intimal hyperplasia of atherosclerotic arteries. As oxidized LDL could display angiogenic properties, they may contribute to this neovascularization, taking part in plaque growth but also in increasing risk of intraplaque heamorrhage and destabilization leading to atherothrombotic complications.

The angiogenic mechanisms of oxidized LDL is yet incompletely known, and the involvement of sphingosine-1-phosphate (S1P), a second messenger of sphingolipid pathway, well known for its angiogenic properties, has never been reported in oxLDL-induced angiogenesis.

The aim of this work is to evaluate the involvement of sphingolipid pathway and its mechanisms of activation, with subsequent generation of S1P, in proangiogenic effects of oxidized LDL on microvascular endothelial cells.

In a first part, we have demonstrated a biphasic effect exhibited by oxidized LDL in HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells), low oxLDL concentrations (20 to 50µg/ml) being angiogenic, whereas higher concentrations being not toxic yet (100µg/ml) are non angiogenic. Beyond these concentrations, as expected, a toxic effect was observed. Inhibition of SK1 (sphingosine kinase-1) expression by using a specific SiRNA, and use of S1P blocking antibody (*Sphingomab*<sup>TM</sup>), exhibit an efficient inhibition of oxLDL-induced tubulogenesis of endothelial cells *in vitro*. Angiogenesis in C57/Bl6 mice (using Matrigel plug assay containing oxLDL), is efficiently prevented by administration of the S1P blocking antibody *Sphingomab*<sup>TM</sup>, defining the major role of this bioactive lipid in the oxLDL angiogenic signal, *in vitro* and *in vivo*. Mechanistically speaking, ox-LDL-induced SK1 activation and angiogenesis are blocked by using anti-CD36 and anti-LOX-1 blocking antibody, showing the involvement of oxLDL scavenger receptors in this signaling. The use of a sphingosine kinase inhibitor of VEGFR2 blocks ox-LDL-induced angiogenesis in the same range as exogenous S1P-induced angiogenesis, evoking a cross-talk between VEGFR and membranary S1P receptors, in the absence of ox-LDL-induced VEGF synthesis in HMEC-1

In a second part, we have shown that ox-LDL-induced SK1 activation and subsequent S1P synthesis, was tightly linked to the amount nSMase2 activation in endothelial cells *in vitro*, involving also oxidative stress and p38MPAK. The use of a chemical inhibitor of nSMase2 efficiently blocks both ox-LDL-induced angiogenesis and SK1 activation *in vitro*. The time course of ROS generation and p38MAPK phosphorylation in HMEC-1 submitted to angiogenic doses of oxLDL appears earlier than enzymes activation of sphingolipid pathway. Using antioxydants as NAC and trolox, as well as a phospho-p38MPAK inhibitor, we block both angiogenesis and nSMase2 and SK1 activation *in vitro*, evoking implication of oxidative stress and p38MPAK in this signalling amount of sphingolipid pathway.

In a third part, we have studied the link between oxLDL induction of sphingolipid pathway and connexine-43, a constitutive protein of gap junctions allowing signal transduction between adjacent cells. Through the use of two connexine pharmacological inhibitors, we have obtained an efficient inhibition of oxLDL-induced SK1 activation and tubulogenesis *in vitro*, evoking that gap junctions may take part in oxLDL angiogenic signalling, implicating S1P generation. In the perspective of this work, we plan to intensify the knowlegde of mechanisms involving connexine-43 in this signaling, particularly in relation to sphingolipid pathway and p38MAPK. Thereafter we would like to establish a link between this work and the development of plaque neovascularization *in vivo*, in support of SK1 or connexines-43 staining on endarterectomy samples of human carotids from patients.

These results arise new targets (S1P, connexine-43) implicated in development of intraplaque neoangiogenesis, and new therapeutic possibilities to limit atherothrombotic complications that significantly worsen the prognosis of atherosclerotic patients.



## LISTE DES ABREVIATIONS

4-HNE : 4-hydroxy-2-nonéal  
ABC : ATP Binding Cassette  
AC : Acid Ceramidase  
AC : Adenyl Cyclase  
ACAT : Acyl-CoA Cholestérol Acyl Transférase  
ACER : Alkalin Ceramidase  
ADMA : Asymmetric DiMethyl Arginine (inhibiteur compétitif de NOS)  
AGPI : Acides Gras Poly-Insaturés  
Akt = PKB : Protéine kinase B  
Ang-1 et Ang-2 : Angiopoïétine-1 et Angiopoïétine-2  
ApoB/E : Apoprotéine B/E  
ARNT : Aryl hydrocarbon Nuclear Translocator  
aSMase : Acid Sphingomyelinase  
BAEC : Bovine Aortic Endothelial Cells  
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2)  
BMEC : Bovine Microvascular Endothelial Cell  
CDase : Ceramidase  
CE : Cellules Endothéliales  
Cer : Céramide  
CerS : Céramide Synthase  
CERT : Ceramide Transfert Protein  
CETP : Cholesterol Ester Transfert Protein  
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator  
CML : Cellules Musculaires lisses  
COX : cyclooxygénase  
Cx-43 : Connexine 43  
EC : Endothelial Cell  
EGF : Epithelial Growth Factor  
EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor  
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS-3)  
ERK : Extracellular signal Regulated Kinases  
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène  
FAK : Focal Adhesion Kinase  
FAN : Factor Associated with nSMase activation  
FBHEC : Fœtal Bovine Heart Endothelial Cell  
FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor  
Flk-1 : fetal liver kinase-1 (version murine du VEGFR-2)  
Flt-1 : fms-like tyrosine kinase-1 (version murine du VEGFR-1)  
Gela : Gélatinase A (MMP-2)  
HCAEC : Human Coronary Artery Endothelial Cell  
HDAC1/2 : Histones Désacétylases 1 et 2  
HDL : High Density Lipoprotein

HIF : Hypoxia Inductible transcription Factor  
HMEC : Human Micro Endothelial Cell  
HRE : Hypoxy Response Element  
HSP : Heparane Sulfate Proteoglycan  
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell  
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule  
IDL : Intermediary Density Lipoprotein  
iNOS : inductible Nitric Oxide Synthase (NOS-2)  
IP3 : Inositol triphosphate  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
JAK : Janus Kinase  
JNK : Jun N-terminal Kinase  
KDR : Kinase insert Domain containing Receptor (version humaine du VEGFR-2)  
LACT : Lecithine Cholesterol Acyl Transferase  
LDL : Low Density Lipoprotein  
LDLox : LDL oxydées  
LDLR : LDL Receptor  
L-NAME : Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester (inhibiteur compétitif de NOS)  
LOX : lipooxygénase  
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase  
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1  
MCS-F : Macrophage Colony Stimulating Factor  
MDA : Malondialdéhyde  
MEC : Matrice Extra Cellulaire  
MLC : Myosine Light Chain  
MLCK/ MLCP : MLC Kinase/Phosphatase  
MMP : Matrix Metallo Protease  
NAC : N-acétyl-cystéine  
NC : Neutral Ceramidase  
nNOS : neuronal Nitric Oxide Synthase (NOS-1)  
NO : Nitric Oxide (monoxyde d'azote)  
NOX : NAD(P)H oxydase  
NRP-1 et NRP-2 : Neuropiline-1 et Neuropiline-2  
nSMase : Neutral Sphingomyelinase  
ODD : Oxygen Dependant Degradation (domain)  
*Orf* : Open Reading Frame  
PA : Phosphatidic Acid  
PAI-1 : Plasminogen Activator Inhibitor-1  
PCAM : Platelet Cellular Adhesion Molecule  
PDGF : Platelet Derivated Growth Factor  
PDGFR : Platelet Derivated Growth Factor Receptor  
PG : Prostaglandines  
PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Kinase  
PIP : Phosphatidyl Inositol Phosphate  
PKB/C/D : Protéine Kinase B/C/D



PLC : Phospholipase C  
PIGF : Placental Growth Factor  
PP1 et PP2A : Protéine Phosphatase 1 et Protéine Phosphatase 2A  
PS : Phosphatidyl Serine  
ROK : Rho-associated Kinase  
ROS : Reactive Oxygen Species  
RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase  
S1P : Sphingosine-1-phosphate  
S1PR<sub>1-5</sub> : S1P Récepteur 1 à 5  
siRNA : small interferent RNA  
SK1 et SK2 : Sphingosine Kinase-1 et Sphingosine Kinase-2  
SM : Sphingomyéline  
SMC : Smooth Muscle Cell  
*Smpd* : SphingoMyéline PhosphoDiestérase (forme murine de la sphingomyélinase)  
Sph : Sphingosine  
Spns2 : S1P transporter spinster homolog 2  
SPP1 et SPP2 : S1P phosphatase 1 et 2  
SPT : Sérine Palmitoyl Transférase  
SRB-1 : Scavenger Receptor class B type 1  
Src : Sarcoma Tumor Virus (kinase initialement décrite dans le virus du sarcome)  
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription  
TDEC : Tumour Derived Endothelial Cell  
TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor- $\beta$   
TGN : Trans Golgi Network  
TIMPs : Tissue Inhibitor of MMP  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor  
tPA : Tissue-type Plasminogen Activator  
uPA : Urokinase-type Plasminogen Activator  
VCAM : Vascular Cellular Adhesion Molecule  
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor  
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
VHL : von-Hippel-Lindau  
VLDL : Very Low Density Lipoprotein



# SOMMAIRE

<b>REVUE GENERALE</b>	21
<b>1. <u>Structure de la paroi artérielle normale</u></b>	23
1.1. Les différentes tuniques vasculaires artérielles	23
1.2. Les différents types d'artères	24
<b>2. <u>Angiogenèse</u></b>	27
2.1. L'origine des vaisseaux sanguins, la vasculogénèse	27
2.2. Définition de l'angiogenèse	27
2.3. Les différents types d'angiogenèse	28
2.3.1. Angiogenèse par bourgeonnement (sprouting angiogenesis)	28
2.3.2. Angiogenèse par intussusception (intussusceptive/splitting angiogenesis)	31
2.3.3. Vasculogénèse post-natale	33
2.4. Mécanismes de régulation de l'angiogenèse	34
2.4.1. Facteurs métaboliques et moléculaires	34
2.4.1.1. L'hypoxie	35
2.4.1.2. VEGF	37
2.4.1.3. Les VEGFR	39
2.4.1.4. Angiopoïétine-1 et 2 / récepteur Tie2	43
2.4.1.5. NO et NOS	44
2.4.1.6. PDGF/PDGFR	45
2.4.1.7. TGF- $\beta$	47
2.4.1.8. b-FGF	48
2.4.1.9. EGFR	49
2.4.1.10. LDL oxydées	50
2.4.2. Molécules d'adhésion	50
2.4.2.1. Les intégrines	50
2.4.2.2. La VE-cadhérine	52
2.4.2.3. Les connexines	53
2.4.3. Facteurs mécaniques	54
2.4.2.1. La pression sanguine artérielle	55
2.4.2.2. Les forces de cisaillement (shear stress)	56
<b>3. <u>Athérosclérose</u></b>	59
3.1. Définition, épidémiologie	59
3.2. Athérogenèse	59
3.2.1. Classification anatomopathologique des lésions	59
3.2.2. Théorie inflammatoire de l'athérogenèse	60
3.2.3. Rôle de l'angiogenèse dans l'athérogenèse	62
3.2.3.1. Facteurs influençant l'angiogenèse dans la plaque	63
3.2.3.2. Conséquence de l'angiogenèse sur l'évolution de la plaque	64
3.3. Evolution de la plaque et complications de l'athérosclérose	66
3.3.1. Remodelage vasculaire et sténose artérielle	67
3.3.2. Anévrisme artériel	67
3.3.3. Anomalies de la vasomotricité, spasme	67
3.3.4. Instabilité de la plaque et accidents thrombotiques	68
<b>4. <u>Les LDL oxydées</u></b>	71
4.1. Présentation schématique de la structure des lipoprotéines	71
4.2. Rappel synthétique du métabolisme des lipoprotéines et rôle physiologique	72
4.3. Implication physiopathologique des lipoprotéines	73
4.3.1. Dyslipidémies	73

4.3.2.	LDL et athérosclérose	73
4.3.3.	Oxydation des LDL	75
4.3.3.1.	Stress oxydant	75
4.3.3.2.	Mécanismes de peroxydation lipidique	76
4.3.3.3.	Produits de peroxydation lipidique présents dans les LDL	76
4.3.4.	Cibles moléculaires et effets biologiques des LDLox. Implication dans l'angiogenèse	77
<b>5.</b>	<b><u>Les sphingolipides</u></b>	<b>79</b>
5.1.	Introduction sur le métabolisme des sphingolipides	79
5.2.	Structure, transport et fonction des sphingolipides	82
5.2.1.	La sphingomyéline	82
5.2.2.	Le céramide	83
5.2.3.	La sphingosine	84
5.2.4.	La sphingosine-1-phosphate	85
5.2.5.	Le rhéostat sphingolipidique	88
5.3.	Les enzymes de la voie des sphingolipides	89
5.3.1.	Les sphingomyélinases	89
5.3.1.1.	Sphingomyélinase acide	89
5.3.1.2.	Sphingomyélinases neutres	89
5.3.1.3.	Sphingomyélinase alcaline	91
5.3.2.	Les céramidases	91
5.3.2.1.	Céramidases acide	91
5.3.2.2.	Céramidase neutre	92
5.3.2.3.	Céramidases alcalines	92
5.3.3.	Les sphingosine kinases	92
5.3.3.1.	Sphingosine kinase 1	93
5.3.3.2.	Sphingosine kinase 2	94
5.4.	Les récepteurs de la S1P	95
5.4.1.	S1P1 (EDG-1)	96
5.4.2.	S1P2 (EDG-5)	97
5.4.3.	S1P3 (EDG-3)	97
5.5.	Activation et effets de la voie des sphingolipides dans les cellules de la paroi vasculaire	98
5.5.1.	Sphingolipides et apoptose	99
5.5.2.	Sphingolipides et prolifération	100
5.5.3.	Sphingolipides et migration	101
5.5.4.	Sphingolipides et angiogenèse	101
5.5.5.	Sphingolipides et vasomotricité	103
	<b>OBJECTIFS DE L'ETUDE</b>	<b>105</b>
	<b>MATERIEL ET METHODES</b>	<b>109</b>
	<b>RESULTATS EXPERIMENTAUX</b>	<b>119</b>
<b>1.</b>	<b><u>La voie de signalisation sphingosine-1-phosphate (S1P), sphingosine kinase-1 (SphK1) et récepteurs de S1P (S1PR) est impliquée dans l'effet angiogénique des LDL oxydées</u></b>	
1.1.	Rôle de la sphingosine-1-phosphate (S1P) et de la sphingosine kinase-1 (SphK1) dans l'effet angiogénique des LDL oxydées.	121
1.2.	Rôle des récepteurs de S1P (S1PR) dans l'effet angiogénique des LDL oxydées	145

2. <b><u>Mécanismes impliqués dans l'activation de la voie des sphingolipides nSMase2/SK1 dans l'angiogenèse induite par les LDL oxydées</u></b>	150
2.1. La nSMase2 est impliquée dans la tubulogenèse des cellules endothéliales HMEC-1 induite par les LDL oxydées	151
2.2. L'activation coordonnée de nSMase2 et SK1 est nécessaire pour l'angiogenèse induite par les LDL oxydées	152
2.3. Implication du stress oxydant et de p38MAPK dans l'activation de la voie des sphingolipides et l'angiogenèse induite par les LDL oxydées	153
2.4. Des métalloprotéases sont impliquées dans l'activation de la voie des sphingolipides et l'angiogenèse induite par les LDL oxydées	157
2.5. La connexine-43 (Cx43) est impliquée dans l'activation de la cascade des sphingolipides et l'angiogenèse induite par les LDL oxydées	159
2.5.1. Les connexines sont impliquées dans la signalisation angiogénique des LDL oxydées	160
2.5.2. Les inhibiteurs de connexines inhibent la voie des sphingolipides sous l'effet des LDL oxydées à doses angiogéniques	161
<b>CONCLUSION GENERALE – PERSPECTIVES</b>	165
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	173
<b>ANNEXES</b>	193



## **REVUE GENERALE BIBLIOGRAPHIQUE**





## 1. STRUCTURE DE LA PAROI ARTERIELLE NORMALE :

La paroi artérielle est généralement constituée par 3 couches histologiques. L'endothélium, ou intima, qui constitue la couche interne au contact du sang repose sur une limitante élastique interne. La media représente la couche intermédiaire, et est constituée de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire (MEC) qui est composée d'élastine, de collagène, de glycoprotéines de structure et de protéoglycanes. La proportion cellules/MEC et la composition de cette matrice varient selon le type d'artère. L'adventice faite de tissu conjonctif lâche de cellules fibroblastiques est la tunique la plus externe et contient des vaisseaux nourriciers, les vasa vasorum, au niveau des artères de gros et moyen calibre.

La structure de la paroi vasculaire varie notablement selon le type d'artère et selon les fonctions et les contraintes qu'elle subit (en particulier pression, type de flux hémodynamique, morphologie, ...).

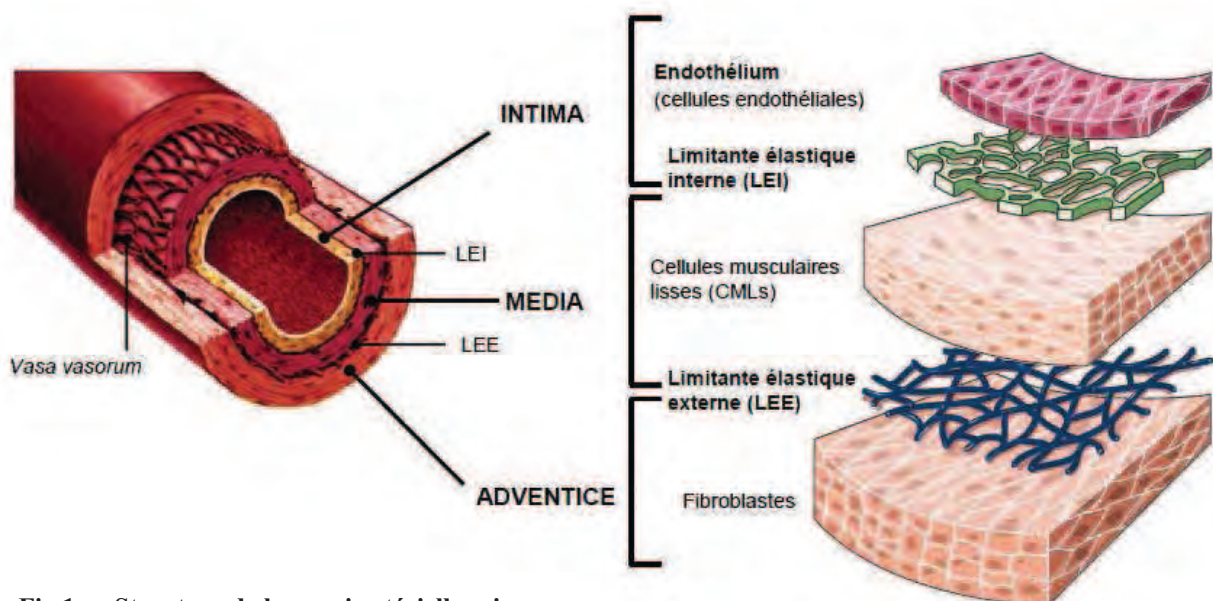


Fig 1. Structure de la paroi artérielle saine.

### 1.1. Les différentes tuniques vasculaires artérielles

Les trois tuniques principales des vaisseaux artériels sont séparées par des lames élastiques. Dans cette paroi artérielle on retrouve donc de la lumière artérielle vers la périphérie :

- L'intima, monocouche de cellules endothéliales (endothélium pavimenteux simple), repose sur du tissu conjonctif et une lame basale. Les cellules endothéliales sont jointives grâce à des jonctions serrées qui ont un rôle mécanique et des jonctions communicantes responsables du couplage électrochimique intercellulaire.
- La limitante élastique interne, très épaisse dans les artères musculaires.
- La média, dont l'épaisseur varie selon le niveau d'arborescence vasculaire et le diamètre des artères (importante pour les artères de gros et moyen calibre et plus fine pour les artères de petit calibre). Elle est essentiellement composée de cellules musculaires lisses, de fibres élastiques et de matrice extracellulaire. Cette MEC joue un rôle de support physique (soutien, élasticité, résistance à l'étirement) et de régulateur des cellules environnantes.
- La limitante élastique externe, moins épaisse que l'interne et absente des artères de petit calibre,

- L'adventice, enveloppe conjonctive qui contient les vasa vasorum (réseau de microcapillaires représentant la vascularisation propre de la paroi artérielle).

## 1.2. Les différents types d'artères

On distingue différents types d'artères selon leur diamètre, leur situation dans l'arbre vasculaire et leur fonction. On observe une transition entre les différents types décrits avec une réduction progressive du tissu élastique vers l'aval.

- **Les artères élastiques.** Ce sont les artères de plus gros calibre situées près du cœur, c'est-à-dire l'aorte, les troncs supra-aortique : tronc brachio-céphalique, carotides primitives et sous-clavières, les artères iliaques primitives, les artères rénales, et les artères pulmonaires. Ce sont des vaisseaux de conduction, de transmission et de conservation de la pression. Elles sont caractérisées par la présence de nombreuses fibres élastiques au niveau de la média, leur paroi est relativement mince par rapport à leur diamètre et elles s'étirent facilement sous la pression du sang en systole. Les fibres élastiques étirées représentent un 'réservoir' de pression capable de restituer l'énergie mécanique emmagasinée en énergie cinétique poussant le sang vers la périphérie au cours de la diastole. Les fibres élastiques reprennent alors leur degré d'étirement initial.

- **Les artères musculaires.** Ce sont des artères de moyen calibre comme les artères radiales, fémorales, tibiales, coronaires. Ce sont des vaisseaux de distribution. Leur média contient plus fibres musculaires et moins de tissu élastique que les artères élastiques. Cette caractéristique leur permet une grande capacité de vasoconstriction et de vasodilatation, ce qui permet de réguler la vitesse de l'écoulement sanguin vers les tissus.

- **Les artérioles.** Ce sont des petites artères qui apportent du sang aux capillaires. Leur diamètre est inférieur à 0,3 mm et leur intima, est réduite à l'endothélium reposant sur une lame basale. Les artérioles de 0,3 mm à 50  $\mu$  comportent une limitante élastique interne et 2 à 3 couches de cellules musculaires lisses, alors que les artérioles de moins de 50  $\mu$  sont habituellement dépourvues de limitante élastique interne et disposent d'une couche de cellules musculaires lisses circulaires. L'adventice est fine et constituée de fibres de collagènes, parfois de fibres élastiques et fusionne avec le tissu conjonctif environnant. Elle reçoit des afférences nerveuses. Les artérioles jouent un rôle vasomoteur fondamental, participent à la régulation du lit capillaire et sont essentiellement responsables des résistances périphériques (maintien de la pression artérielle).

- **Les capillaires.** Ce sont des vaisseaux microscopiques provenant des artérioles et se prolongeant ensuite par les veinules. Ils ne sont composés que d'une seule couche de cellules endothéliales et d'une lame basale. Ils sont présents à proximité de presque toutes les cellules mais leur distribution est variable en fonction de l'activité métabolique du tissu qu'ils desservent.

- **Les vasa vasorum.** Les artères d'un calibre supérieur à 1 mm sont vascularisées par un réseau microvasculaire nourricier propre, les « vasa vasorum ». Ces « vasa vasorum », issus de petites artères et veines cheminent le long des artères à desservir et se distribuent à l'adventice des artères normales. Cependant au niveau de l'aorte thoracique, l'épaisseur pariétale est telle que ces microvaisseaux pénètrent jusqu'aux 2/3 externes de la média, le 1/3 interne de la média et l'intima

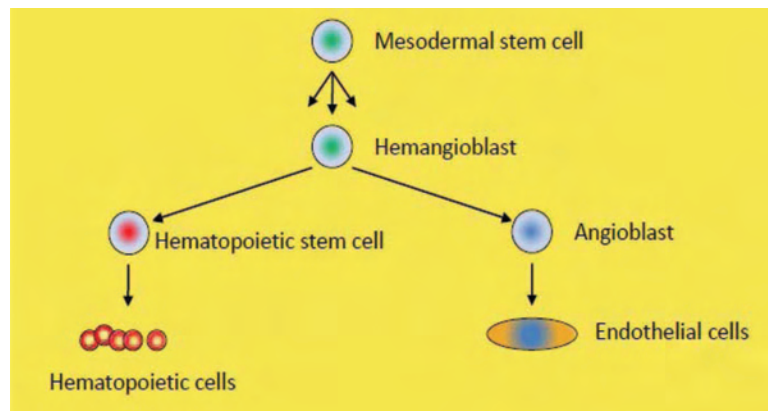
étant nourris par diffusion à partir de la lumière vasculaire. Dans les états pathologiques accompagnés d'un épaissement pariétal, en particulier intimal, on observe la pénétration des « vasa vasorum » dans la media et l'intima pathologique. C'est la vascularisation de la plaque d'athérome. (D'après « L'athérosclérose : physiopathologie, diagnostics, thérapeutiques », J.-F. Toussaint, M.-P. Jacob, L. Lagrost, J. Chapman. Ed Masson 2003 ; et d'après le cours d'Histologie 2007-2008 « organes, systèmes et appareils » Pr. M. Catala, Dr J.-M. André et Pr. J. Poirier, faculté de médecine Pierre et Marie Curie)



## 2. ANGIOGENESE :

### 2.1. L'origine des vaisseaux sanguins, la vasculogénèse

Le système cardiovasculaire est le premier organe à apparaître chez l'embryon. La surface interne du système circulatoire en contact avec le sang est constituée de cellules endothéliales qui dérivent du mésoderme. Les hemangioblastes sont issus des cellules souches mésodermiques et sont eux-mêmes à l'origine des cellules souches hématopoïétiques et des angioblastes (voir figure 2). Ces angioblastes sont les précurseurs des cellules endothéliales mais n'en n'ont pas encore acquis toutes les caractéristiques (Risau 1995; Risau 1997; Schmidt, Brixius et al. 2007). D'après Thomas H. Adair and Jean-Pierre Montani, "Angiogenesis", Morgan & Claypool Life Sciences series 2011.

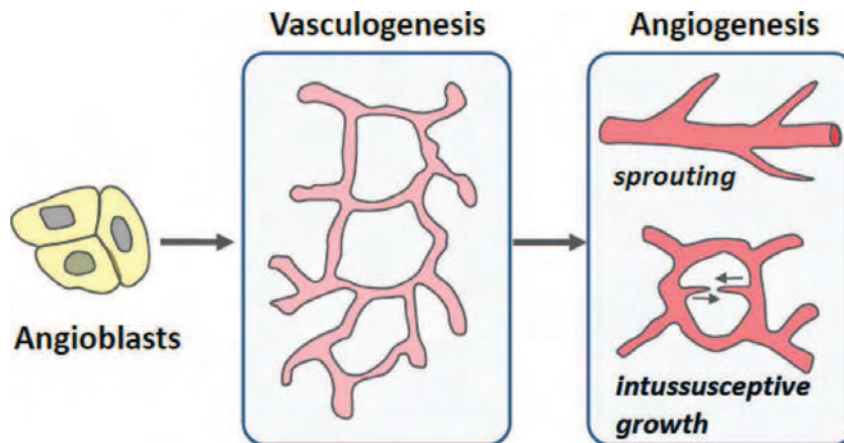


**Fig 2. Origine des cellules endothéliales et hématopoïétiques.** Chez l'embryon, les hémangioblastes issus des cellules souches mésodermiques, sont à l'origine des cellules souches hématopoïétiques et des angioblastes. Les angioblastes se différencient ensuite en cellules endothéliales, et les cellules souches hématopoïétiques sont à l'origine des différents types de cellules sanguines circulantes. (D'après Schmidt, Brixius et al. 2007).

La vasculogénèse est la formation de vaisseaux sanguins *de novo* à partir des angioblastes. Elle se déroule dans les tissus intra et extra-embryonnaires de l'embryon. C'est un processus dynamique qui implique des interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire guidées dans le temps et dans l'espace par des facteurs de croissance et des contraintes mécaniques. Ce processus inclut la transformation des cellules souches mésodermiques en angioblastes qui s'organisent ensuite en îlots sanguins au sein desquels ils donnent naissance aux cellules endothéliales qui s'organisent en tubules se réunissant en plexus vasculaires assez peu organisés (Risau 1995; Schmidt, Brixius et al. 2007).

### 2.2. Définition de l'angiogénèse

Ce réseau capillaire primitif (plexus vasculaire formé à partir des cellules endothéliales au sein des îlots sanguins) est remodelé par angiogénèse (croissance, différenciation et organisation des plexus vasculaires primitifs) pour aboutir à la formation d'un réseau vasculaire hiérarchisé et fonctionnel (voir figure 3). L'angiogénèse correspond donc à la formation de néovaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants et se déroule aussi bien pendant la période embryonnaire qu'à l'âge adulte dans diverses situations physiologiques (cicatrisation, adaptation du muscle squelettique à l'exercice physique prolongé, utérus au cours de la grossesse ou des cycles menstruels) ou pathologiques (le diabète, le cancer et l'athérosclérose).



**Fig 3. Représentation schématique de la vasculogénèse et de l'angiogénèse chez l'embryon.** (Carmeliet and Collen 2000).

L'angiogénèse est un terme générique qui définit cette croissance vasculaire mais on peut parler plus précisément d'artériogénèse, de veinogénèse ou de lymphangiogénèse, selon la nature du vaisseau considéré. Le terme de néovascularisation signifie la formation d'un vaisseau sanguins chez l'adulte quelque soit sa nature ou sa taille.

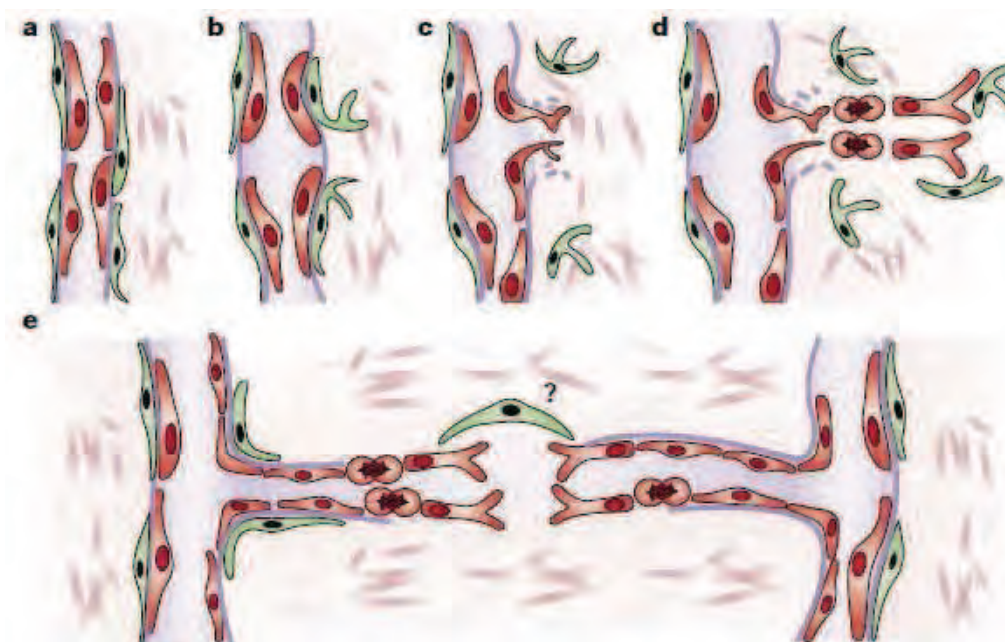
### **2.3. Les différents types d'angiogénèse**

Deux principaux mécanismes d'angiogénèse sont actuellement admis : l'angiogénèse par bourgeonnement (*sprouting angiogenesis*) et l'angiogénèse par intussuseption (*splitting angiogenesis*).

#### **2.3.1. Angiogénèse par bourgeonnement (sprouting angiogenesis)**

L'angiogénèse par bourgeonnement nécessite une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire pour permettre la prolifération et la migration des cellules endothéliales, qui activées par différents facteurs de croissance (notamment le VEGF A) émettent des excroissances cytoplasmiques, les « filopodes », vers la source de VEGF. C'est la tubulogénèse. Les péricytes se détachent les premiers de la paroi vasculaire et de la matrice extracellulaire environnante par protéolyse de ses composants grâce à l'activation de métalloprotéases. Les cellules endothéliales prolifèrent, migrent et perdent leurs contacts permettant une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire à l'origine d'une extravasation de protéines plasmatiques qui serviront de support pour la re-synthèse de matrice extracellulaire à la fin du processus. Dans le même temps, une cellule endothéliale se met à faire des expansions cytoplasmiques (les filipodes) dans le sens du gradient de VEGF A généré par le tissu en hypoxie (Horowitz and Simons 2008; Carmeliet and Jain 2011). Cette cellule « de tête » (tip cell) va diriger le bourgeonnement en développant plusieurs filipodes qui contiennent des enzymes protéolytiques permettant la digestion de la matrice extracellulaire environnante (Small, Stradal et al. 2002; van Hinsbergh and Koolwijk 2008). Consécutivement à la polarisation des cellules endothéliales une lumière vasculaire est progressivement créée et le néovaisseau est ensuite stabilisé grâce à l'interaction des cellules endothéliales avec des péricytes et des cellules musculaires lisses. Enfin une nouvelle lame basale est synthétisée (Carmeliet 2003; Hillen and Griffioen 2007).



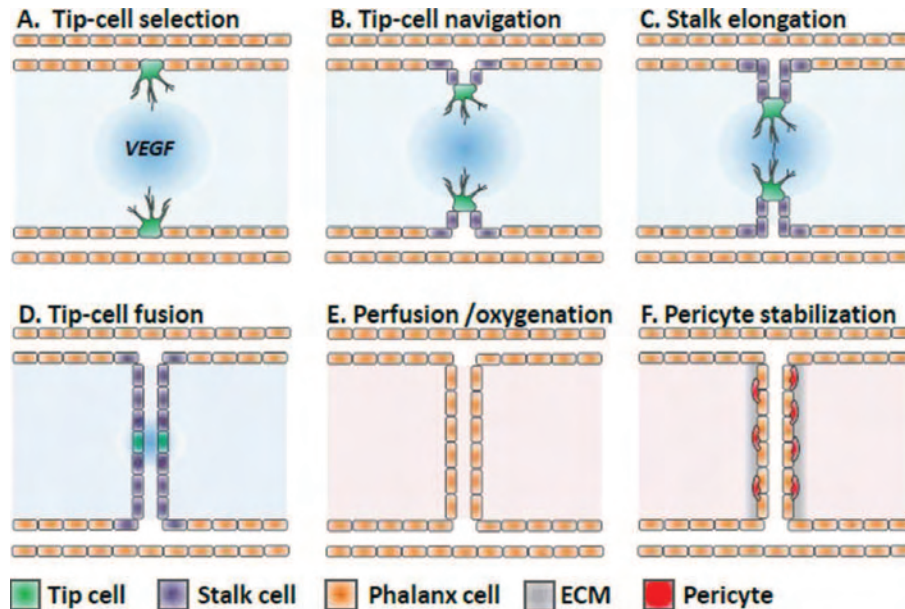


**Fig 4. Angiogenèse par bourgeonnement.** (a) Les nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir de vaisseaux pré-existants. (b) Les péricytes (verts) se détachent en premier de la paroi et le vaisseau se dilate avant que la membrane basale et la matrice extracellulaire soient dégradées. (c) Ceci permet aux cellules endothéliales (rouges) de migrer dans l'espace périvasculaire sous l'effet de stimuli angiogéniques produits par les cellules environnantes. (d) Les cellules endothéliales prolifèrent, et migrant dissociées les unes des autres dans une même direction, probablement guidées par les péricytes. (e) A l'arrière de la colonne de migration, les cellules endothéliales redeviennent cohésives et créent une lumière vasculaire. Ce processus est accompagné de la formation d'une membrane basale sur la quelle s'attachent les péricytes. Le nouveau vaisseau va fusionner avec un autre bourgeonnement pour devenir fonctionnel et permettre la circulation du sang. (Bergers and Benjamin 2003).

Cette angiogénèse par bourgeonnement permet d'ajouter des vaisseaux sanguins à des zones de tissus qui en étaient auparavant dépourvues. Elle est en général initiée dans des tissus faiblement perfusés lorsque des senseurs d'oxygénation détectent un niveau d'hypoxie qui nécessite une néovascularisation pour satisfaire les besoins métaboliques locaux en oxygène. Beaucoup de cellules parenchymateuses telles que les hépatocytes, les neurones, les astrocytes, les monocytes, peuvent répondre à un environnement hypoxique (diminution des apports en oxygène ou augmentation des besoins lors d'un processus inflammatoire ou tumoral) en sécrétant du VEGF A (Vascular Endothelial Growth Factor), le principal facteur proangiogénique, mais aussi du VEGF C, de l'angiotensine-2, du FGF (Fibroblast Growth Factor) ou diverses chemokines (Gerhardt 2008).

Les filipodes de la cellule de tête (tip cell) sont riches en VEGFR-2 ce qui leur permet de détecter les gradients de VEGF A et de diriger le bourgeonnement dans le sens de ce gradient. Une fois que la cellule a généré suffisamment de filipodes, une contraction des filaments d'actine dans ces expansions cytoplasmiques tracte littéralement la cellule vers le stimulus (VEGF). L'élongation du bourgeonnement va se faire grâce à la prolifération et l'étirement des autres cellules endothéliales (stalk cell) à la suite de la première, qui vont former « un tube » de cytoplasme. Lorsque deux cellules présentant des filipodes (tips cells) à la tête de deux bourgeons se rencontrent à la source de sécrétion de VEGF A, les bourgeons fusionnent et une lumière vasculaire se crée. Il est possible que des cellules myéloïdes viennent faire le « pont » entre deux bourgeons pour aider à la mise en continuité des deux tubes cytoplasmiques (voir chapitre sur la vasculogénèse post-natale). Le capillaire néoformé est stabilisé par le recrutement de péricytes, la synthèse de matrice

extracellulaire et un arrêt de sa dégradation (synthèse de TIMPs et de PAI-1), ainsi que des forces de cisaillement et autres contraintes mécaniques associées au flux sanguin et à la pression sanguine. En effet l'absence de perfusion d'un vaisseau induit sa régression (Chien 2007; Carmeliet, De Smet et al. 2009; Carmeliet and Jain 2011)

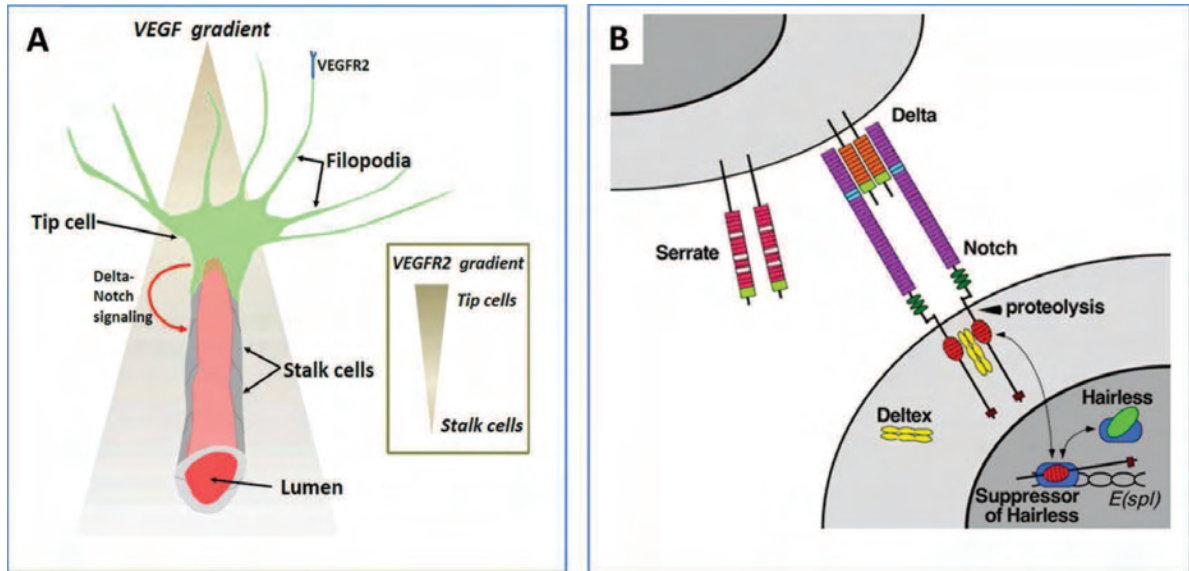


**Fig 5. Bourgeonnement vasculaire guidé par une source de VEGF.** La cellule exposée aux plus fortes concentrations de VEGF devient la cellule de tête (tip cell en vert) qui guide le sens du bourgeonnement dans le sens du gradient de VEGF généré par les tissus hypoxiques. Le bourgeonnement s'allonge grâce à la prolifération des cellules endothéliales à l'arrière de la cellule de tête (stalk cells en gris). Deux cellules de tête provenant de deux bourgeonnements en vis-à-vis fusionnent pour créer une lumière vasculaire permettant le rétablissement de la circulation sanguine au niveau des tissus hypoxiques, ce qui induit l'arrêt de la sécrétion de VEGF. Le néovaisseau est stabilisé par le recrutement de péricytes (en rouge), la sécrétion de matrice extracellulaire (en gris), le shear stress et d'autres forces mécaniques associées au flux sanguin et à la pression artérielle. (Carmeliet, De Smet et al. 2009).

Pour construire un « tube » vasculaire structuré et ne pas induire une migration en masse de plusieurs cellules endothéliales, il existe un système de contrôle de la sélection de la cellule de tête (tip cell) et du développement de ce bourgeonnement, dépendant du récepteur Notch et de son ligand Delta-like-4. Le ligand et le récepteur sont portés par des cellules endothéliales adjacentes, de telle façon que la liaison du récepteur à son ligand ne peut se faire qu'en présence d'un contact intercellulaire (figure 6). La présence de VEGF A induit la synthèse du ligand Delta-like-4 par les cellules « tip », ce qui induit l'activation du récepteur Notch sur les cellules adjacentes qui vont devenir les cellules de la tige du bourgeon (stalk cells). L'activation de Notch s'accompagne d'une protéolyse du récepteur et d'un transfert nucléaire de son fragment cytosolique clivé qui bloque la transcription de gène du VEGFR-2. Ces cellules ne développeront pas de filopodes sous l'effet du VEGF A mais auront un potentiel plus prolifératif que la cellule de tête (tip cell). (Suchting, Freitas et al. 2007; Horowitz and Simons 2008; Carmeliet, De Smet et al. 2009)

La régulation de l'angiogenèse se fait surtout au niveau de la génération de VEGF: lorsque l'angiogenèse est efficace et amène du sang au niveau du tissu, l'apport d'O<sub>2</sub> diminue l'hypoxie et la production de VEGF consécutive induisant l'arrêt du processus angiogénique.





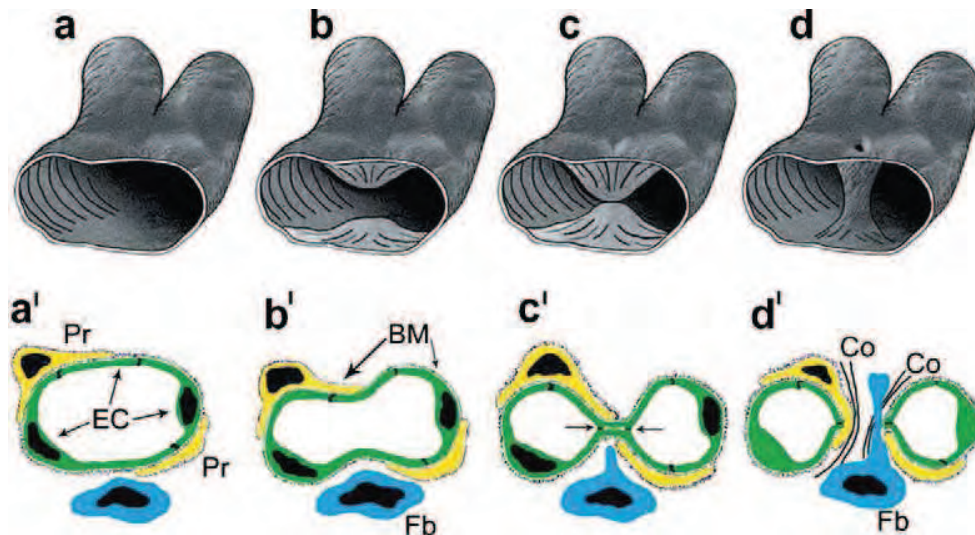
**Fig 6. Microanatomie du bourgeon capillaire et sélection de la cellule de tête.** (A) Le gradient interstitiel de VEGF induit un gradient d'expression de VEGFR2 au niveau de l'endothélium. La migration de la cellule de tête dépend du gradient de VEGF en réponse auquel elle exprime le VEGFR2. La prolifération des cellules de la tige du bourgeon est régulée de façon indirecte par le VEGF grâce à la signalisation Delta-Notch. (B) Le VEGF induit l'expression du ligand Delta-like-4 par la cellule de tête qui se lie au récepteur Notch des cellules adjacentes, induisant le clivage protéolytique du récepteur et la translocation nucléaire de son fragment cytosolique à l'origine d'un signal de prolifération et d'une diminution de l'expression du VEGFR2. (Carmeliet and Tessier-Lavigne 2005).

### **2.3.2. Angiogenèse par intussusception (intussusceptive/splitting angiogenesis)**

L'angiogenèse par intussusception permet la formation de néovaisseaux par subdivision d'un vaisseau ou d'un plexus vasculaire pré-existant passant par l'élargissement du diamètre vasculaire suivi de la création de piliers dans la lumière vasculaire à partir de l'endothélium (Djonov, Schmid et al. 2000; Burri and Djonov 2002; Burri, Hlushchuk et al. 2004; Gianni-Barrera, Trani et al. 2013). La découverte de l'angiogenèse par intussusception a été permise il y a une vingtaine d'années grâce à la mise en évidence d'un réseau de piliers transcapillaires en microscopie électronique sur des poumons de rats ou de poulets nouveau nés (Caduff, Fischer et al. 1986; Burri and Tarek 1990).

Ce type de remodelage vasculaire est beaucoup plus rapide que le bourgeonnement et plus économique d'un point de vue énergétique car il ne nécessite dans un premier temps qu'une réorganisation des cellules endothéliales préexistantes, et n'est pas forcément immédiatement suivi d'une prolifération et d'une migration de cellules vasculaires.

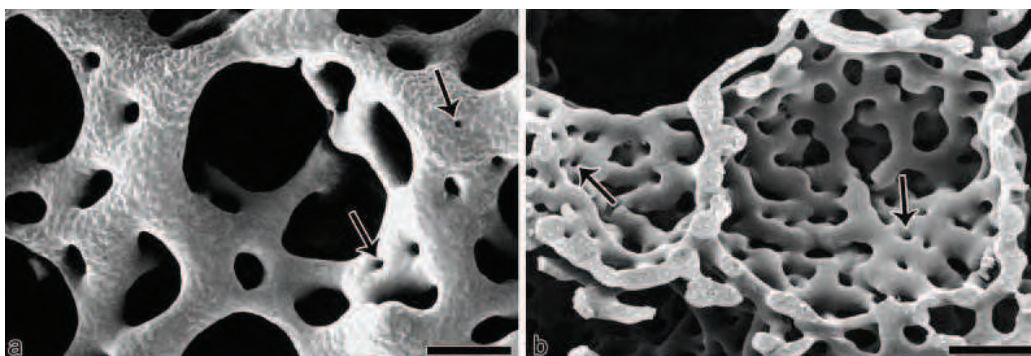
L'angiogenèse par intussusception peut survenir tout au long de la vie mais joue un rôle prédominant dans le développement vasculaire embryonnaire où la croissance est rapide et les ressources limitées (Djonov, Baum et al. 2003; Kurz, Burri et al. 2003). Elle se développe principalement dans des zones de tissus ou d'organes où des capillaires existent déjà.



**Fig 7. Schématisation de la formation de piliers transluminaux lors de l'angiogenèse par intussusception.** La protrusion simultanée des parois vasculaires opposées dans la lumière vasculaire (a,b; a',b') aboutit à la création d'une zone de contact inter-endothéliale (c; c') Par la suite, la bicouche endothéliale se perforé et l'intérieur du pilier néoformé est envahi de fibroblastes (Fb), de péricytes (Pr), et de fibres de collagène (Co in d'). (Ribatti and Djonov 2012).

Du fait de la connaissance assez récente de ce mode d'angiogenèse, mise en évidence grâce à la microscopie électronique (figure 8), les mécanismes de contrôle du « splitting » sont encore peu connus. L'angiogenèse par intussusception peut toutefois être stimulée sur une membrane chorioallantoïque d'embryon de poulet par application locale de VEGF A. Ce processus de mise en œuvre assez simple permettra sûrement d'accroître rapidement les connaissances dans ce domaine. Il est probable que plusieurs facteurs de croissance interviennent et que les contraintes mécaniques de pression du flux sanguin jouent également un rôle (Djonov, Kurz et al. 2002; Kurz, Burri et al. 2003).

Il est admis que ces deux types d'angiogenèse (sprouting and splitting angiogenesis) peuvent se dérouler dans tous les types de tissus ou organes, aussi bien chez l'adulte que chez l'embryon.



**Fig 8. Microscopie électronique de la microvascularisation de poumons d'embryons de poulet (a) et de poumons de rats de 44 jours de vie (b).** Dans le deux espèces, nous observons en plus du réseau capillaire de taille normale, des petits trous (flèches) correspondant à l'extension de piliers à travers la lumière capillaire. (Burri, Hlushchuk et al. 2004).

### **2.3.3. Vasculogenèse post-natale**

Enfin, bien que la vasculogenèse soit essentiellement décrite lors des stades très précoces du développement embryonnaire, elle ne leur serait pas exclusive. Il peut exister un phénomène de vasculogenèse post natale chez l'adulte, chez qui il a pu être retrouvé des cellules progénitrices endothéliales circulantes (Urbich and Dimmeler 2004). Ces cellules pourraient participer dans une certaine mesure à la formation de nouveaux vaisseaux chez l'adulte sain (Asahara, Murohara et al. 1997; Asahara, Masuda et al. 1999; Ribatti 2007) mais aussi dans le cadre de l'angiogenèse tumorale ou post-ischémique après infarctus du myocarde ou dans le cadre de l'ischémie chronique des membres inférieurs (Kalka, Masuda et al. 2000; Kawamoto, Gwon et al. 2001; Kocher, Schuster et al. 2001; Urbich, Heeschen et al. 2003).

Alors que chez l'embryon ces cellules progénitrices endothéliales proviennent des angioblastes, chez l'adulte ces cellules progénitrices endothéliales peuvent provenir des cellules souches hématopoïétiques CD34+/CD133+/VEGFR2+ dérivées de la moelle osseuse (Peichev, Naiyer et al. 2000; Askari, Unzek et al. 2003; Ceradini, Kulkarni et al. 2004) ou de cellules myéloïdes CD14+/CD34- (monocytes et macrophages) elles mêmes dérivées des cellules souches hématopoïétiques (Schmeisser, Garlich et al. 2001; Urbich, Heeschen et al. 2003; Zhao, Glesne et al. 2003; Hur, Yoon et al. 2004). Elles peuvent aussi dériver de cellules progénitrices multipotentes non hématopoïétiques de la moelle osseuse (Ribatti 2007), notamment les cellules souches mésenchymateuses (Al-Khaldi, Eliopoulos et al. 2003; Oswald, Boxberger et al. 2004) ou des cellules progénitrices multipotentes adultes (-CD34-/VE-cadhérine-/AC133+) co-purifiées avec les cellules souches mésenchymateuses, qui peuvent se différencier en cellules endothéliales (CD34+, VE-cadhérine+/VEGF+) et induire une neovascularisation *in vivo* (Reyes, Dudek et al. 2002). Cette vascularisation serait potentialisée par la sécrétion d'agents proangiogéniques par ces cellules (vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), placental growth factor (PIGF), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) retrouvées à l'analyse du milieu extracellulaire) et agissant de façon paracrine en favorisant de la neoformation locale de capillaires (Kinnaird, Stabile et al. 2004).

Le sang de cordon contient un grand nombre de cellules souches hématopoïétiques CD133+/CD34+, comparé au sang périphérique adulte. Les cellules progénitrices endothéliales qui en dérivent ont une plus grande capacité de prolifération et d'angiogenèse que celles issues du sang périphérique (Murohara, Ikeda et al. 2000; Ingram, Mead et al. 2004).

Le tissu adipeux est également une source alternative de cellules souches autologues. Des études suggèrent que des cellules issues du stroma vasculaire du tissu adipeux pourraient être des progéniteurs (CD34+/CD133+/CD31+ou-) à l'origine d'une néovascularisation dans le cadre d'une ischémie chronique du membre inférieur chez la souris (Miranville, Heeschen et al. 2004). Les cellules souches du tissu adipeux et les adipocytes matures dédifférenciés peuvent acquérir rapidement les caractéristiques des cellules endothéliales *in vitro*, et potentialiser les phénomènes de vascularisation dans les tissus ischémiques *in vivo* chez la souris, suggérant l'existence d'un progéniteur commun avec les cellules endothéliales, à l'origine du potentiel angiogénique de la lignée adipeuse (Planat-Benard, Silvestre et al. 2004; Harada, Yamamoto et al. 2013)

Des cellules souches somatiques (tissue-resident stem cells) c'est-à-dire des progéniteurs d'une lignée cellulaire d'organe comme les cellules souches cardiomyocytaires (Beltrami, Barlucchi et al. 2003) et même des cellules souches d'origine nerveuse pourtant d'origine ectodermique (Wurmser,

Nakashima et al. 2004) peuvent également se différencier en cellules endothéliales témoignant de la remarquable plasticité tissulaire de notre organisme.

Alors que ces trois types d'angiogenèse (vasculogenèse post natale, bourgeonnement et intussusception) permettent une vascularisation de tissus ou d'organes chez l'adulte sain, il existe en plus, dans le cadre de la maladie cancéreuse des modes de vascularisation particuliers des tissus tumoraux que nous allons rapidement passer en revue.

Les cellules cancéreuses peuvent détourner des vaisseaux préexistants pour assurer leur propre vascularisation de façon rapide sans stimulation de l'angiogenèse ni différenciation de cellules souches en cellules endothéliales. Ce mécanisme de cooptation vasculaire (vascular co-option) explique la résistance de certaines tumeurs à l'utilisation de chimiothérapies anti-angiogéniques (Leenders, Kusters et al. 2002).

Les cellules cancéreuses, pourvues d'une grande plasticité, peuvent aussi s'organiser en châteaux vasculaires par imitation vasculaire (vascular mimicry). Bien qu'elles ne se transforment pas en cellules endothéliales, ces cellules cancéreuses peuvent exprimer des marqueurs endothéliaux leur permettant de s'anastomoser avec des vaisseaux préexistants (Paulis, Soetekouw et al.).

Enfin, il peut exister une trans-différenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales. Ces « cellules endothéliales dérivées de la tumeur » (TDEC pour Tumeur Derived Endothelial Cell) vont s'insérer dans l'endothélium et participer au développement vasculaire au sein de la tumeur (Carmeliet 2003; Wang, Chandalavada et al. 2010; Carmeliet and Jain 2011).

## **2.4. Mécanismes de régulation de l'angiogenèse**

L'équilibre dynamique entre facteurs angiogéniques et angiostatiques conduit à une modulation de l'angiogenèse qui conduit soit à un accroissement soit à une stabilisation voire même à une régression du réseau vasculaire. Un grand nombre de facteurs de nature très variée peuvent intervenir : des molécules de signalisation, des protéines ou des enzymes de la matrice extracellulaire, des paramètres hémodynamiques, des variations de l'oxygénation tissulaire ou l'activité métabolique cellulaire peuvent influencer l'angiogenèse de plusieurs manières. L'intégration de ces différents facteurs est extrêmement complexe et leurs modes d'action ne sont pas encore entièrement connus.

### **2.4.1. Facteurs métaboliques et moléculaires**

La croissance vasculaire est proportionnelle à l'activité métabolique du tissu ou de l'organe vascularisé. Ces phénomènes ont surtout été étudiés au niveau des muscles striés squelettiques qui présentent plusieurs types de fibres (métaboliquement différentes) au sein d'un même muscle. Il a été décrit que la densité en capillaires est corrélée à la capacité oxydative des fibres (liée à leur richesse en mitochondries), la densité capillaire des fibres oxydative étant deux fois plus importante que celle des fibres glycolytiques au sein d'un même muscle (Adair, Gay et al. 1990). Il est aujourd'hui largement reconnu que l'augmentation de l'activité métabolique d'un tissu ou d'un organe induit une augmentation de la densité capillaire en son sein, notamment liée à l'augmentation des besoins en oxygène (hypoxie relative) et à la génération secondaire de métabolites à potentiel angiogénique (Wagner 2001; Terjung, Zarzeczny et al. 2002).



### 2.4.1.1. L'hypoxie et HIF

La régulation de l'angiogenèse par l'hypoxie est une composante importante des mécanismes homéostatiques qui lient l'apport vasculaire en oxygène à la demande métabolique des tissus. En effet l'hypoxie est un des plus puissants stimuli de l'angiogenèse, qui agit via la stabilisation des facteurs de transcription HIF (Hypoxia Inductible transcription Factor) (Huang, Gu et al. 1998; Wiesener, Turley et al. 1998; Razban, Lotfi et al. 2012; Farhang Ghahremani, Goossens et al. 2013). Ces facteurs transcriptionnels sont des hétérodimères, constitués de deux protéines : une sous-unité  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ) constitutive du noyau cellulaire, également connue sous le nom de ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*) et une sous-unité  $\alpha$  cytosolique (HIF $\alpha$ ), régulée par l'oxygène (inductible par l'hypoxie) (Wenger 2002; Semenza 2004; Berra, Ginouves et al. 2006).

Ces deux sous-unités ont une structure similaire. Du côté N-terminal on retrouve des séquences basiques en hélice-boucle-hélice (bHLH) qui constituent le domaine de liaison à l'ADN. Il y a ensuite un domaine PAS (Per = period circadian protein – Arnt = aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein – Sim = single-minded protein), d'interaction entre les 2 monomères. Sur HIF  $\alpha$ , il y a en plus un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODD pour Oxygen Dependant Degradation domain) et deux domaines de transactivation coté C-terminal dont l'un est chevauchant avec le domaine ODD, et qui sont les domaines de liaison aux autres facteurs co-activateurs de transcription. On ne retrouve qu'un domaine de transactivation C-terminal sur HIF-1 $\beta$ .

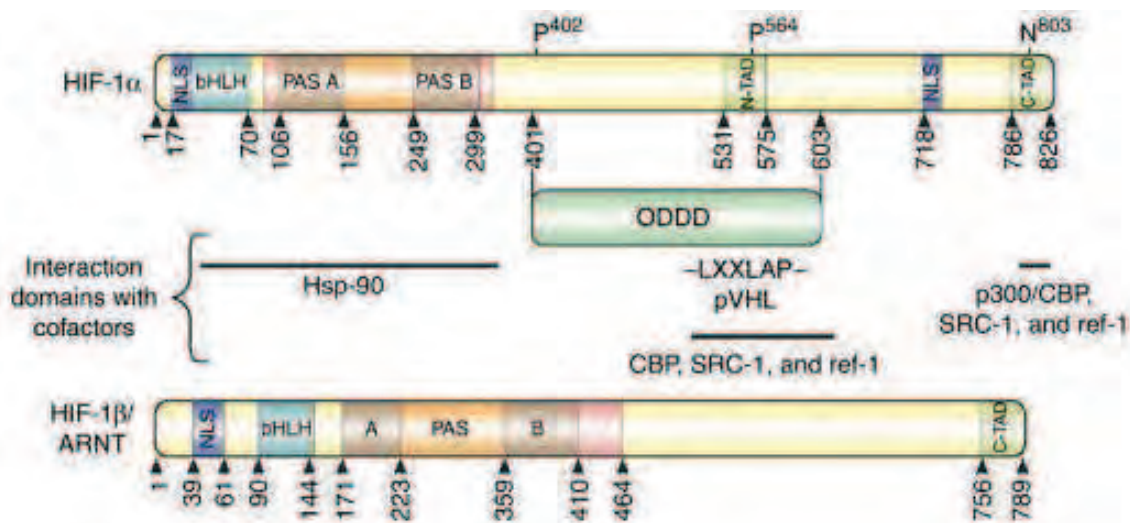


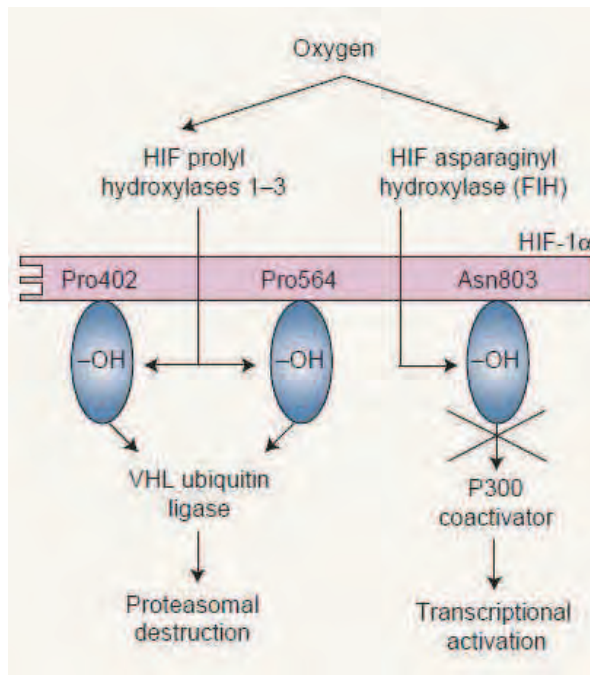
Fig 9. Structure de HIF1alpha et HIFbêta. (Rezvani, Ali et al. 2011).

Deux isoformes de la sous-unité HIF $\alpha$  ont été identifiées comme jouant un rôle majeur dans la réponse transcriptionnelle à l'hypoxie : HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ . Ces deux formes sont régulées d'une manière très similaire au niveau post-traductionnel par leur destruction oxygène-dépendante via la voie ubiquitine-protéasome en condition normoxique (Pugh and Ratcliffe 2003).

En effet, en présence d'oxygène, deux résidus proline, bien définis (P402 and P564 chez l'Homme) dans le domaine ODD, sont hydroxylés par des prolyl-hydroxylases, véritables sensors de l'oxygène. Cette hydroxylation permet la liaison de HIF $\alpha$  à un complexe (VHL E3 pour von-Hippel-Lindau E3 ubiquitine-ligase) qui le dirige vers la destruction protéasomale (Huang, Gu et al. 1998). Chaque résidu hydroxylé pouvant interagir indépendamment avec VHL E3, il existe une dégradation extrêmement rapide de HIF de façon constitutive en présence d'oxygène (Pugh and Ratcliffe 2003).

En effet sa demi-vie est de 5 min dans des cellules cultivées dans une atmosphère à 21% d'oxygène (taux identique à celui de l'oxygène dans l'air ambiant) (Berra, Ginouves et al. 2006). Il est à noter que la présence de plusieurs prolyl-hydroxylases régulées de façon différente selon les tissus explique les variabilités de réponse à l'hypoxie en fonction du type cellulaire considéré. (Berra, Ginouves et al. 2006).

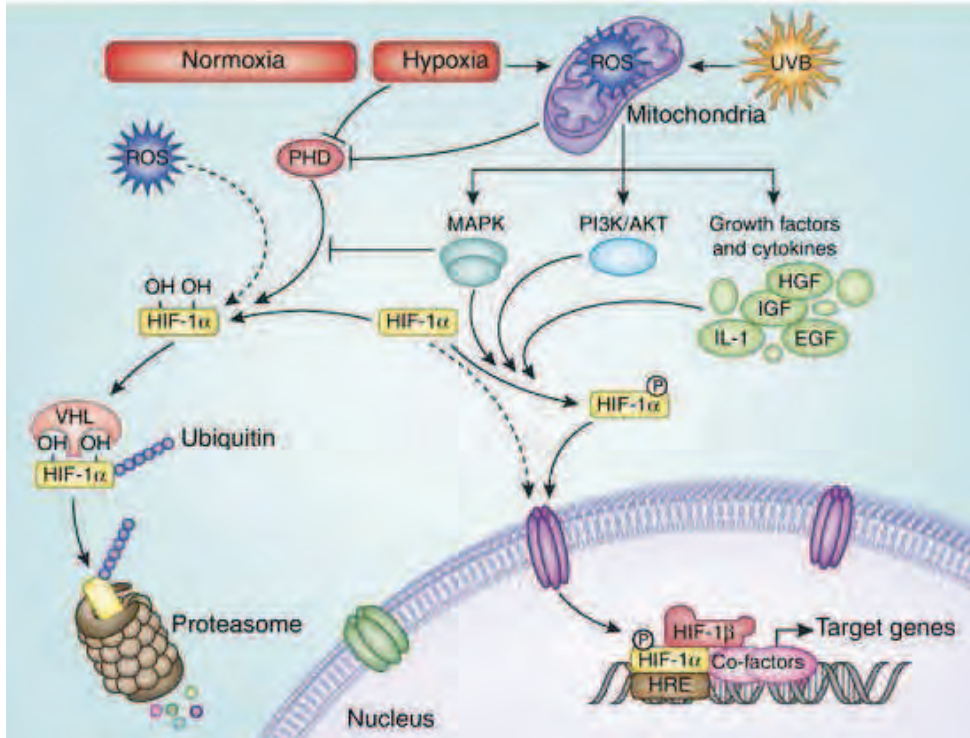
De façon concomitante, l'hydroxylation d'un résidu asparagine de l'extrémité C-terminale de HIF (en position 803 chez l'Homme) par une HIF-asparaginyl hydroxylase, l'empêche de se fixer à son co-activateur transcriptionnel (p300), bloquant ainsi son site de transactivation et son activité transcriptionnelle (Pugh and Ratcliffe 2003; Rezvani, Ali et al. 2011).



**Fig 9. Double régulation des sous-unités HIF- $\alpha$  par prolyl- et asparaginyl-hydroxylation.** Les résidus d'hydroxylation représenté correspondent au polypeptide HIF-1 $\alpha$  humain. (Pugh and Ratcliffe 2003).

En condition hypoxique, le manque d'oxygène disponible pour jouer le rôle de substrat dans la réaction d'hydroxylation, empêche l'orientation de HIF $\alpha$  vers la voie destructrice. Il s'accumule alors dans le cytosol où il est phosphorylé via la voie des MAP kinases et PI3K/Akt ce qui le stabilise et favorise sa liaison avec ses co-activateurs (Rezvani, Ali et al.). Grâce à la présence d'un signal de localisation nucléaire sur l'extrémité N-terminale, HIF transloque ensuite de façon autonome dans le noyau cellulaire afin de former un complexe fonctionnel avec HIF-1 $\beta$  et des co-activateurs transcriptionnels (notamment p300) (Wenger 2002).

La liaison de l'hétérodimère HIF $\alpha$   $\beta$  aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) sur des gènes cibles de HIF recrute le complexe transcriptionnel complet et initie la transcription de nombreux gènes codant pour divers facteurs angiogéniques, comme celui codant pour le VEGF, mais aussi pour son récepteur le VEGFR, celui de l'Angiopoïétine-2, ou de la NO synthase (iNOS) (Carmeliet, Dor et al. 1998; Iyer, Kotch et al. 1998; Chavez, Agani et al. 2000; Semenza 2000; Semenza 2001; Pugh and Ratcliffe 2003). Et d'après Wiesener Bernhardt et Eckardt. FLAMMARION MÉDECINE-SCIENCES — Actualités Néphrologiques 2008.

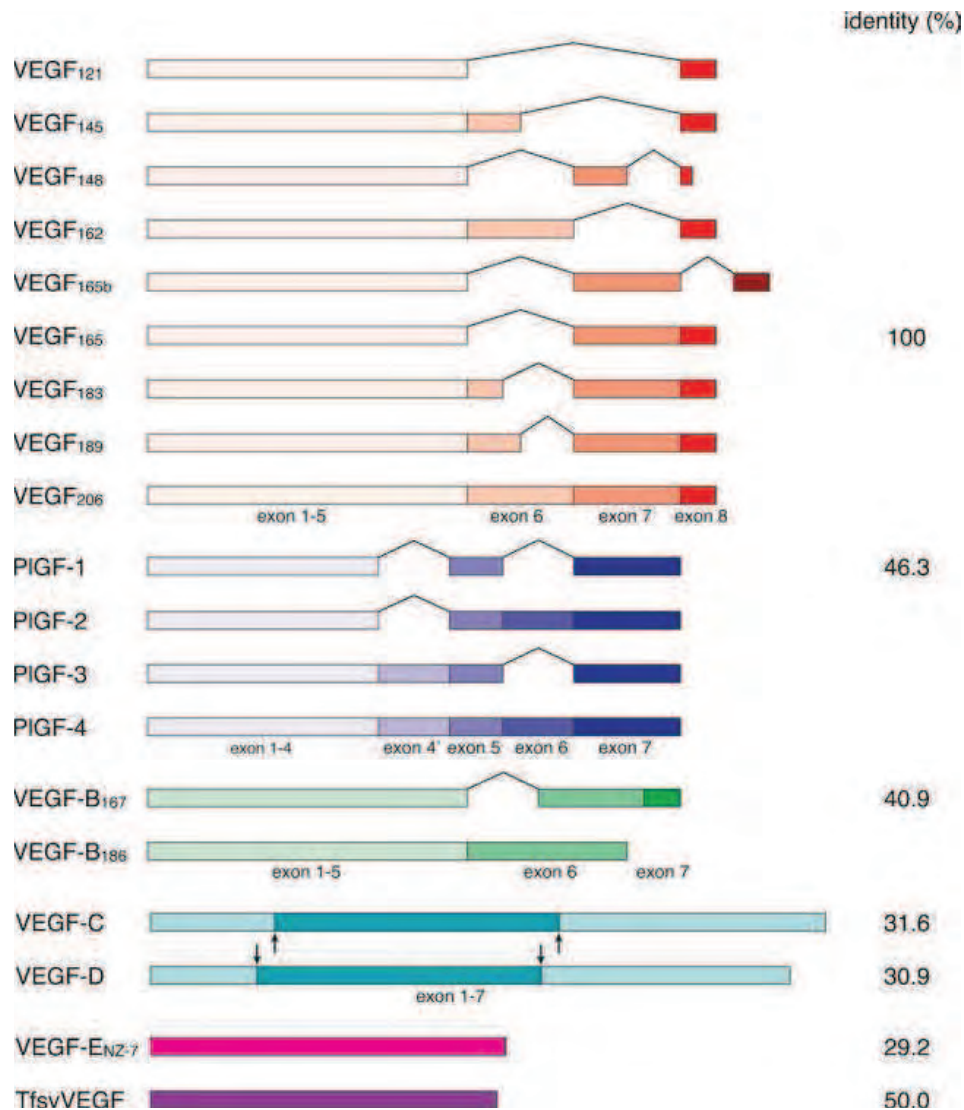


**Fig 10. Régulation de l'activité de HIF- $\alpha$  et de HIF- $\beta$ .** En condition normoxique HIF- $\alpha$  est hydroxylé sur des résidus proline conduisant à sa dégradation protéasomale. Son hydroxylation sur un résidu asparagine empêche sa liaison avec des activateurs transcriptionnels. L'hypoxie conduit à un dysfonctionnement des hydroxylases, empêchant l'hydroxylation de HIF- $\alpha$  qui lie alors des activateurs transcriptionnels et transloque dans le noyau où il se complexe à HIF- $\beta$ , induisant la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'angiogenèse. (Rezvani, Ali et al. 2011).

#### 2.4.1.2. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

La découverte, il y a une vingtaine d'années, de la régulation du facteur pro-angiogénique, le VEGF, par l'hypoxie (Shweiki, Itin et al. 1992) a été largement confirmée depuis (Minchenko, Bauer et al. 1994; Brogi, Schatteman et al. 1996). Le VEGF (ou **VEGF A**) est l'inducteur le plus important de l'angiogenèse physiologique et pathologique (Fong, Rossant et al. 1995; Shalaby, Rossant et al. 1995). Il appartient à la super famille de gènes du PDGF dont les facteurs contiennent tous 8 résidus cystéine à la même position à l'origine de la formation de ponts disulfures, trois ponts intrachaine et deux ponts interchaîne qui permettent l'homodimérisation du VEGF (Muller, Christinger et al. 1997; Shibuya 2001).

Le gène du VEGF A humain est organisé en huit exons et sept introns. L'épissage alternatif de son ARNm aboutit à la formation de plusieurs isoformes, les plus communes étant constituées de 121, 145, 165, 189 et 206 acides aminés (nommées respectivement VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 et VEGF206). La plupart des types cellulaires peuvent exprimer simultanément les différentes isoformes ; cependant le VEGF121 (forme la plus diffusible) et le VEGF165 (forme la plus pro-angiogénique) sont les formes majoritairement sécrétées par les cellules, suivies du VEGF189 (Bates, Cui et al. 2002; Bates, Hillman et al. 2002; Takahashi and Shibuya 2005).



**Fig 11. Comparaison de la structure des composants de la famille du VEGF/PDGF.** L'épissage alternatif du messager conduit à différentes isoformes de VEGF-A, PIGF and VEGFR-B. Les numéros à droite des structures indiquent le pourcentage d'homologie dans la séquence d'acides aminés, avec le VEGF-A 165. La position des flèches indique les sites de clivage donnant naissance aux formes matures du VEGF-C et VEGF-D. (Takahashi and Shibuya 2005).

Plus récemment, une nouvelle famille d'isoformes du VEGF A a été identifiée. Ces variants résultent d'un épissage alternatif différentiel en 3' au niveau de l'exon terminal 8 et ont été dénommés VEGFxxx (Ladomery, Harper et al. 2007). Sur le plan structural, les isoformes VEGFxxx et VEGFxxx b ont la même taille, mais possèdent 6 acides aminés différents au niveau de leur extrémité C-terminale, CDKPRR pour les isoformes VEGFxxx et SLTRKD pour les isoformes VEGFxxx b, impliquant possiblement une modification de la structure tertiaire et de la charge de la queue C-terminale (Eymin, 2013).

Sur le plan biologique, les isoformes VEGFxxx b sont capables de se lier au récepteur VEGF-R2 avec la même affinité que les isoformes VEGFxxx, mais elles ne l'activent pas complètement. Cette absence d'activation totale pourrait résulter de l'incapacité des isoformes VEGFxxx b à se lier au co-récepteur du VEGF-R2, la neuropiline-1 (voir chapitre sur le VEGFR). Sur le plan fonctionnel, par



exemple, l'isoforme VEGF165b inhibe tous les effets angiogéniques médiés par l'isoforme VEGF165 (Bates, Cui et al. 2002).

A coté de ce VEGF A, la super famille des gènes du PDGF/VEGF code pour d'autres facteurs à potentiel angiogénique :

Le gène du **PIGF (Placental Growth Factor)**, qui contient 7 exons et code pour 4 isoformes (PIGF<sub>131</sub>, PIGF<sub>152</sub>, PIGF<sub>203</sub> et PIGF<sub>224</sub>) issues de l'épissage alternatif de l'ARNm. Le PIGF possède 46 % d'homologie dans sa composition en acides aminés avec le VEGF-A, (voir figure 11), et reconnaît le VEGFR-1 mais pas le VEGFR-2. Il peut donc entrer en compétition avec le VEGF pour la liaison au VEGFR-1 favorisant ainsi la liaison du VEGF avec le VEGFR-2 considéré comme le principal récepteur à l'origine des effets angiogéniques du VEGF (Christinger, Fuh et al. 2004).

Le gène du **VEGF B** contient sept exons et l'épissage alternatif de l'exon 6 génère deux isoformes (VEGF B<sub>167</sub> et VEGF B<sub>186</sub>) qui peuvent également lier le VEGFR-1 et la NRP-1 (Hoeben, Landuyt et al. 2004; Raab and Plate 2007). Le VEGF B a un potentiel angiogénique environ 10 fois inférieur à celui du VEGF A (Shibuya 2008).

Le **VEGF C** et le **VEGF D** sont en général synthétisés sous forme pré-mature et doivent être clivés par protéolyses successives pour être reconnu par le VEGFR-3 (présent sur les vaisseaux lymphatiques) avec qui ils ont une forte affinité dans leur forme mature (Shibuya 2008). Le VEGF C peut aussi lier le VEGFR-2 et induire une signalisation angiogénique sur les cellules endothéliales mais dans une moindre mesure que le VEGF A (Raab and Plate 2007). Le VEGF C, comme le VEGF D, reste un fort régulateur de la lymphangiogenèse. Une délétion à l'état homozygote et même à l'état hétérozygote chez la souris entraîne une mort dans la période périnatale liée à des dysfonctions lymphatiques entraînant des œdèmes systémiques sévères et ainsi qu'une accumulation de lipides dans les liquides corporels (Shibuya 2008).

Le **VEGF E**, aussi connu sous le nom de *Orf* VEGF, est codé par le génome d'un parapox virus (*Orf* pour *Open Reading Frame*). Ce virus peut infecter les moutons et les chèvres et occasionnellement l'Homme. Il est responsable de lésions cutanées résultant d'une dilatation et d'une prolifération capillaire. Le VEGF E comprend cinq isoformes de 120 à 140 acides aminés avec huit résidus cystéines hautement conservés et similaires à ceux des autres membres de la famille PDGF/VEGF. Toutes les isoformes se lient au VEGFR-2 et à la NRP-1 mais pas au VEGFR-1 ni au VEGFR-3 (Ogawa, Oku et al. 1998; Wise, Veikkola et al. 1999). Il a toutefois un potentiel angiogénique 10 à 100 fois inférieur à celui du VEGF<sub>165</sub> en raison de l'absence de site de liaison à l'héparine sur sa séquence peptidique (Ogawa, Oku et al. 1998).

#### **2.4.1.3. Les VEGFR**

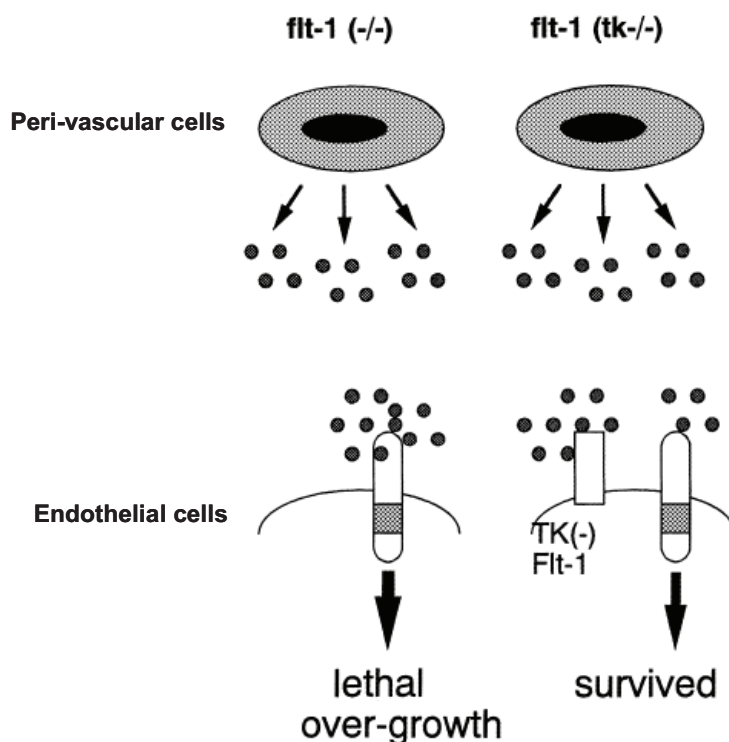
La transcription du gène du VEGF-R (récepteur du VEGF) peut aussi être stimulée par HIF sous l'effet de l'hypoxie (Tuder, Flook et al. 1995; Brogi, Schatteman et al. 1996; Waltenberger, Mayr et al. 1996; Gerber, Condorelli et al. 1997). Ce VEGFR, appartient à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase. Il en existe trois isoformes : **VEGFR-1** (*fms-like tyrosine kinase-1*, Flt-1), **VEGFR-2** (*fetal liver kinase-1*, Flk-1 pour sa version murine ou *kinase insert domain containing receptor*, KDR, pour son homologue humain), et **VEGFR-3** (*fms-like tyrosine kinase-4*, Flt-4). La

partie extracellulaire de ces récepteurs possède 7 domaines d'homologie aux immunoglobulines (Ig-like pour immunoglobulin-like). Comme pour de nombreux récepteurs à activité tyrosine kinase, la fixation du VEGF sur le VEGFR induit son homodimérisation et son autophosphorylation sur le domaine cytoplasmique à l'origine de son activité tyrosine kinase (Hoeben, Landuyt et al. 2004; Raab and Plate 2007; Shibuya 2013).

Chez l'adulte, le VEGFR-1 et le VEGFR-2 sont exprimés essentiellement au niveau des cellules endothéliales vasculaires, et sont impliqués dans l'angiogenèse, tandis que le VEGFR-3 est localisé principalement au niveau de l'endothélium lymphatique et est responsable de la signalisation lymphangiogénique. Toutes les isoformes du VEGF A se lient au VEGFR-1 et au VEGFR-2 mais pas aux VEGFR-3 (Shibuya 2008; Shibuya 2013).

Le VEGFR-1/Flt-1 a une forte affinité pour le VEGF A (dans toute ses isoformes) mais le niveau d'autophosphorylation du domaine cytoplasmique qui suit la fixation du ligand et l'homodimérisation du récepteur est assez faible, alors que le VEGFR-2 lie faiblement le VEGF A, mais cette liaison induit une activité tyrosine kinase forte au niveau du domaine cytosolique du récepteur. La présence concomitante des deux récepteurs à la surface des cellules endothéliales modère ainsi la signalisation angiogénique du VEGF, ce qui est indispensable pour un développement vasculaire normal (Shibuya 2001).

Une mutation *Flt-1* *-/-* (ou *VEGFR-1*) chez la souris n'empêche pas le développement des cellules endothéliales chez l'embryon mais provoque l'absence d'organisation d'un réseau vasculaire primitif à l'intérieur des îlots sanguins induisant une mort *in utero* à un stade précoce du développement embryonnaire (Fong, Rossant et al. 1995). Chez ces souris, la présence d'un récepteur Flt-1 tronqué dans sa partie cytosolique, c'est-à-dire dépourvu d'activité tyrosine kinase (TK-), permet un développement embryonnaire normal et la survie des souris. (Figure 12) Ces résultats ont montré le rôle de Flt-1 en tant que piègeur de VEGF, permettant une limitation de la fixation du VEGF sur Flk-1 (ou VEGFR-2) afin de moduler la signalisation angiogénique du VEGF (Shibuya 2001).



**Fig 12. Le domaine extracellulaire de Flt-1 est suffisant pour la régulation négative de la fonction de Flk-1.**

Des souris *flt-1* *-/-* meurent *in utero* suite à une vascularisation anarchique liée à une hyperprolifération et une désorganisation des cellules endothéliales. La restitution d'un récepteur Flk-1 tronqué et dépourvu de son domaine cytosolique portant l'activité tyrosine kinase (tk-/-. permet un développement embryonnaire normal chez ces souris. (Shibuya 2001).

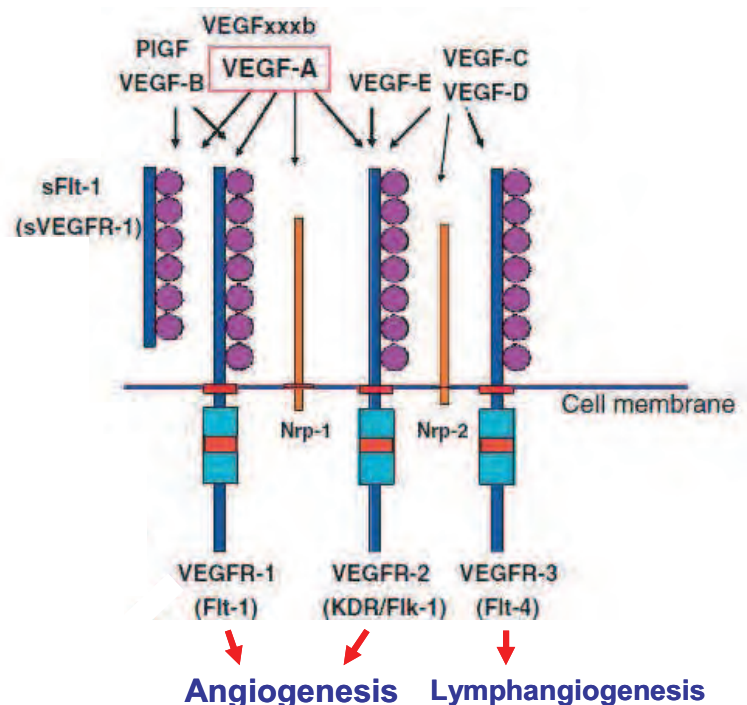
Une mutation de **Flk-1 -/- (ou VEGFR-2)** chez la souris a pour conséquence une absence de développement de cellules hématopoïétiques et endothéliales chez l'embryon, avec pour conséquence l'absence d'îlots sanguins ou de réseau vasculaire primitif. Tous les progéniteurs hématopoïétiques sont également sévèrement diminués ce qui induit une mort in utero dans les 8 à 10 jours suivant la fécondation (Shalaby, Rossant et al. 1995).

L'activation du VEGFR-2 semble plus responsable de l'activité mitogène et de l'angiogenèse induite par le VEGF, alors que le VEGFR-1 serait impliqué dans les fonctions de maintien du réseau vasculaire et de survie des CE sous l'effet du VEGF (Hoeben, Landuyt et al. 2004). Il a été d'ailleurs décrit que le VEGFR-1 est fortement exprimé dans l'endothélium quiescent alors que le VEGFR-2 est exprimé principalement dans les vaisseaux en croissance (Hanahan 1997; Hoeben, Landuyt et al. 2004)

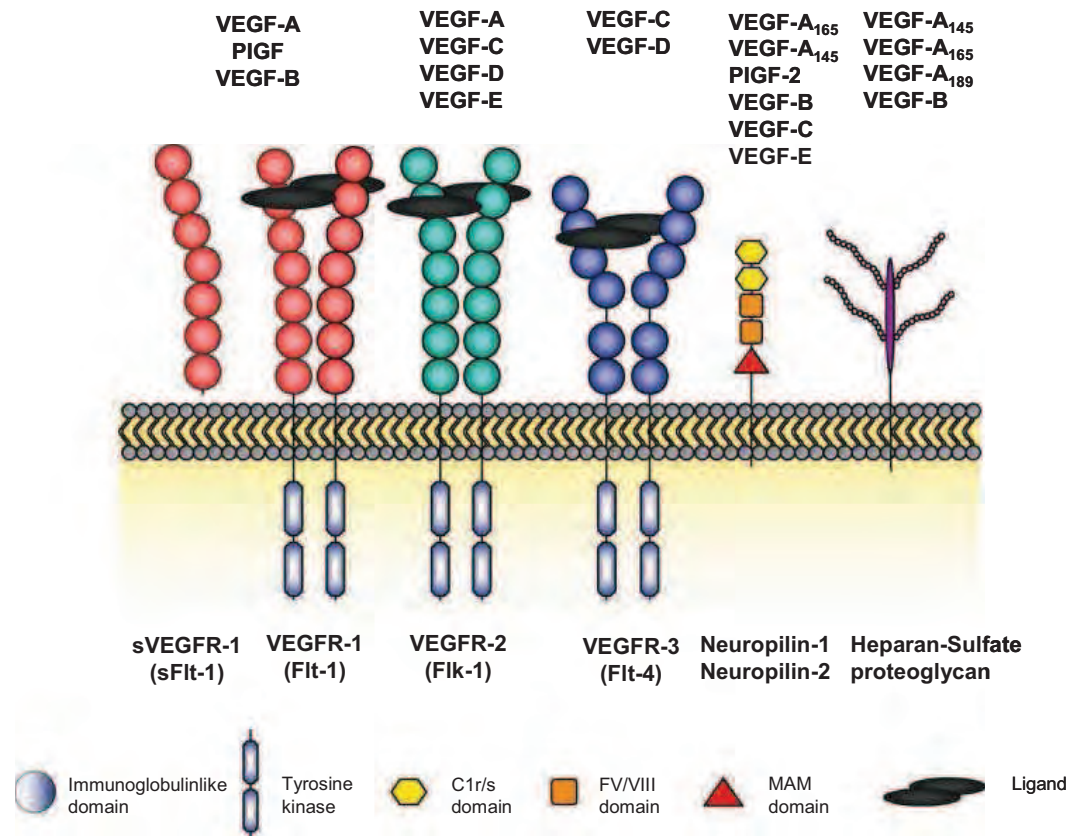
A côté de ces récepteurs **les neuropilines (NRP-1 et NRP-2)** jouent un rôle de co-récepteurs pour certaines isoformes de VEGF, en augmentant l'affinité de ces ligands pour leurs récepteurs respectifs. Elles ont un court domaine intracellulaire et n'ont pas elles-mêmes d'activité tyrosine kinase (Hicklin and Ellis 2005). Toutes les isoformes du VEGF A ne se lient pas à la neuropiline, ou se lient à NRP-1 et pas à la NRP-2 ou vice versa, ce qui peut expliquer les variations observées dans l'effet angiogénique des différentes isoformes du VEGF. La NRP-1 peut s'associer au VEGFR-1 ou au VEGFR-2, alors que la NRP-2 s'associe au VEGFR-2 ou au VEGFR-3 (figure 13) (Hicklin and Ellis 2005; Shibuya 2008; Shibuya 2013).

**Fig 13. Le système VEGF/VEGFR et son implication dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse.**

Le VEGF-A, en particulier VEGF165 joue un rôle central dans l'angiogenèse. Le VEGFxxx<sub>b</sub> a récemment été identifié comme un antagoniste naturel du VEGF-A. Trois récepteurs et une forme soluble de VEGFR sont hautement conservés chez les vertébrés. La majorité du signal pro-angiogénique provient du VEGFR2, le VEGFR1 jouant un rôle de modérateur de l'angiogenèse. Les neuropilines (Nrp) sont des co-récepteurs du VEGF qui augmentent l'affinité entre le VEGF et ses récepteurs, potentialisant la signalisation intracellulaire d'aval. Les formes de VEGFxxx<sub>b</sub>, variants alternatifs du VEGF-A sont des compétiteurs endogènes de ce dernier. (D'après Shibuya 2013).



**Les protéoglycanes d'héparane sulfate** ancrés à la membrane plasmique des cellules endothéliales facilitent la liaison entre le VEGFR et son ligand mais servent aussi de réserve de VEGF, qui peut être libéré au moment de la prolifération et de la migration cellulaire où des gélatinases de la matrice extracellulaire (MMP-2 ou MMP-9) hydrolysent ces protéoglycanes (Hoeben, Landuyt et al. 2004).



**Fig 14. Facteurs de croissance de la famille du VEGF et leurs récepteurs.** Les membres de la famille du VEGF lient différents récepteurs dont les principaux sont les trois récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR1/Flt-1, VEGFR2/Flk-1 et VEGFR3/Flt-4). Ces RTK sont des récepteurs à domaine extracellulaire immunoglobuline-like, avec un seul domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire portant l'activité tyrosine kinase. La liaison du ligand induit l'homodimérisation du récepteur et son activation. Le sVEGFR1 est une forme sécrétée du VEGFR1, résultant d'un épissage alternatif du message, qui a effet modérateur du signal angiogénique, par compétition avec la VEGFR1. Les protéoglycanes d'héparane sulfate lient et présentent le VEGF au récepteur alors que les neuropilines jouent un rôle de co-récepteur, mais les deux peuvent influencer la réponse médiée par le VEGFR. (Raab and Plate 2007).

Il existe également un variant du VEGFR-1, issu d'un épissage alternatif de l'ARNm, qui contient les six premiers domaines Ig-like du VEGFR-1 et qui est dépourvu de la partie cytosolique et transmembranaire du récepteur. Ce sVEGFR-1 (ou sFlt-1) qui a la même affinité que le VEGFR-1 pour le VEGF, est sécrété dans le milieu extracellulaire et peut donc avoir une action modulatrice (par compétition) sur le signal angiogénique du VEGF (Hicklin and Ellis 2005; Raab and Plate 2007).

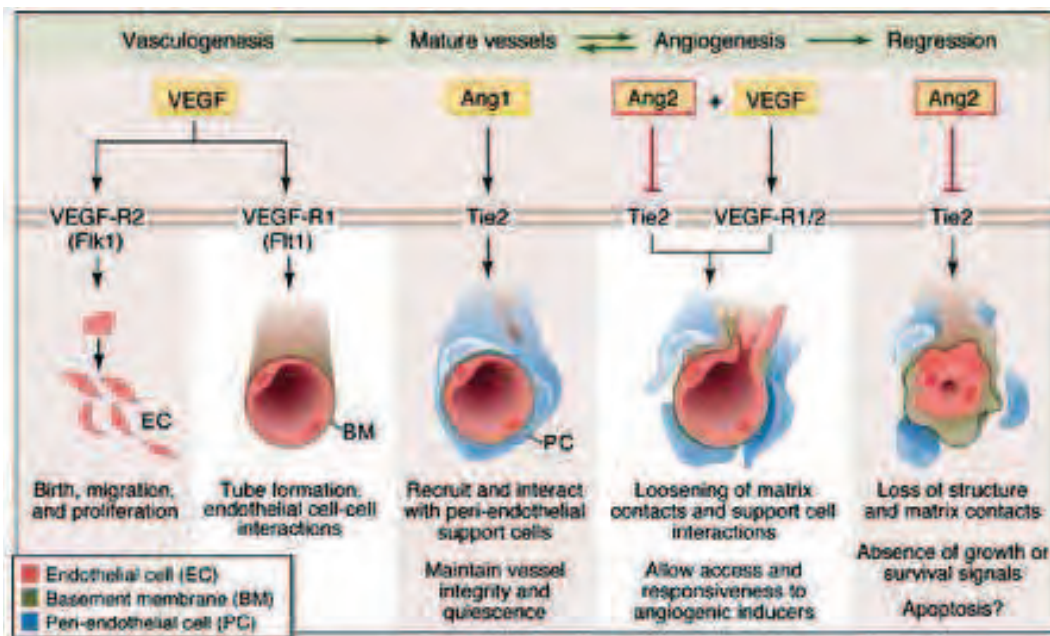
L'activation du VEGFR induit une inhibition de l'apoptose via la voie PI3K/Akt favorisant la survie cellulaire, la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse (Raab and Plate 2007). La stimulation d'Akt (une sérine/thréonine kinase), sous l'effet du VEGF ou d'autres facteurs pro-angiogéniques comme l'Angiopoïétine-1 ou les forces de cisaillement (shear stress), induit une activation de la NO synthase et la génération de monoxyde d'azote par l'endothélium, influençant à long terme la croissance endothéliale (Dimmeler, Fleming et al. 1999; Fulton, Gratton et al. 1999; Dimmeler and Zeiher 2000).



#### 2.4.1.4. Angiopoïétine-1 et 2/récepteur Tie2

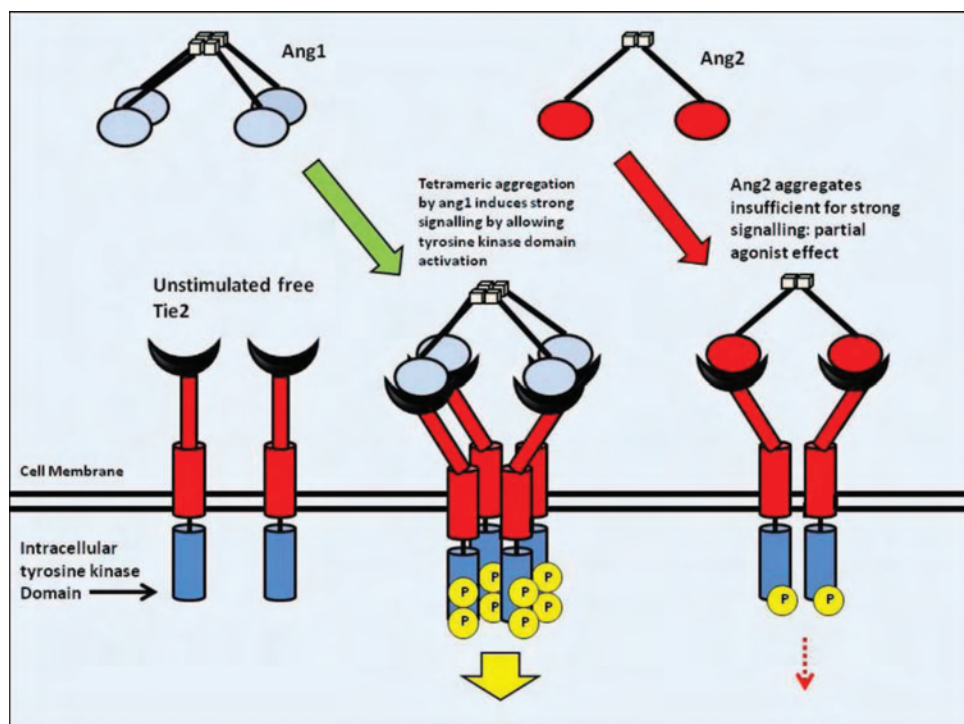
Le système des angiopoïétines et de leur récepteur Tie2 intervient dans la stabilisation-déstabilisation des vaisseaux. L'angiopoïétine-1 (Ang-1) est une glycoprotéine sécrétée par les cellules péri-endothéliales (péricytes et cellules musculaires lisses) et a une action paracrine sur les cellules endothéliales par l'intermédiaire de son récepteur Tie2. L'Ang-1 et son récepteur Tie2 stabilisent les vaisseaux en créant des jonctions entre les cellules endothéliales et en favorisant l'interaction de l'endothélium avec le péri-endothélium (Dimmeler and Zeiher 2000; Thurston, Rudge et al. 2000; Carlson, Feng et al. 2001; Metheny-Barlow and Li 2003). En effet Ang-1 peut se fixer à la fibronectine par l'intermédiaire des intégrines et favoriser l'interaction entre Tie2 et les intégrines permettant un maintien du signal de stabilisation vasculaire induit par l'interaction Ang-1 et Tie2 (Somanath, Ciocea et al. 2009). Ang-1 peut aussi se fixer directement sur les intégrines même en l'absence de Tie2 (Carlson, Feng et al. 2001; Somanath, Ciocea et al. 2009).

Alors que l'Ang-1 favorise la maturation et la stabilisation des vaisseaux néoformés en réduisant la perméabilité vasculaire, Ang-2 antagonise les effets de Ang-1 sur Tie2, entraînant une déstabilisation des vaisseaux et une augmentation de la perméabilité vasculaire, qui sont des phénomènes préalables et facilitateurs de l'action du VEGF sur le remodelage vasculaire et l'angiogenèse (Hanahan 1997; Maisonpierre, Suri et al. 1997; Holash, Maisonpierre et al. 1999). L'angiopoïétine-2 est stockée dans les cellules endothéliales et sécrétée sous l'effet de divers stimuli au niveau de sites inflammatoires ou de remodelage vasculaire (Moss) et elle agit en fait comme un agent autocrine régulateur d'une réponse vasculaire rapide face à des agents augmentant la perméabilité vasculaire comme le VEGF, mais aussi l'histamine ou la bradykinine (Benest, Kruse et al. 2013).



**Fig 15. Coopération des VEGFR1 et 2 et de Tie2 dans la morphogenèse, la maintenance et le remodelage vasculaire.** Les VEGFR1 et 2 et Tie2 ont le même domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase mais induisent des signalisations différentes. Le VEGFR2 induit un signal pro-angiogénique en augmentant la prolifération et la migration des CE. Au contraire VEGFR1 favorise les interactions cellulaires et la formation des tubes, processus qui suit de près la prolifération et la migration cellulaire. Ang-1 liée à Tie2 diminue la perméabilité endothéliale et recrute les cellules périendothéliales afin de stabiliser le vaisseau. Ang-2 lie Tie2 mais ne l'active pas, jouant le rôle d'antagoniste compétitif de Ang-1. Ang-2 réduit les contacts entre les CE et avec la matrice extracellulaire et dissocie le support périendothélial. Ce relâchement rend les CE plus accessibles aux agents angiogènes comme le VEGF. Ang-2 est également impliquée dans la régression vasculaire, en l'absence d'une co-expression du VEGF. La perte de contact intercellulaire et la dissociation d'avec la MEC, en l'absence de facteur de croissance, induit une apoptose des CE. (D'après Hanahan 1997)

Le récepteur Tie2 est un récepteur à activité tyrosine kinase, situé à la surface des cellules endothéliales. Son domaine extracellulaire a un site de liaison à l'angiopoïétine-1 ou 2 (qui sont structurellement similaires), et un domaine intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinase. La fixation de l'Ang-1 induit la tétramérisation de Tie2 et l'autophosphorylation de son domaine cytosolique à l'origine d'une forte signalisation intracellulaire (migration, survie cellulaire, réorganisation et stabilisation vasculaire, diminution de la perméabilité vasculaire et effet anti-inflammatoire) (Moss 2013). Tie2 est ubiquitaire dans l'endothélium vasculaire et apparaît phosphorylé de façon constitutive au niveau de l'endothélium de vaisseaux quiescents, indiquant son rôle dans la maintenance et la stabilité vasculaire (Wong, Haroon et al. 1997). La fixation de Ang-2 sur Tie2 induit une faible agrégation du récepteur ne permettant pas d'aboutir à une tétramérisation. Il s'ensuit une signalisation intracellulaire relativement faible de telle sorte qu'en présence de Ang-1, Ang-2 agit comme un inhibiteur compétitif sur Tie2 (Moss 2013).



**Fig 16. Interaction entre Ang-1/Ang-2 et Tie2.** L'activité tyrosine kinase de Tie2 nécessite le rapprochement des récepteurs (dimérisation et tétramérisation) pour amplifier l'autophosphorylation et le signal intracellulaire. Ang-1 induit une tétramérisation de Tie2 à l'origine d'un signal intracellulaire fort. Ang-2 n'induit qu'une dimérisation de Tie2 conduisant à un signal plus faible. Ang-2 est considéré comme un agoniste faible qui en présence de Ang-1 joue le rôle d'antagoniste compétitif. (Moss 2013).

#### **2.4.1.5. NO (monoxyde d'azote) et NOS (NO Synthase)**

Le monoxyde d'azote (NO) est synthétisé par la *Nitric Oxide Synthase* (NOS) à partir d'un acide aminé, la L-arginine (Hattenbach, Allers et al. 2000). Il est synthétisé, entre autre par les cellules endothéliales, et participe à ce niveau au remodelage vasculaire et à l'angiogenèse ainsi qu'à la régulation de la pression sanguine artérielle par son effet vasodilatateur (Fulton, Gratton et al. 1999; Dimmeler and Zeiher 2000).

Il existe trois isoformes de la NOS : la NOS neuronale (ou NOS-1 ou nNOS), qui a été initialement identifiée dans les cellules nerveuses, la NOS inductible (NOS-2 ou iNOS) dont la synthèse peut être induite par divers stimuli dans une large variété de tissus et de cellules, et la NOS endothéliale (NOS-3 ou eNOS) initialement retrouvée dans les cellules endothéliales (Alderton, Cooper et al. 2001). Ces isoformes avaient été aussi différenciées par le passé, par leur caractère constitutif (eNOS et nNOS) versus inductible (iNOS), et par leur caractère calcium-dépendant (eNOS et nNOS) ou calcium-indépendant (iNOS). Ces distinctions sont actuellement de moins en moins reprises et il est désormais établi que l'expression des trois isoformes peut être induite par différents stimuli, et que la NOS dite inductible peut avoir une expression constitutive, notamment au niveau de l'épithélium respiratoire probablement du fait d'une exposition permanente à des aéro-contaminants ou différents stimuli pro-inflammatoires (Guo, De Raeve et al. 1995). Ces trois NO synthases sont apparentées à la famille des cytochromes P450 et codées par trois gènes distincts (chromosomes 12, 17 et 7) (Alderton, Cooper et al. 2001).

Au niveau de l'endothélium, la synthèse de NO peut avoir deux origines, eNOS ou iNOS. L'activation de la eNOS, sous l'effet de divers stimuli, est consécutive à sa phosphorylation sur un résidu sérine par Akt, une sérine/thréonine kinase, impliquée dans les voies de survie cellulaires activée par divers agents ou facteurs de croissances. Le NO contribue ainsi à l'effet du VEGF et de son récepteur KDR/VEGFR2 qui induit suite à sa trans-phosphorylation, une activation de la voie PI3K/Akt et consécutivement de la eNOS (Dimmeler and Zeiher 2000). L'Ang-1 et son récepteur Tie2 peuvent, par l'intermédiaire de leur liaison aux intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  et à la fibronectine, recruter une kinase des liaisons focales, FAK (*Focal Adhesion Kinase*), au niveau de la région cytosolique du récepteur Tie2, qui phosphoryle PI3K induisant une activation de eNOS et une synthèse de NO (Somanath, Ciocea et al. 2009). Enfin, la fixation de l'insuline sur son récepteur ainsi que le shear stress peuvent également activer la voie de survie PI3K/Akt et la phosphorylation de eNOS (Dimmeler and Zeiher 2000).

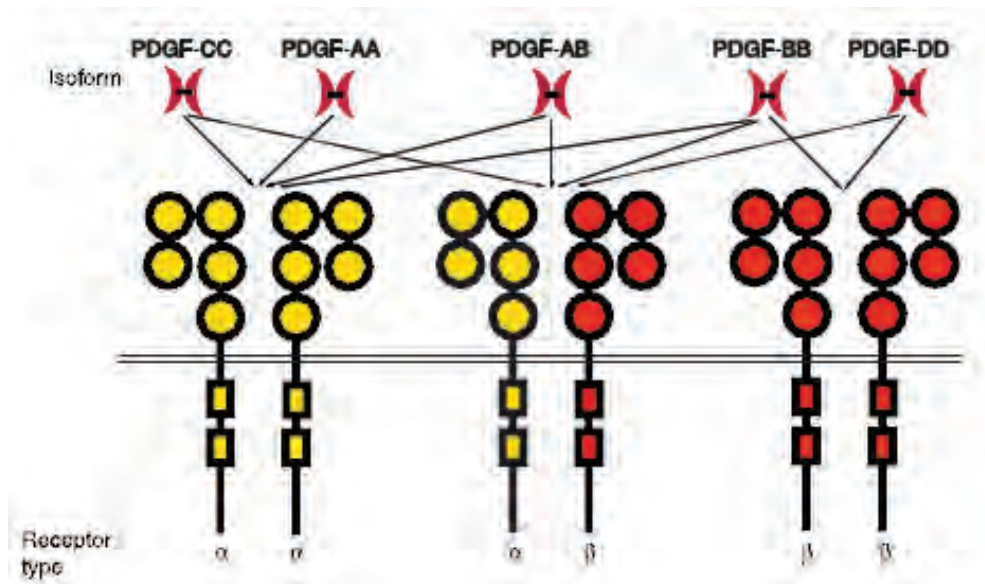
A coté de cette activation de eNOS par phosphorylation, une induction de la synthèse de iNOS (pour *inductible Nitric Oxide Synthase*), sous l'effet de l'hypoxie, peut encore accroître la synthèse endothéliale de NO (voir chapitre 3.4.1.1. L'hypoxie). Cette régulation est en partie responsable de la stimulation de l'angiogenèse post-ischémique, renforçant l'effet du VEGF ou de l'Angiopéptine-2 (Matsunaga, Warltier et al. 2000).

La synthèse de monoxyde d'azote, *in vitro* et *in vivo*, à l'état basal, ou augmentée par l'hypoxie, le VEGF ou d'autres facteurs de croissance, est potentialisée par l'administration de son précurseur, la L-arginine, et antagonisée par des inhibiteurs compétitifs de la NOS, comme la L-NAME (*Nitro-L-Arginine-Methyl-Ester*), ou la ADMA (*Asymetric DiMethyl Arginine*) reconnues par l'enzyme mais non métabolisable (Matsunaga, Warltier et al. 2000; Cooke and Losordo 2002).

#### **2.4.1.6. PDGF (Platelet Derivated Growth Factor)/PDGFR**

Les facteurs de croissance de la famille du PDGF sont codés par quatre gènes différents à l'origine de quatre chaînes polypeptidiques (A, B, C et D) qui sont associées entre elles par des ponts disulfures pour former cinq dimères différents (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC et PDGF-DD) qui agissent par l'intermédiaire de leurs deux récepteurs à activité tyrosine kinase, le PDGFR- $\alpha$  et le PDGFR- $\beta$  (Fredriksson, Li et al. 2004). Toutes les isoformes de PDGF sont synthétisées sous une pro-forme qui doit être clivée pour libérer le facteur de croissance actif. Les

pro-PDGF A et B subissent un clivage intracellulaire et sont actifs dès leur sécrétion, alors que les PDGF C et D sont sécrétés sous une forme latente et doivent être clivés par des protéases de la matrice extracellulaire pour être biologiquement actifs (Fredriksson, Li et al. 2004). Les cinq isoformes de PDGF ont des capacités à se lier aux PDGFRs qui sont différentes. Selon l'isoforme de PDGF, la liaison du ligand sur le récepteur peut induire une homo-dimérisation PDGFR- $\alpha/\alpha$  ou  $\beta/\beta$  ou une hétéro-dimérisation PDGFR- $\alpha/\beta$ .



**Fig 17. Reconnaissance des cinq isoformes de PDGF par les différents dimères de récepteurs.** Les flèches représentent les capacités de liaison et d'activation des dimères de récepteurs par les cinq isoformes de PDGF. (D'après Fredriksson, Li et al. 2004).

Au sein de cette famille, ce sont le PDGF-B et son récepteur le PDGR- $\beta$  qui semblent impliqués dans l'angiogénèse. Au cours du processus angiogénique, la stabilisation des vaisseaux, nécessite le recrutement des cellules péri-endothéliales (cellules musculaires lisses et péricytes) autour du nouveau vaisseau, formé dans un premier temps par la seule couche de l'endothélium. Les cellules endothéliales synthétisent alors du PDGF-B qui a un pouvoir chemoattractant sur son récepteur, le PDGFR- $\beta$  portés par les péricytes et les cellules musculaires lisses vasculaires, qui vont venir former un mur cellulaire autour du néovaisseau. L'étude d'embryons de souris PDGF-B  $-/-$  ou PDGFR- $\beta$   $-/-$  a montré qu'il y avait une hyperplasie des cellules endothéliales au niveau du cerveau des embryons « Knock out » au 11ème jour de vie embryonnaire par rapport aux embryons 'sauvages' du même âge, ainsi qu'une morphogenèse vasculaire anormale associée à un manque de péricytes péri-vasculaires cérébraux (Hellstrom, Gerhardt et al. 2001).

Ces cellules péri-endothéliales qui ont donc un rôle stabilisateur du néovaisseau, peuvent être recrutées localement ou à partir de cellules progénitrices PDGFR- $\beta^+$  issues de la moelle osseuse (Carmeliet and Jain 2011). En effet il a été montré que les progéniteurs PDGFR- $\beta^+$  de péricytes ou de cellules musculaires lisses proliféraient au niveau de sites de production endothéliales de PDGF-B, qui est principalement synthétisé par les capillaires immatures et l'endothélium en cours de bourgeonnement (Hellstrom, Kalen et al. 1999). Cela signifie que le PDGF-B synthétisé par les cellules endothéliales lors du remodelage vasculaire, est un facteur de croissance des cellules



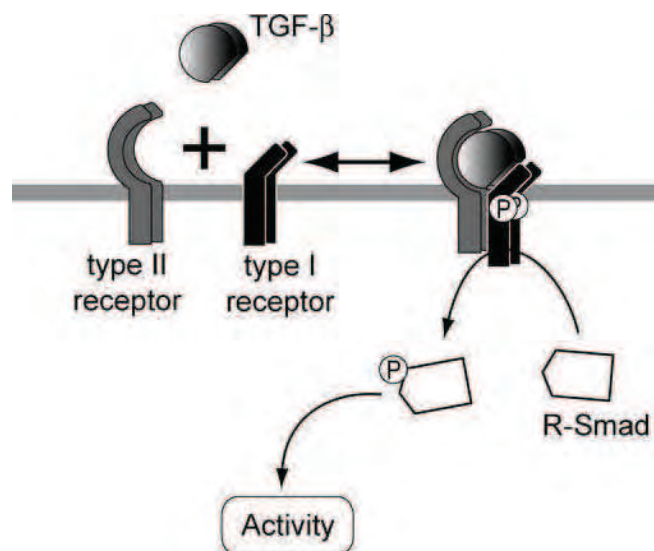
mésenchymateuses péri-vasculaires au niveau desquelles il induit une prolifération et une migration de façon à ce qu'elles puissent suivre et guider le bourgeonnement endothélial lors de l'angiogenèse. Par contre il semblerait que les toutes premières étapes de différenciation et de migration des progéniteurs (de cellules musculaires lisses ou de péricytes) vers le site angiogénique, seraient indépendantes du PDGF-B et se dérouleraient probablement sous l'effet du TGF- $\beta$  like factor également synthétisé par les cellules endothéliales (Hellstrom, Kalen et al. 1999).

#### **2.4.1.7. TGF- $\beta$ (Transforming Growth Factor-beta)**

La voie de signalisation du TGF- $\beta$  contrôle un grand nombre de réponses cellulaires comme la croissance cellulaire, l'apoptose, la différenciation, l'homéostasie ou la morphogenèse.

Les cytokines de la superfamille de TGF- $\beta$  sont caractérisées par la conservation de six résidus cystéines sur leur chaîne. Ces cytokines sont actives sous forme de dimère stabilisé par des liaisons hydrophobes renforcées dans un second temps par des ponts disulfures interchaînes. Chaque monomère comprend également 3 ponts disulfures intrachaînes (Shi and Massague 2003). Le dimère actif induit la formation d'un hétéro-tétramère de récepteur à la surface cellulaire, comprenant deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II. Ces récepteurs font partie de la famille des récepteurs à activité sérine/thréonine kinase. Les complexes ligands-récepteurs sont internalisés dans des puits recouverts de clathrine jusqu'aux vésicules endosomales. Les récepteurs de type II s'autophosphorylent sur leur domaine cytoplasmique et phosphorylent les récepteurs de type I sur des résidus sérine et thréonine. Ces phosphorylations permettent une transduction du signal, par phosphorylation de protéines cytoplasmiques (Smad), facteurs de transcription de nombreux gènes (Pepper 1997; Vilar, Jansen et al. 2006; Reiner and Datta 2011). Il existe également un récepteur du TGF- $\beta$  de type III qui est un protéoglycane transmembranaire avec un petit domaine cytoplasmique. Il ne semble pas nécessaire à la transduction du signal mais pourrait servir à présenter et délivrer le TGF- $\beta$  aux autres types de récepteur (Pepper 1997).

**Fig 18. Formation de l'hétérotétramère de récepteurs au TGF- $\beta$ .** La forme active des TGF- $\beta$  est un dimère de deux molécules liées entre elles par liaisons hydrophobes et des ponts disulfures. Ce dimère induit, à la membrane plasmique, la formation d'un hétérotétramère de récepteurs (deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II). Seul le récepteur de type II s'autophosphoryle et phosphoryle le type I, qui phosphoryle à son tour les protéines cytosoliques R-smads qui agissent alors comme des régulateurs transcriptionnels. (Vilar, Jansen et al. 2006).



Dans le système cardiovasculaire, le TGF- $\beta$  (isoforme TGF- $\beta$ 1) et ses récepteurs de type I et II, sont impliqués dans l'assemblage vasculaire au cours de la vie embryonnaire et dans l'établissement et le maintien de l'intégrité de la paroi vasculaire. En effet le phénotype de souris TGF- $\beta$  et TGF- $\beta$ R

déficientes, ressemble fort à celui de souris mutées pour la fibronectine ou pour la sous unité  $\alpha 5$  de l'intégrine  $\alpha 5\beta 3$ . Le TGF- $\beta$  peut être synthétisé par les cellules endothéliales ou les cellules inflammatoires péri-vasculaires qui affluent dans les zones inflammatoires lors du processus de cicatrisation par exemple (Pepper 1997). Il peut induire une synthèse de VEGF par les cellules endothéliales et inflammatoires périvasculaires à l'origine d'une angiogenèse par l'action autocrine/paracrine du VEGF (Ferrari, Cook et al. 2009) mais son effet sur les cellules endothéliales est biphasique concentration dépendant (*in vitro* il augmente la migration et l'adhésion de BMEC (cellules microvasculaires endothéliales bovines) à faibles doses (300 pg/ml) et bloque ces processus à plus forte dose (1 ng/ml). Il induit également la synthèse de PDGF-B par les cellules endothéliales et l'expression de son récepteur, le PDGFR- $\beta$  par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses périvasculaires, permettant la différenciation des cellules de la paroi vasculaire dans le mésenchyme environnant et leur migration autour du capillaire néoformé (Pepper 1997). En effet lors de co-cultures de cellules endothéliales et de précurseurs de cellules musculaires lisses et de péricytes, on observe une différenciation de ces deux derniers types cellulaires qui se mettent à exprimer des marqueurs spécifiques des muscles lisses. Le traitement des précurseurs par le TGF- $\beta$  induit le même changement phénotypique et la neutralisation du TGF- $\beta$  dans les co-cultures empêche cette différenciation (Hirschi, Rohovsky et al. 1998). Finalement le TGF- $\beta$  a à la fois un rôle pro-angiogénique et un rôle anti-angiogénique, et il participe à la constitution et au maintien de la paroi vasculaire.

#### **2.4.1.8. b-FGF (basic Fibroblast Growth Factor ou FGF-2)**

Il y a actuellement 23 membres identifiés comme appartenant à la famille du FGF, et 4 récepteurs-tyrosine kinase du FGF ont été décrits. Des protéoglycanes d'héparane sulfate servent de co-récepteurs pour l'interaction entre le bFGF et son récepteur lorsqu'ils sont ancrés à la membrane plasmique, mais peuvent aussi séquestrer le ligand et diminuer la signalisation du FGF si ils sont clivés par des héparanases ou des enzymes protéolytiques (Javerzat, Auguste et al. 2002).

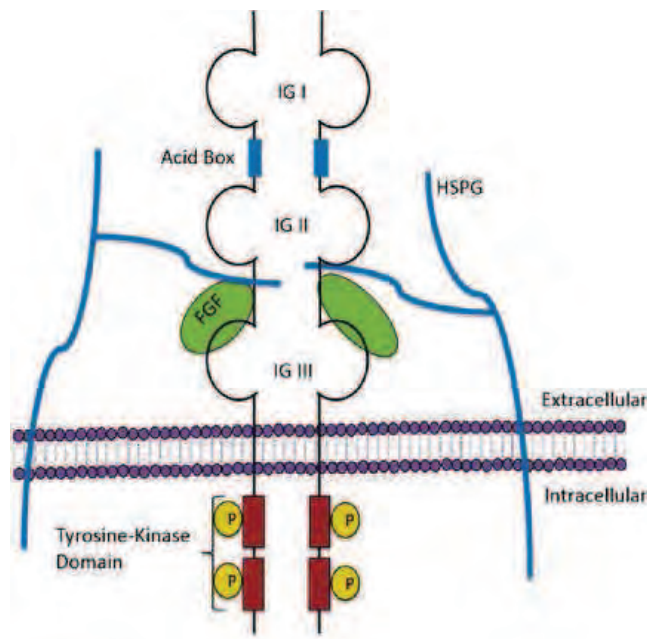
Le FGFR1 est le principal récepteur à activité tyrosine kinase du FGF exprimé à la surface de l'endothélium. Le FGFR2 peut aussi être présent mais dans de plus faibles proportions. Il a été rapporté que le FGFR1 médiait une signalisation de prolifération, de migration, de tubulogenèse et de synthèse de protéases, alors que FGFR2 ne semble induire qu'une mobilité cellulaire accrue.

L'activation du récepteur induit le recrutement de nombreux partenaires notamment les MAP Kinases et p38MAPK ainsi que Src Kinase, impliqués dans le développement et le maintien de la vascularisation embryonnaire et extra-embryonnaire, lors de la vie intra-utérine chez de nombreuses espèces animales (Ribatti, Urbinati et al. 1995; Lee, Schloss et al. 2000). L'interruption de la signalisation du FGFR *in vitro*, par l'utilisation d'un récepteur muté dominant inactif ou tronqué, aboutissant à une absence d'activation des MAP Kinases, induit une mort cellulaire par apoptose des cellules endothéliales (diminution de la viabilité cellulaire et marquage TUNEL positif) (Lee, Schloss et al. 2000).

De plus, alors que le VEGF est un régulateur de l'angiogenèse par bourgeonnement, le bFGF serait plutôt un régulateur de l'angiogenèse par intussusception. En effet il a été constaté qu'en début de gestation, où le VEGF est le plus fortement exprimé, l'angiogenèse est caractérisée par un sprouting intense, alors que dans un second temps où la concentration en bFGF est la plus forte, il se produit un switch vers l'intussusception qui permet une amplification et un remodelage vasculaire plus rapides (Djonov, Galli et al. 2000; Javerzat, Auguste et al. 2002; Makanya, Stauffer et al. 2005). Il

permet également la différenciation des précurseurs hémangioblastiques Flk-1+ (VEGFR2 +) et leur migration depuis le mésoderme.

Le FGF agit en synergie avec le VEGF, et en période post natale et chez l'adulte, il permet la prolifération et la migration des cellules endothéliales, des péricytes et des cellules musculaires lisses permettant de guider l'assemblage de l'endothélium durant l'angiogenèse normale et tumorale (Javerzat, Auguste et al. 2002).



**Fig 19. Interaction du FGF avec son récepteur et les héparanes sulfates.** Le FGF se lie avec une forte affinité à son récepteur dont il induit la dimérisation et l'activation, à l'origine d'une signalisation cellulaire variée. Le FGF lie également avec une faible affinité les héparanes sulfates à la surface de la cellule qui facilitent la présentation du FGF à son récepteur mais qui peuvent aussi en limiter l'accès en cas de clivage de ces protéoglycanes. (Sternier, Meli et al. 2013).

#### **2.4.1.9. EGFR**

L'EGFR est un récepteur à activité tyrosine kinase présent au niveau de la membrane plasmique de nombreux types cellulaires. C'est un récepteur à activité tyrosine kinase, activé par la fixation de son ligand qui induit une dimérisation du récepteur et une autophosphorylation de son domaine cytosolique qui phosphoryle à son tour de nombreux partenaires, notamment PI3K/Akt, les MAPK, la PLC- $\gamma$  ou Src, régulant ainsi la prolifération, la survie, la différenciation et la migration cellulaire ainsi que l'inflammation et l'homéostasie de la matrice extracellulaire (MEC) (Makki, Thiel et al. 2013)

Il est exprimé par les cellules musculaires lisses (CML) vasculaires, les cellules endothéliales ainsi que les macrophages et les lymphocytes et participe au développement de la plaque d'athérome (Dreux, Lamb et al. 2006) Au niveau des CML, l'EGFR est impliqué dans la contraction cellulaire et le maintien du tonus vasculaire, via la voie ERK1/2/JAK/STAT (Amin, Abd Elmageed et al. 2011), ainsi que dans la prolifération à l'origine de l'hyperplasie néointimale, via l'activation de NOX1 (Miller, Chu et al. 2010). Au niveau des cellules endothéliales, l'EGFR est impliqué dans la migration et l'angiogenèse via l'activation de PI3K/Akt/eNOS (Mehta, Zhou et al. 2008). Une surexpression de l'EGFR au niveau des cellules endothéliales de tumeurs mammaires chez le chien,

est associée à une densité microcapillaire et un potentiel métastatique augmentés (Carvalho, Guimaraes et al. 2013). En pharmacologie, l'inhibition irréversible de l'EGFR est à l'origine d'une inhibition de la prolifération et de l'angiogenèse des HUVEC *in vitro* (Li, Wang et al. 2013). Dans un modèle cellulaire de cancer colorectal, la phosphorylation de l'EGFR est associée à une stabilisation de HIF via l'activation des MAPK, mais cette activation seule n'est pas suffisante à l'induction de la synthèse du VEGF par les cellules, suggérant que l'EGFR agit en synergie avec d'autres voies de signalisation pour induire la transcription de facteurs pro-angiogéniques (Khong, Thairu et al. 2013).

#### **2.4.1.10. LDL oxydées**

L'angiogenèse peut être stimulée dans certaines situations pathologiques comme l'athérosclérose, sous l'effet de lipides oxydés présents localement au sein des plaques d'athérome. Le mécanisme angiogénique des LDLox est controversé car des propriétés angiogéniques et antiangiogéniques de ces lipoprotéines ont été décrites. Cet effet biphasique des LDLox semble dose dépendant (Dandapat, Hu et al. 2007; Wu, Wang et al. 2009; Yu, Wong et al. 2011; Khaidakov, Mitra et al. 2012). (voir chapitre 4 – LDL oxydées)

Le présent travail étudie une partie des mécanismes moléculaires de la signalisation angiogénique des LDLox sur des cellules endothéliales microvasculaires humaines pour tenter de comprendre et de limiter le développement microvasculaire des vasa vasorum en regard des plaques d'athérome à l'origine de certaines complications de la maladie athéroscléreuse (voir chapitre 4 –Athérosclérose)

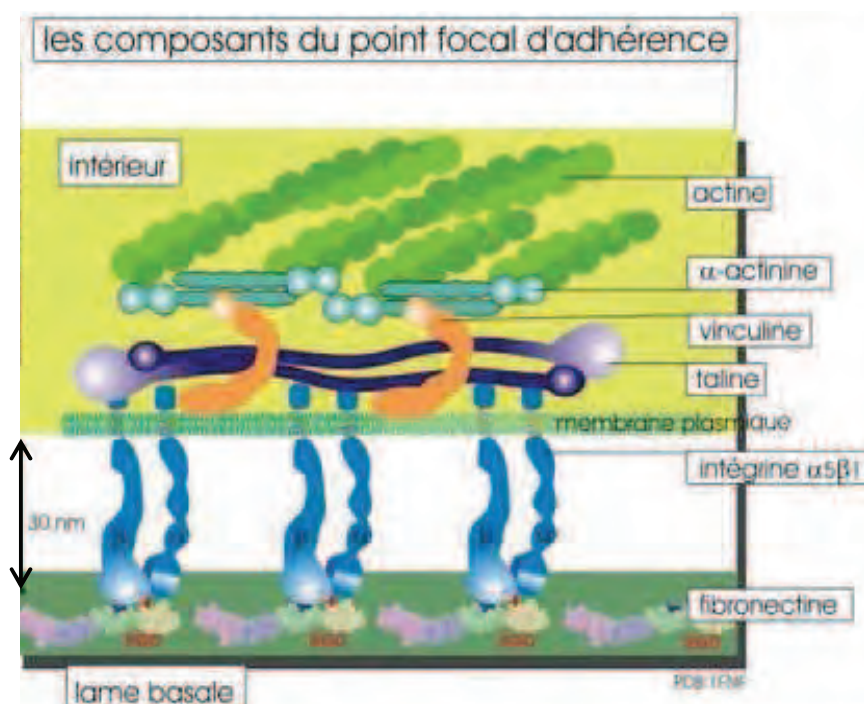
#### **2.4.2. Les Molécules d'adhésion**

Les molécules d'adhésion à la matrice extracellulaire comme les intégrines ou la VE-cadhérine, présentes à la surface des cellules endothéliales sont nécessaires à leur survie et à l'angiogenèse (Hynes 2002). Lors du processus de migration cellulaire, les cellules endothéliales forment des lamellipodes qui s'attachent à la matrice extracellulaire du côté du bord de migration, et rompent simultanément des attaches avec cette matrice à l'arrière de la cellule (par rapport au bord de migration), permettant la rétraction des bords et l'avancement de la cellule. La diminution des attaches cellulaires à la matrice se fait soit par rupture de liaisons cellules-matrice par protéolyse de molécules d'adhésion soit par dissociation des intégrines qui sont des récepteurs cellulaires pour des molécules de la matrice extracellulaire (Palecek, Huttenlocher et al. 1998).

##### **2.4.2.1. Les intégrines**

Les intégrines appartiennent à une large famille de glycoprotéines qui forment des récepteurs hétérodimériques pour des molécules de la matrice extracellulaire. On dénombre 18 sous-unités alpha et 8 sous-unités bêta dont les divers agencements par paire (une sous-unité alpha lie par liaisons non covalentes une sous-unité bêta) sont à l'origine de 25 récepteurs différents (van der Flier and Sonnenberg 2001). On les retrouve essentiellement au niveau des liaisons focales où elles relient des éléments de la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine, par l'intermédiaire de protéines associées au cytosquelette. En plus de leur rôle dans l'adhésion cellulaire, les intégrines relaient des signaux moléculaires dépendant de l'environnement cellulaire, par le recrutement de protéines de signalisation au niveau de leur domaine cytoplasmique. Elles peuvent ainsi réguler

l'adhésion cellulaire à la matrice extracellulaire, influencer la forme de la cellule, la prolifération, la survie cellulaire et la transcription de gènes impliqués dans la migration (Hood and Cheresch 2002). Les intégrines  $\alpha 5\beta 1$  (récepteur de la fibronectine), (Somanath, Ciocea et al. 2009)  $\alpha 1\beta 1$  et  $\alpha 2\beta 1$  (récepteurs du collagène) (Carlson, Feng et al. 2001; Hynes 2002) sont nécessaires à l'angiogenèse, alors que les intégrines  $\alpha \nu\beta 3$  et  $\alpha \nu\beta 5$  participent à l'angiogenèse par une régulation négative (Hynes 2002). Cependant il a été également décrit que l'expression de l'intégrine  $\alpha \nu\beta 3$ , dotée d'un domaine de reconnaissance du motif RGD (Arg-Gly-Asp) présent notamment sur la fibronectine, est stimulée dans les processus inflammatoires, entre autre par le bFGF. Il a été suggéré que l'intégrine  $\alpha \nu\beta 3$  est impliquée dans le switch angiogénique tumoral sous l'effet de l'inflammation, facilitant la migration et la survie des cellules endothéliales (Robert 2011). Ces résultats apparemment contradictoires ont peut être été obtenus en raison du fait que les mêmes intégrines peuvent jouer des rôles différents dans l'angiogenèse tumorale, inflammatoire ou physiologique, ou qu'une même sous-unité  $\alpha \nu$  peut s'associer à plusieurs sous unités  $\beta$  pour former des récepteurs différents.



**Fig 20. Les intégrines, véritables récepteurs cellulaires.** Leur interaction avec la MEC, induit une signalisation de survie cellulaire et de prolifération en collaboration avec des récepteurs aux facteurs de croissance. Le détachement des cellules de la MEC, en l'absence de facteur de croissance, engendre un signal d'apoptose, protégeant l'organisme de métastases. En effet des cellules transformées (cellules tumorales) survivent au détachement, échappent à l'apoptose, et acquièrent de ce fait une capacité métastatique. D'après © 2003 Ulysse, Université Bordeaux 1.



### **2.4.2.2. La VE-cadhérine**

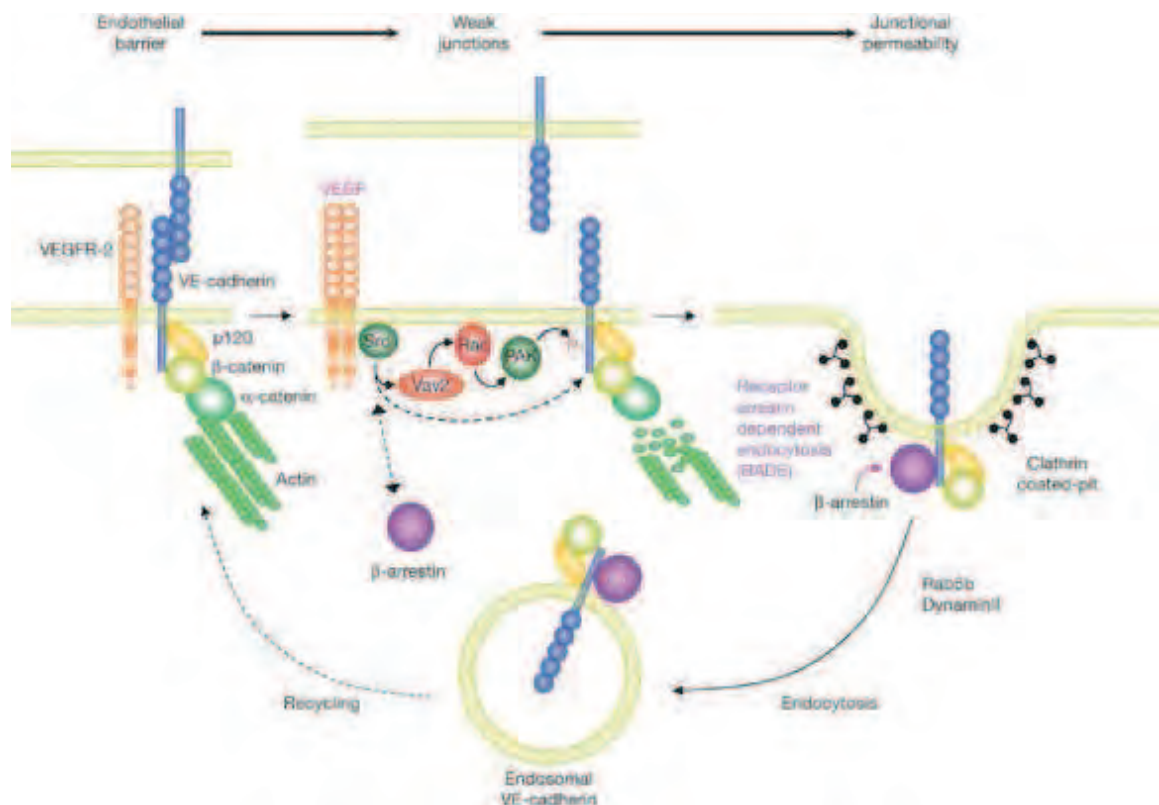
Les cadhérines sont des molécules d'adhésion transmembranaires qui font partie des jonctions adhérentes. Elles permettent des interactions cellulaires par des liaisons homophiliques homotypiques calcium dépendantes de deux cadhérines en vis-à-vis.

La VE-cadhérine portée par les cellules endothéliales est importante pour la survie cellulaire et le remodelage vasculaire. Son domaine cytoplasmique interagit avec des protéines à domaine armadillo : p120-caténine,  $\beta$ -caténine et plakoglobine. Ces deux dernières lient l' $\alpha$ -caténine qui par l'intermédiaire de la vinculine et de l' $\alpha$ -actinine, accrochent le complexe membranaire au cytosquelette d'actine (Carmeliet, Lampugnani et al. 1999). La VE-cadhérine permet aussi l'accrochage des cellules endothéliales à la membrane basale par son association à la vimentine via la plakoglobine et la desmoplakine. La p120-caténine lie la VE-cadhérine sur son domaine cytoplasmique au niveau juxta-membranaire et régule le niveau de VE-cadhérine à la membrane en fonction de son état de phosphorylation, soit en contrôlant son internalisation et sa dégradation soit en la maintenant dans le complexe membranaire des jonctions adhérentes (Wallez, Vilgrain et al. 2006).

A coté de son rôle dans la cohésion endothéliale, la VE-cadhérine est également impliquée dans la différenciation, la croissance et la migration cellulaire. Son domaine d'adhésion extracellulaire et son domaine cytoplasmique de liaison à la  $\beta$ -caténine participent à l'inhibition de la croissance endothéliale, par le maintien de la cohésion endothéliale mais surtout par le maintien à la membrane de la  $\beta$ -caténine qui peut, lors de la dissociation du complexe membranaire, être phosphorylée par Akt sur des résidus tyrosines et s'associer à un complexe transcriptionnel à l'origine de l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (cycline D1, MMP-2, MMP-9). Au niveau des cellules endothéliales, le complexe membranaire VE-cadhérines / $\beta$ -caténine est associé au VEGFR-2 et à PI3K permettant de répondre au signal de survie du VEGF A. (voir chapitre VEGF et VEGFRs) (Carmeliet, Lampugnani et al. 1999; Kiran, Viji et al. 2011). Une autre kinase associée à la VE-cadhérine, Src kinase, est indispensable à la migration des cellules endothéliales et à l'invasion vasculaire. Le VEGFR-2 activé par le VEGF, phosphoryle Src qui à son tour phosphoryle la VE-cadhérine sur des résidus tyrosine. Cette phosphorylation est associée à une dissociation du complexe membranaire jonctionnel, étape indispensable au switch des cellules endothéliales qui passent d'un état quiescent à un phénotype angiogénique (Lambeng, Wallez et al. 2005; Wallez, Vilgrain et al. 2006).

Dans les vaisseaux quiescents la tyrosine phosphorylation de la VE-cadhérine est régulée par des phosphatases associées au complexe jonctionnel qui conduisent à une forme déphosphorylée de la VE-cadhérine. Ces observations concordent avec l'inhibition de contact observée in vitro sur des cellules en culture arrivées à confluence (Lambeng, Wallez et al. 2005).

Les molécules d'adhésion intercellulaire constitutives des jonctions adhérentes (VE-cadhérine) et des jonctions communicantes (connexines 37, 40 et 43) sont importantes pour la survie et le remodelage vasculaire (Simon and McWhorter 2002).



**Fig 21. Rôle des VE-cadhérines dans l'intégrité de la barrière endothéliale.** Les VE-cadhérines font partie des jonctions adhérentes et sont raccordées au cytosquelette d'actine par des protéines intermédiaires, les caténines. La phosphorylation de la VE-cadhérine par Src sur son domaine cytosolique, consécutivement à l'activation du VEGFR, induit la dissociation du complexe jonctionnel membranaire, le recrutement de protéines partenaires comme la p120-caténine, et une signalisation intracellulaire induisant notamment une augmentation de la perméabilité vasculaire. (Gavard and Gutkind 2006)

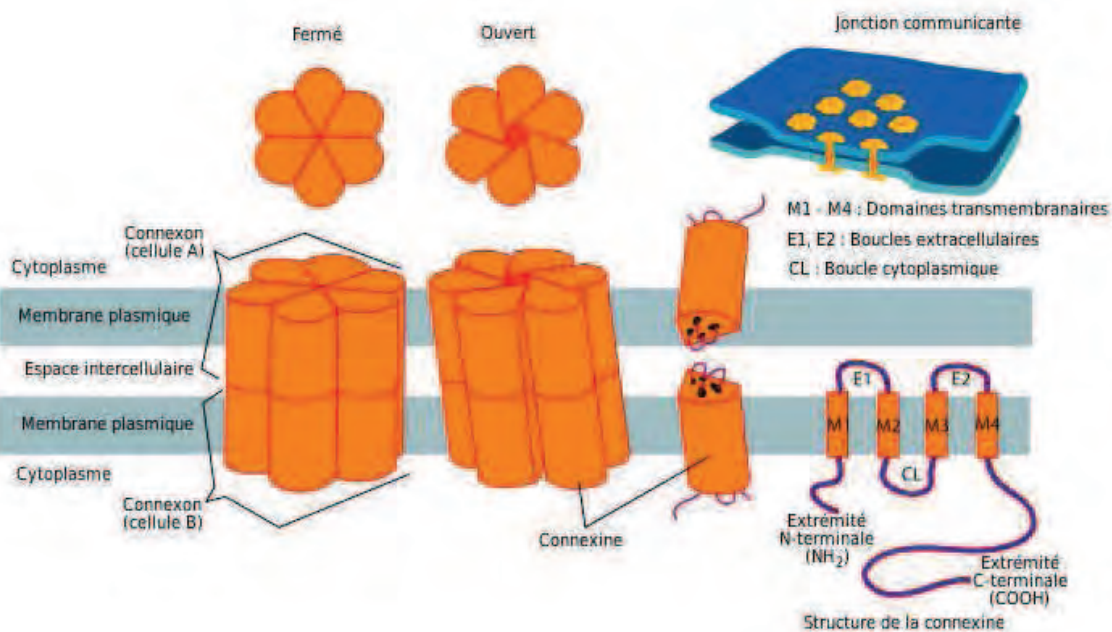
### 2.4.2.3. Les connexines

Les connexines sont des protéines transmembranaires constitutives des gaps junctions. Les jonctions communicantes (gap junctions) permettent des interactions intercellulaires essentielles dans de nombreux processus physiologiques, tels que la dépolarisation synchronisée du muscle cardiaque, le développement embryonnaire, ainsi que certaines réponses vasculaires. Ces jonctions sont composées de deux héli-canaux, les connexons, eux même composés de six molécules de connexine. Le trafic membranaire des connexons, l'assemblage/désassemblage des jonctions gap et leur dégradation peuvent être régulés par un jeu de phosphorylation/déphosphorylation (Solan and Lampe 2005).

La principale protéine constitutive des jonctions gap exprimées dans les cellules vasculaires (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) est la Connexine 43 (Cx43). L'activité de la Cx43 est régulée par des phosphorylations, pouvant être médiées par plusieurs kinases, comme PI3K/Akt, PKC, MAPK et src, qui modulent l'assemblage des jonctions gap et leur fonctionnement (Solan and Lampe 2005; Solan and Lampe 2009).

L'expression des différentes connexines varie le long de l'arbre vasculaire et également au niveau d'un même site en fonction du temps et de l'évolution de l'athérosclérose. Plusieurs études ont montré une surexpression de la Cx43 dans les régions d'épaississement de l'intima dans le cadre de

lésions d'athérosclérose humaine ou murine (Brisset, Isakson et al. 2009), indiquant que l'hyperplasie intimale est liée à l'augmentation de l'expression de la Cx43. Une surexpression de la connexine 43 chez le rat, potentialise la prolifération des cellules musculaires lisses carotidiennes après lésion vasculaire chirurgicale, et induit une diminution des marqueurs normalement exprimés dans les CML de phénotype contractile. La Cx43 module la différenciation phénotypique des CML et accroît leur prolifération après lésion intimale (Song, Yu et al. 2009). A l'inverse une réduction de la Cx43 par mutation hétérozygote (Cx43 +/-) chez la souris LDLR -/- permet de limiter l'hyperplasie neointimale « post ballonisation » (angioplastie forcée par ballonnet) en diminuant la réponse inflammatoire macrophagique et en limitant la prolifération et la migration de cellules musculaires lisses au niveau de l'espace sous intimal (Chadjichristos, Matter et al. 2006). Les connexines 43 principalement (et plus accessoirement Cx 37 et 40), jouent également un rôle important dans la croissance et la prolifération des cellules endothéliales. La formation des « tubes » *in vitro* sur des cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) en Matrigel™ est nettement altérée par le blocage spécifique des Cx43, Cx40 et Cx37 à l'aide des siRNA correspondants. Ces connexines ayant été retrouvées au niveau des embranchements du maillage réalisés par la tubulogenèse des HUVEC en Matrigel® (Gartner, Ziegelhoffer et al.).

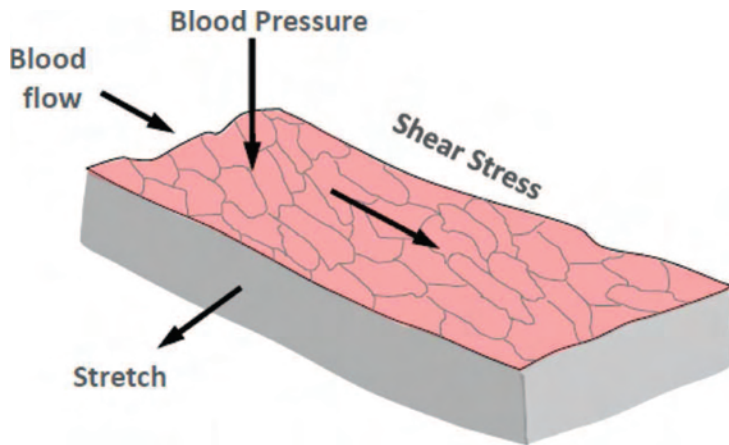


**Fig 22. Structure d'un connexon.** D'après Matthieu SIMON. Fondateur et rédacteur principal de Cours-Pharmacie Cours-pharmacie. Com

### **2.4.3. Facteurs mécaniques**

A côté de ces nombreux facteurs métaboliques, des facteurs mécaniques régulent aussi *in vivo* le phénomène d'angiogenèse. Deux types de forces mécaniques agissent simultanément sur la paroi artérielle. Les forces de cisaillement (shear stress), tangentielles à la paroi vasculaire et générées par un flux sanguin laminaire, et l'étirement circonférentiel (stretch ou circumferential stretch) généré par la pression sanguine artérielle.





**Fig 23. Les forces mécaniques appliquées à la paroi vasculaire par le flux sanguin circulant et la pression artérielle.** Le flux sanguin génère une force tangentielle à la surface endothéliale (shear stress) alors que la pression sanguine induit un étirement circonférentiel (stretch). (Chien 2007)

#### 2.4.3.1. Pression sanguine artérielle

Lorsque la pression sanguine artérielle est trop élevée de façon chronique, et quelque soit la cause de cette hypertension artérielle, il survient une augmentation de la pression de perfusion sanguine dans les microvaisseaux conduisant à une raréfaction du réseau capillaire (Prewitt, Chen et al. 1982; Hansen-Smith, Greene et al. 1990).

Dans les premiers temps de l'hypertension ou lors d'une poussée tensionnelle aigue et régressive, il y a une adaptation fonctionnelle du lit capillaire à cette augmentation de perfusion sanguine. L'augmentation de l'oxygénation tissulaire liée à l'hyper-perfusion tissulaire induit une vasoconstriction de certains capillaires (raréfaction capillaire fonctionnelle) pour rétablir une oxygénation tissulaire dans les seuils de normalité.

Cependant cette autorégulation ne peut pas compenser sur le long terme l'augmentation de perfusion capillaire qui induit une hyperoxie prolongée au niveau des tissus. L'augmentation de pression en oxygène est à l'origine localement d'une diminution des taux de base de VEGF A et des autres facteurs pro-angiogéniques dépendant de l'oxygène, qui associée à une diminution du flux sanguin suite à la raréfaction fonctionnelle, induit à long terme une raréfaction capillaire structurale avec dégénérescence des cellules endothéliales et musculaires lisses de nombreux capillaires (Hansen-Smith, Greene et al. 1990; Humar, Zimmerli et al. 2009).

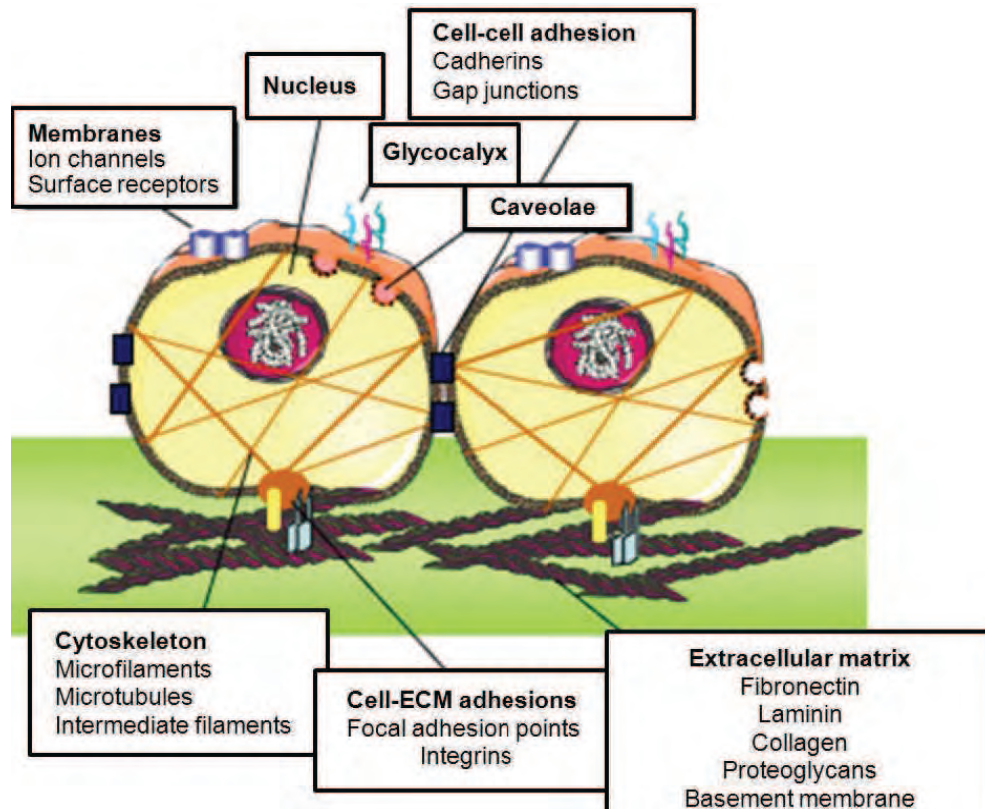
A l'inverse l'hypertension peut être limitée, voire normalisée par stimulation de l'angiogénèse en condition d'hypoxie pendant plusieurs semaines chez le rat spontanément hypertendu. En effet l'hypoxie normobarique chronique (pendant 8 semaines) induit chez ces rats une synthèse de VEGF A dans les muscles squelettiques, à l'origine d'un doublement de la densité capillaire des quadriceps. Cette augmentation du lit capillaire périphérique permet de prévenir l'hypertension artérielle chez des rats jeunes et de normaliser la pression sanguine artérielle systolique chez les rats adultes ayant une hypertension installée. Cette réversion de la pression sanguine artérielle en condition hypoxique associée à une augmentation de synthèse de VEGF A, a été neutralisée par l'utilisation d'un anticorps bloquant du VEGF A (Vilar, Waeckel et al. 2008).

D'autres travaux chez l'homme ont également montré que les muscles squelettiques de patients hypertendus étaient moins vascularisés et contenaient moins de VEGF A que ceux de patients normotendus. Chez ces patients, une période d'entraînement physique de seize semaines a permis de

réduire la pression artérielle moyenne de  $7,1 \pm 0,8$  mmHg, d'augmenter la synthèse musculaire de VEGF de 67% et d'augmenter le ratio capillaires/fibres de 17% (Hansen, Nielsen et al. 2010).

Enfin des études de phase 4 sur plusieurs traitements anti-angiogéniques utilisés en adjuvants de certaines chimiothérapies anticancéreuses ont montré que l'HTA est le principal effet secondaire dose-dépendant de ces traitements qui induisent une raréfaction du lit capillaire (Humar, Zimmerli et al. 2009).

Toutes ces études montrent bien le lien qui existe entre le remodelage microvasculaire, l'angiogenèse et la pression sanguine artérielle.



**Fig 24. Mécanosenseurs des cellules endothéliales.** La transmission des forces mécaniques liées au flux sanguin et la pression artérielle, se fait par diverses molécules constitutives de la MEC, des molécules d'adhésion à MEC ou des molécules d'adhésion intercellulaires, reliées au cytosquelette par des composants membranaires. (Balligand, Feron et al. 2009)

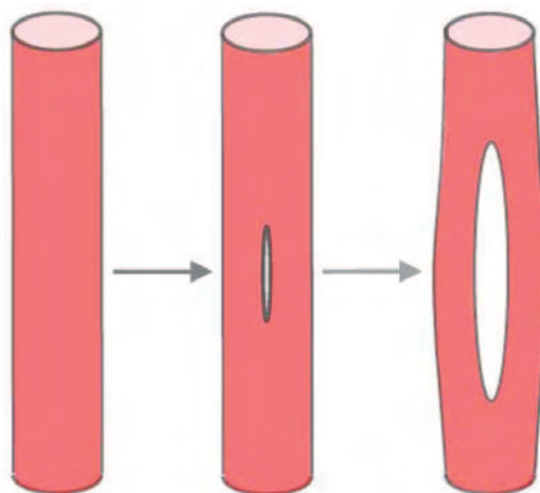
#### **2.4.2.2. Forces de cisaillement (shear stress)**

Les forces de cisaillement sont des forces tangentielles à la paroi des artères où règne un flux laminaire (artères rectilignes de gros diamètre comme l'aorte descendante). Ces forces aussi appelées shear stress, stimulent assez peu la signalisation pro-inflammatoire et/ou proliférative au niveau de cellules endothéliales voire l'inhibent lorsqu'elles sont soutenues. A l'inverse les flux turbulents présents au niveau de la crosse aortique, des bifurcations artérielles ou au niveau d'un obstacle endoluminal (comme une plaque d'athérome), induisent une importante signalisation pro-inflammatoire et mitogène au niveau des cellules de la paroi vasculaire (Chien 2007). Cette signalisation passe par des mécanorécepteurs présents à la surface des cellules endothéliales et qui peuvent être les complexes d'adhésion intercellulaires ou d'adhésion des cellules à la matrice

extracellulaire, certains éléments de la matrice extracellulaire, des composants de la membrane plasmique comme les canaux ioniques, les cavéoles, des récepteurs de surface, et le cytosquelette d'actine. Grâce à ces différents éléments, les forces de cisaillement qui s'appliquent à la surface luminale des cellules endothéliales sont transmises à travers la cellule vers les jonctions intercellulaires et vers la matrice extracellulaire via les molécules d'adhésion (Balligand, Feron et al. 2009).

Un shear stress important est protecteur pour la paroi des ces artères car il permet de promouvoir la survie cellulaire de l'endothélium et sa stabilisation dans l'alignement du flux sanguin ainsi que la sécrétion de substances vasodilatatrices et anticoagulantes (Styp-Rekowska, Hlushchuk et al. 2011). A l'inverse les flux turbulents à l'origine d'un faible shear stress, favorisent la prolifération et l'apoptose des cellules endothéliales, expliquant l'apparition des premières lésions athéromateuses au niveau des bifurcations artérielles et de la crosse aortique.

Ainsi, l'angiogenèse par sprouting induite par un gradient de VEGF (généralisé par des tissus hypoxiques par exemple), est inhibée par un shear stress important, qui conduit plutôt à une stabilisation des vaisseaux matures (Song and Munn 2011), alors que des vaisseaux lésés ou occlus, où le flux sanguin est ralenti voire stagnant, pourront au contraire être remodelés jusqu'à l'établissement d'une nouvelle continuité vasculaire permettant le passage du flux sanguin qui va stabiliser le vaisseau néoformé (Milkiewicz, Brown et al. 2001). Un flux sanguin ralenti, comme c'est le cas dans les capillaires et les veines, est plus propice une angiogenèse par bourgeonnement induite par un gradient de VEGF synthétisé par les cellules de voisinage dans le cadre d'une ischémie tissulaire ou dans les phénomènes inflammatoires ou de cicatrisation, alors qu'une vitesse sanguine plus élevée avec un flux sanguin laminaire tel qu'on le retrouve dans les artères, favorise plutôt la stabilité et la cohésion vasculaire des gros troncs artériels via la synthèse de VEGF par cet endothélium et l'orientation et la réorganisation du lit artériel par intussusception dans le sens du flux sanguin (Zhou, Egginton et al. 1998).



**Fig 25. Angiogenèse par intussusception sous l'effet du shear stress. (Zhou, Egginton et al. 1998)**



### **3. ATHEROSCLEROSE :**

#### **3.1. Définition de l'athérosclérose, épidémiologie**

L'OMS a défini l'athérosclérose comme une « association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires ; le tout accompagné de modifications de la média. » (Définition OMS 1957)

L'athérosclérose et ses complications cardiovasculaires représentent la principale cause de morbi-mortalité dans les pays développés et posent un problème majeur de santé publique. De nombreux facteurs de risque, à la fois environnementaux et génétiques, ont été décrits, l'hypercholestérolémie étant le principal.

#### **3.2. L'athérogénèse**

L'athérosclérose est une pathologie lente et progressive aboutissant à la formation de plaques composées de dépôts lipidiques riches en cholestérol (athérome) enveloppés dans une gangue fibreuse (sclérose). Les lésions d'athérosclérose se développent au niveau des artères de gros et moyen calibre, en particulier dans les zones de bifurcation où l'endothélium est activé par l'hémodynamique sanguine (flux non laminaire).

##### **3.2.1. Classification anatomopathologique des lésions**

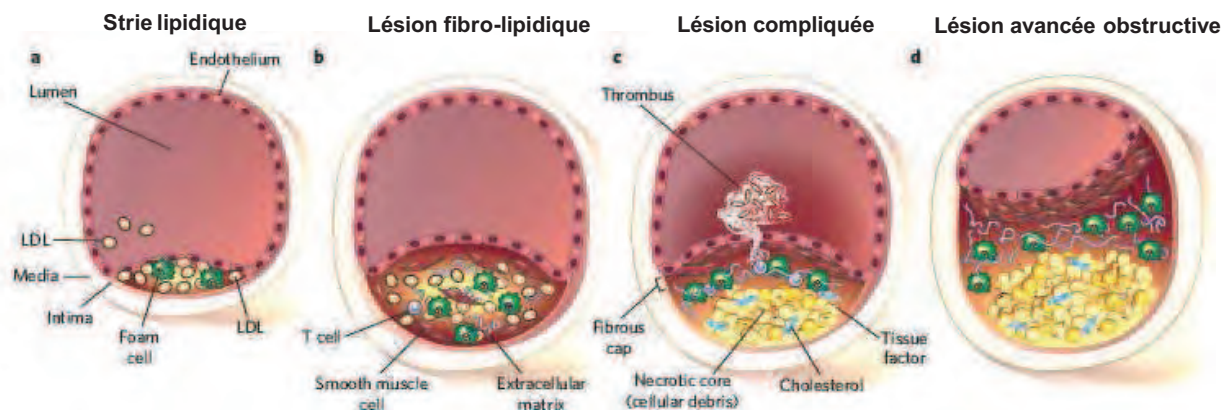
Stade	Appellation	Description	Age	Clinique
I	Macrophages spumeux isolés	Macrophages spumeux isolés dans l'intima. Absences de lipides extracellulaires	De 0 à 10 ans	Plaque silencieuse
II	Stries lipidiques	Couches de macrophages spumeux. CML de l'intima chargées de lipides. Fines particules lipidiques extracellulaires disséminées.		
III	Pré-athérome	Modifications de type II associées à de multiples dépôts lipidiques extracellulaires formant de petits agrégats.	De 20 à 30 ans	
IV	Athérome	Modifications de type II associées à des dépôts lipidiques rassemblés au sein d'un noyau lipidique	À partir de 40 ans	Plaque active
V	Plaque Athéroscléreuse	Modifications de type IV associées à des dépôts massifs de collagène (chape fibreuse) recouvrant le noyau lipidique avec calcification		
VI	Plaque athéroscléreuse compliquée	Modifications de type V avec rupture de la chape fibreuse, hémorragie intraplaque ou thrombose		
VII	Plaque Fibreuse	Epaississement massif de l'intima par sclérose. Lipides intra et extra cellulaires quasi absents		

Fig 26. Classification des lésions de l'athérosclérose. (Stary, Chandler et al. 1995)



Les lésions initiales d'athérosclérose peuvent commencer à se développer très tôt dans la vie, chez les jeunes enfants. Elles se développent dans des territoires électifs, qui sont par ordre décroissant : l'aorte thoracique, l'aorte abdominale, les coronaires, les zones de bifurcation artérielles.

La description anatomopathologique simplifiée de l'athérosclérose retient trois principaux stades évolutifs : strie lipidique, lésion fibro-lipidique et lésion compliquée (figure 26).



**Fig 27. Initiation et progression de l'athérosclérose.** Les premières lésions d'athérosclérose surviennent dans des sites de l'arbre vasculaire où règne un flux sanguin turbulent. La lésion commence par l'apparition d'une strie lipidique (a). A ce stade la lésion peut régresser ou évoluer vers une lésion intermédiaire fibro-lipidique (b), qui peut ensuite devenir instable et se rompre (c), et évoluer vers une lésion avancée obstructive (d). (Rader and Daugherty 2008)

Stary a proposé en 1994 et 1995 (Stary, Chandler et al. 1994; Stary, Chandler et al. 1995) sous l'égide de l'American Heart Association (figure 25), une classification plus détaillée en sept stades de gravité croissante, qui décrit un phénomène continu qui tient compte de la séquence de développement des lésions, et des éléments impliqués dans la croissance de la plaque, notamment des lipoprotéines de basse densité riches en cholestérol qui s'accumulent initialement de façon focale dans des zones de prédilection, et qui sont à l'origine des lésions ultérieures.

### 3.2.2. Théorie inflammatoire de l'athérogenèse

L'athérosclérose est aujourd'hui considérée comme une maladie inflammatoire chronique des grosses artères, touchant principalement la région intimale et sous-intimale (Libby 2002). L'état d'activation inflammatoire de l'endothélium semble être le point de départ de la maladie athéroscléreuse (Ross 1999).

On peut schématiquement diviser la formation de la plaque d'athérome en cinq étapes : (Lusis 2000)

- **Augmentation de la perméabilité endothéliale** sous l'effet de forces de cisaillement liées à l'hémodynamique sanguine (flux turbulent) au niveau des bifurcations artérielles (endroits de l'arbre vasculaire où apparaissent les premières plaques d'athérome). Cette augmentation de la perméabilité endothéliale permet l'infiltration de lipoprotéines de faible densité (LDL), transportant physiologiquement le cholestérol vers les tissus périphériques, dans l'espace sous endothélial où elles y sont piégées par les protéoglycanes de la matrice extracellulaire. Cette accumulation de LDL dans l'espace sous endothélial est d'autant plus importante que la concentration sanguine en LDL est élevée, et constitue l'évènement primaire de l'athérosclérose.



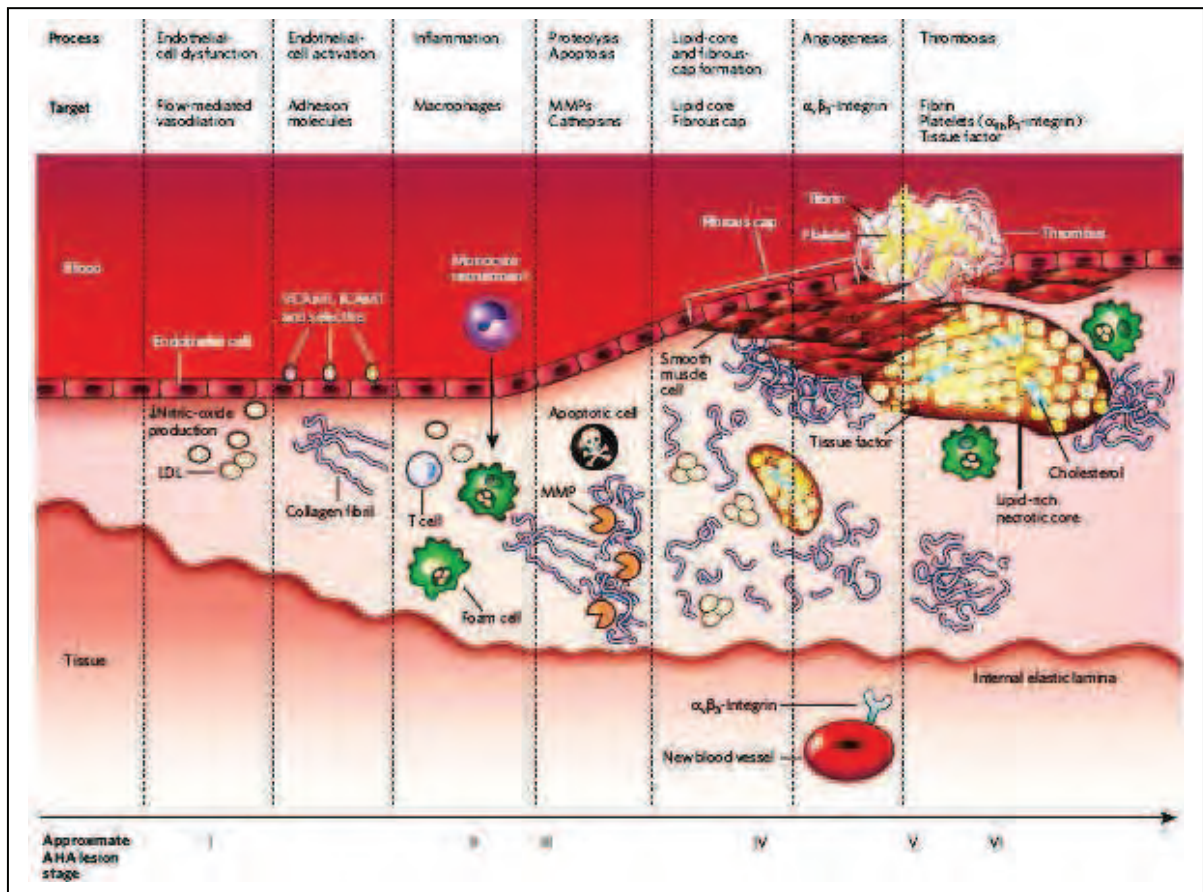
- **Oxydation intimale des LDL infiltrées**, par des ROS (Reactive Oxygen Species) générées par les cellules endothéliales activées. Ces LDL oxydées (LDLox) formées localement vont avoir un effet sur les cellules vasculaires environnantes.

- **Activation de l'endothélium** par les LDLox et les facteurs hémodynamiques (flux turbulent), dont les cellules vont se mettre à exprimer des molécules d'adhésion (ICAM-1, P-selectine, E-selectine, PCAM-1 and VCAM-1) ainsi que des chemokines (MCP-1) et des facteurs de croissance macrophagiques (MCS-F). Ce phénomène va permettre de recruter des monocytes circulants qui vont passer par diapédèse à travers l'endothélium et pénétrer dans l'espace sous-endothélial, où ils seront alors transformés en macrophages.

- **Formation des cellules spumeuses et du cœur lipidique de la plaque.** En parallèle de l'extravasation des monocytes et de leur transformation en macrophage, l'oxydation des LDL s'amplifie par des mécanismes enzymatiques (myelopéroxydase, sphingomyelinase et phospholipase) et non enzymatiques (ROS produites par les cellules endothéliales et les macrophages). Ces LDL fortement oxydées ont une apoprotéine B modifiée qui ne sera plus reconnue par le récepteur des LDL, ce qui favorise leur accumulation dans l'espace sous endothélial. Les macrophages et les cellules musculaires lisses recrutés au niveau de la plaque captent ces LDLox dont l'apoB est modifiée, par l'intermédiaire de récepteurs scavengers ou de récepteurs des LDLox. L'expression de ces récepteurs à la surface cellulaire n'étant pas régulée, la quantité croissante de cholestérol internalisé aboutit à la formation de cellules spumeuses qui forment des amas de cellules chargées en lipides disposées dans le sens du flux sanguin et visibles sous l'endothélium (stries lipidiques). Les macrophages présents au sein de la lésion produisent des médiateurs proinflammatoires (cytokines, radicaux oxydants...) qui entretiennent l'état inflammatoire local avec une tendance à l'auto-amplification. La mort de ces cellules spumeuses au centre de la lésion est à l'origine du développement du cœur nécrotico-lipidique de la plaque.

- **Formation de la chape fibreuse.** Sous l'effet de divers agents biologiques (facteurs de croissance, des cytokines pro-inflammatoires et les LDL oxydées), les cellules musculaires lisses (CML) migrent de la média vers l'intima où elles vont proliférer et passer d'un phénotype contractile à sécrétoire et ainsi produire de la matrice extracellulaire qui va former la chape fibreuse de la plaque. Cette chape fibreuse isole le cœur lipidique, proathérogène et thrombogène, de la lumière artérielle, favorisant la stabilité de la plaque. L'excès de prolifération de ces cellules musculaires lisses peut aboutir à une sténose importante de la lumière artérielle qui peut provoquer une ischémie transitoire lors d'un besoin accru en oxygène (effort) nécessitant une augmentation du débit sanguin local. L'ensemble « cœur lipidique et chape fibreuse » constitue la plaque d'athérome (Ross 1999; Lusis 2000; Libby 2002).

- **Les stades ultérieurs de développement de la plaque constituent les complications** (rupture, thrombose, hémorragie) et sont repris plus en détail dans le chapitre concerné.



**Figure 28. Etapes de la formation de la plaque d'athérome.** Les LDL natives passent dans le sous-endothélium où elles sont piégées et oxydées. Cette oxydation provoque l'arrivée des monocytes sur la lésion qui vont phagocyter les LDL oxydées et se transformer en cellules spumeuses. Ces dernières s'accumulent, forment le cœur lipidique et induisent également la migration et la prolifération des CML. Les CML recouvrent le cœur lipidique pour former la chape fibreuse. (Sanz and Fayad 2008)

### 3.2.3. Rôle de l'angiogénèse dans l'athérogenèse

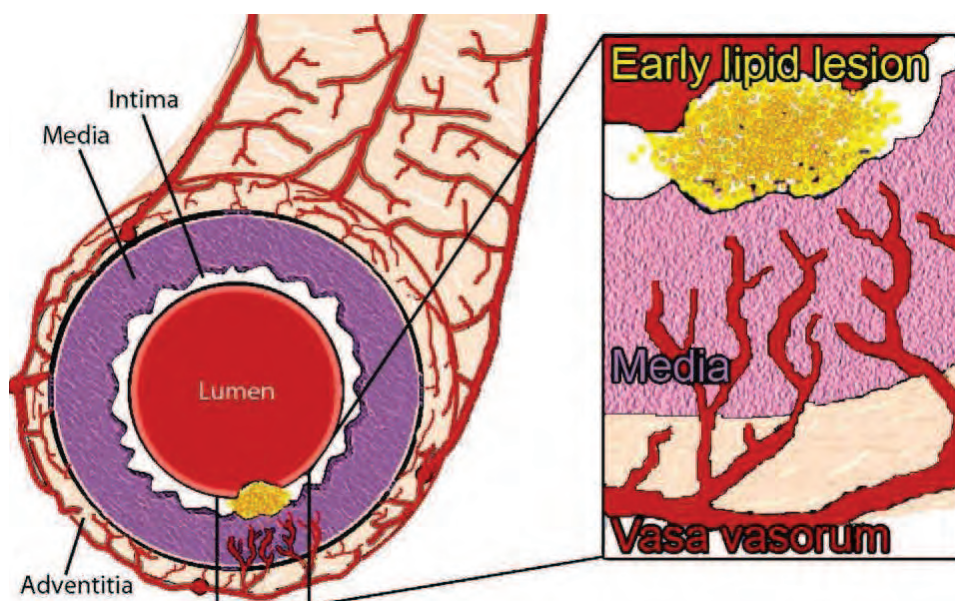
Pendant de nombreuses années, les études sur l'athérogenèse se sont focalisées sur le métabolisme lipidique et la réponse inflammatoire représentée par l'extravasation leucocytaire observée au niveau des plaques compliquées. Des études plus récentes montrent en plus un rôle important de la néoangiogénèse sous intimale dans l'épaississement et la déstabilisation de la plaque d'athérome.

Dans la paroi des artères de moyen et gros calibre, au niveau desquelles se développent les plaques d'athérome, on observe un réseau microvasculaire localisé dans l'adventice, les 'vasa vasorum', qui a pour rôle d'apporter oxygène et nutriments aux couches les plus externes de la paroi artérielle. Alors que ces microcapillaires n'existent pas au niveau de la media et de l'intima des artères normales, il se produit une neovascularisation en regard de l'hyperplasie intimale des artères athéroscléroseuses (Tanaka, Nagata et al. 2011), souvent associée à des hémorragies intra-plaques (Moreno, Purushothaman et al. 2006).

En effet il a été rapporté un lien entre la densité des microvaisseaux et la fréquence des hémorragies au sein de la plaque (Fryer, Myers et al. 1987; McCarthy, Loftus et al. 1999). Il a été retrouvé, à l'intérieur de la plaque d'athérome, la présence de fer, de fibrine et d'érythrocytes suggérant l'existence de saignements hémorragiques intra-plaques. Ces hémorragies visualisées sur des coupes de carotides humaines athéromateuses, sont souvent associées à une présence importante

de macrophages (CD68+) impliqués dans la phagocytose des hématies et du fer. On retrouve également une quantité importante de plaquettes (immunomarquage C41) et de fibrine au niveau du cœur nécrotico-lipidique ainsi qu'au niveau de l'épaule de la plaque à proximité des néovaisseaux, suggérant un phénomène de coagulation associé à l'hémorragie (Michel, Virmani et al. 2011).

Ces hémorragies joueraient un rôle dans la déstabilisation de la plaque, puisqu'il a été rapporté un lien étroit entre la présence d'hémorragies intra-plaques et les événements cliniques thromboemboliques tels que les accidents ischémiques transitoires, les amauroses fugaces (perte transitoire de la vision) et les accidents vasculaires constitués, ou (Gao, Chen et al. 2007),



**Fig 29. Représentation schématique de la réponse angiogénique centripète** depuis les vasa vasorum adventitielles localisées en regard de la lésion lipidique. (Ho-Tin-Noe and Michel 2011)

### **3.2.3.1. Facteurs influençant l'angiogénèse dans la plaque d'athérome**

Ces hémorragies sont essentiellement liées à l'angiogénèse centripète des vasa vasorum depuis l'adventice jusqu'à la plaque (Michel, Thaumat et al. 2007). Cette angiogénèse apparaît assez précocement dans l'évolution de la maladie athéromateuse et est en rapport, entre autre, avec l'accumulation de médiateurs lipidiques liés à la surcharge lipidique à l'intérieur de la plaque. Les LDL oxydées, notamment par leur effet pro-angiogénique, peuvent conduire à cette néovascularisation des plaques, qui favorise l'expansion de la plaque par apport de nutriments et de lipides (Kolodgie, Gold et al. 2003; Moreno, Purushothaman et al. 2006). Cette néovascularisation augmente aussi le risque d'hémorragies intraplaques car ces microcapillaires sont fragilisés localement par la présence de lipides oxydés, toxiques. Ces hémorragies intraplaques accroissent le risque de rupture de plaque et d'accident d'athérothrombose (Khurana, Simons et al. 2005; Moreno, Purushothaman et al. 2006; Michel, Virmani et al. 2011).

D'autres éléments peuvent impacter cette angiogénèse comme l'épaississement de la paroi artérielle à l'origine d'une hypoxie locale, notamment au niveau du cœur lipidique où s'accumulent les



cellules spumeuses. Cette hypoxie, soit liée à un défaut d'apport en oxygène à cause de l'épaississement pariétal, soit liée à une augmentation des besoins métaboliques des cellules inflammatoires, est à l'origine d'une augmentation de l'expression du facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor) lui-même à l'origine d'une augmentation de la transcription du VEGF par les cellules vasculaires de la plaque (monocytes/macrophages, cellules spumeuses, CML). Un marqueur d'hypoxie (pimonidazole) injecté en intrapéritonéal à des souris LDLR -/- peu de temps avant leur sacrifice a permis de montrer une co-localisation de ce marqueur avec des macrophages au niveau de plaques carotidiennes induites par un régime hypercholestérolémiant chez ces souris (Sluimer and Daemen 2009). La synthèse de VEGF qui fait suite à cette hypoxie stimule le développement des microcapillaires en regard de la plaque d'athérome.

Les cellules musculaires lisses peuvent aussi jouer un rôle « d'organisateur » de cette réponse angiogénique initiée par l'accumulation et la rétention de lipides au sein de la plaque. Les LDLox et les eicosanoïdes présents dans la plaque induisent un changement phénotypique des cellules musculaires lisses de la média qui secrètent alors du VEGF A capable à son tour de stimuler l'angiogénèse des vasa vasorum sous jacentes (de l'adventice) (Jozkowicz, Dulak et al. 2000; Yamakawa, Hosoi et al. 2000; Dulak, Jozkowicz et al. 2001). De plus il a été récemment montré que la fraction lipidique de la plaque d'athérome pouvait induire un changement phénotypique des cellules musculaires lisses vasculaires humaines et murines à l'origine d'une augmentation de la synthèse de VEGF par ces cellules se prolongeant pendant plusieurs jours après l'arrêt du stimulus. Des CML murines stimulées par la fraction lipidique de plaques d'athérome humaines peuvent également stimuler la vascularisation d'implants de Matrigel chez la souris, ce qui a permis de conclure à la régulation du phénotype angiogénique des CML par les lipides de la plaque (Ho-Tin-Noe and Michel 2011).

### **3.2.3.2. Conséquences de l'angiogénèse sur la plaque d'athérome**

Les hémorragies intra-plaques sont impliquées à différents degrés dans la progression de l'athérothrombose, en potentialisant trois principaux mécanismes impliqués dans les complications de la plaque : la production et la rétention de cristaux de cholestérol, l'oxydation, et la protéolyse à l'intérieur de la plaque (Michel, Virmani et al. 2011).

#### **- Formation de cristaux de cholestérol à l'intérieur de la plaque**

Le cœur de la plaque déjà riche en cristaux de cholestérol va en être encore enrichi par l'afflux de cellules sanguines lors de l'hémorragie. Les membranes de ces cellules circulantes (plaquettes activées (Chandler and Hand 1961; Kruth 1985), leucocytes et surtout érythrocytes (Kolodgie, Burke et al. 2007) peuvent relarguer du cholestérol libre au sein de la plaque. Des études ont montré que le cholestérol non estérifié contenu dans les membranes des globules rouges est fortement associé aux instabilités cliniques chez les patients coronariens (Tziakas, Kaski et al. 2007; Tziakas, Chalikias et al. 2008).

Ce cholestérol libre va former des cristaux de cholestérol dont la pathogénicité est liée à leur capacité à rompre les membranes biologiques, à éroder la chape fibreuse (Abela and Aziz 2005; Abela and Aziz 2006) et à faire protrusion dans la lumière vasculaire où ils peuvent être à l'origine d'embolies ou de thromboses (Abela, Aziz et al. 2009). Ces cristaux de cholestérol peuvent également déclencher une réponse inflammatoire à l'intérieur de la paroi artérielle (Düwell, Kono et al. 2010; Rajamaki, Lappalainen et al. 2010) et éroder les microvaisseaux néoformés au sein de la

plaque (Ho-Tin-Noe and Michel 2011). La présence de cristaux de cholestérol dans la paroi artérielle est donc un facteur de thrombose pariétale aggravé par l'angiogenèse et les hémorragies intraplaques.

#### - **Oxydation à l'intérieur de la plaque**

A l'intérieur de la plaque il y a des hydroperoxydes (van den Berg, Op den Kamp et al. 1992), des lipoprotéines oxydées, et des lipides qui induisent une lyse des globules rouges apportés par les hémorragies et la libération de l'hémoglobine qu'ils contiennent (Nagy, Eaton et al. 2010). Le fer de l'hémoglobine s'oxyde alors en fer ferrique qui se dissocie plus facilement de la globine que le fer ferreux, libérant le complexe hème/fer hautement délétère par l'oxydation des lipides de la plaque qu'il induit, à l'origine d'une cytotoxicité endothéliale (Balla, Jacob et al. 1991; Abraham, Lavrovsky et al. 1995).

Il a été en effet retrouvé une co-localisation de CD163 (récepteur scavenger de l'hémoglobine), de 4-hydroxy-2-nonéol (produit de peroxydation lipidique) et de CD-31 (marqueur endothélial) plus importante au sein de plaques d'athérome instables issues de patients souffrant d'angor instable que chez ceux ayant un angor stable (sur pièces d'athérectomie réalisées sur des artères coronariennes de ces patients) (Yunoki, Naruko et al. 2009). Ceci suggère qu'il règne un stress oxydant plus important dans les plaques instables que dans les plaques stables. Il a été d'ailleurs créé un modèle de plaques instables chez la souris, au sein desquelles on retrouve une quantité importante de microvaisseaux (et marquage CD-31 en immunofluorescence) adjacents à un dépôt de fer témoin d'hémorragies anciennes (Chen, Bui et al. 2013) et suggérant que ces dépôts hémorragiques sont issus de ces microcapillaires.

En plus de ces agents oxydants, les neutrophiles et les monocytes libérés par extravasation à partir de ces microcapillaires et associés aux hémorragies, ont également un pouvoir pro-oxydant par les enzymes qu'ils contiennent (NADPH oxydase, Myeloperoxydase) potentialisant encore l'oxydation au sein de la plaque (Sugiyama, Okada et al. 2001; van der Veen, de Winther et al. 2009).

Finalement, les lipides oxydés présents au cœur de la plaque favorisent le développement de cette angiogénèse ainsi que la fragilisation des microvaisseaux néoformés, et cette angiogénèse favorise à son tour le développement de la plaque et la libération d'agents pro-oxydants au sein de la plaque lors des hémorragies intra-plaques.

Des systèmes de protections existent toutefois au sein de la plaque, pour limiter le stress oxydant lié à la libération d'hémoglobine. Parmi ces mécanismes on retrouve i/la capture et l'endocytose des globules rouges libérés lors des hémorragies, par les cellules musculaires lisses ou les macrophages de la plaque. Ce processus implique un mécanisme de redistribution des phosphatidylsérines de la membrane plasmique des globules rouges (Kolb, Vranckx et al. 2007); ii/la liaison de l'hémoglobine libre avec l'haptoglobine et la phagocytose du complexe par les macrophages CD163+ (haemoglobin scavengers). Ce phénomène est plus particulièrement lié au phénotype homozygote Hp1-1 de l'haptoglobine qui favorise la clairance de l'hémoglobine libre par ces CD163, alors que les phénotypes homozygote Hp2-2 et hétérozygote Hp1-2 facilitant peu la clairance de l'hémoglobine, ne préviennent pas le potentiel oxydatif de l'hémoglobine libre (Kalet-Litman, Moreno et al. 2010; Levy, Asleh et al. 2010); iii/la liaison du fer et de l'hème libres avec l'hémopexine suivie de l'endocytose du complexe et transport du fer par la ferritine (Michel, Virmani et al. 2011).

### - **Protéolyse à l'intérieur de la plaque**

Les activités fibrinolytiques, tPA, uPA, plasmine, sont proportionnelles à la complexité de la plaque et sont principalement générées par le cœur des plaques instables (endarterectomie de carotides humaines). Ces activateurs du plasminogène (et la plasmine) peuvent à leur tour être responsables de l'augmentation de l'activité métalloprotéasique retrouvée également augmentée au niveau de ces plaques comparativement à des plaques non compliquées notamment par la libération accrue de MMP-2 et MMP-9 à ce niveau (Leclercq, Houard et al. 2007). Les neutrophiles libérés lors des hémorragies participent également à la fragilisation de la plaque par les protéases libérées qui sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire et de l'amincissement de la chape fibreuse. Il a été retrouvé au niveau de plaques hémorragiques disséquées à partir de pièces d'endarterectomies de carotides humaines et traitées en immunohistochimie, une co-localisation des hémorragies (hémoglobine, plasminogène) avec des marqueurs de neutrophiles et des protéases (Pro-MMP-9 et MMP-9, complexe lipocaline/MMP-9 spécifique des neutrophiles) ainsi que des marqueurs de dégranulation leucocytaire (myéloperoxydase, élastase, alpha-1-antitrypsine) avec des niveaux plus élevés qu'au niveau des plaques non hémorragiques. Ce travail a également montré que les néovaisseaux observés à l'interface chape fibreuse/cœur lipidique avaient un endothélium activé (marquage P-selectine fortement positif) favorisant la diapédèse leucocytaire (Leclercq, Houard et al. 2007). La densité leucocytaire au sein de la plaque est d'ailleurs proportionnelle à la densité de micro-vaisseaux et aux hémorragies intra-plaques (Ionita, van den Borne et al. 2010). Cependant les plaquettes et les monocytes/macrophages amenés par ces néovaisseaux au sein de la plaque peuvent aussi amener des facteurs de résistance à la protéolyse comme PAI-1 et protéase nexin-1 (inhibiteurs de la thrombine, des activateurs du plasminogène et de la plasmine) qu'on retrouve localisés au niveau du cœur lipidique et de la chape fibreuse (Mansilla, Boulaftali et al. 2008). Le rôle des macrophages dans l'évolution de la plaque est finalement ambigu puisqu'ils sont à la fois impliqués d'une part dans les phénomènes d'épuration (scavenger) des résidus cellulaires, des matrices extracellulaire et de lipoprotéines de la plaque et, d'autre part, dans les phénomènes protéolytiques qui dégradent la chape fibreuse et aboutissent à la fissuration ou à la rupture de la plaque. La différenciation des monocytes de la plaque en différents types de macrophages (pro-athérogènes ou anti-inflammatoires) se fait sous l'influence de diverses cytokines inflammatoires ou sous l'influence du complexe hémoglobine/haptoglobine présent dans les plaques hémorragiques et phagocyté par les scavengers CD163 qui secrètent alors l'interleukine 10 conduisant à une différenciation macrophagique vers un phénotype athéroprotecteur (Bouhlel, Derudas et al. 2007; Boyle, Harrington et al. 2009).

Finalement cette néovascularisation des plaques d'athérome est non seulement un marqueur de l'avancement de la plaque mais aussi un indicateur de l'évolution de la plaque vers la rupture et les complications thromboemboliques qui en découlent (Ho-Tin-Noe and Michel 2011).

### **3.3. Evolution de la plaque et complications de l'athérosclérose**

A coté des évènements pouvant survenir dans l'évolution de la plaque consécutivement à sa vascularisation, d'autres complications peuvent survenir au niveau de ces plaques en perpétuelle évolution.



### **3.3.1. Remodelage vasculaire et sténose artérielle**

Pendant la majeure partie de son évolution, la plaque progresse tout en restant cliniquement silencieuse. Le vaisseau va subir un remodelage vasculaire qui va lui permettre d'adapter son diamètre à l'épaississement de la plaque. Cet élargissement compensatoire peut empêcher l'appréciation de la taille réelle de la plaque en artériographie, puisqu'il n'existe pas encore à ce stade d'obstacle hémodynamique.

La plaque continue d'évoluer par prolifération de cellules musculaires lisses et synthèse de matrice extracellulaire qui participent au développement de la chape fibreuse recouvrant un amas de lipides et de cellule spumeuses formant le cœur nécrotico-lipidique. Lorsque l'élargissement compensatoire du diamètre artériel est dépassé, la plaque fait protrusion dans la lumière vasculaire générant un obstacle hémodynamique pouvant être responsable de la symptomatologie fonctionnelle (Ross 1999; Lusis 2000).

Il a été décrit un autre type de remodelage, qui est à l'inverse du précédent, constrictif et qui survient en regard d'une plaque d'athérome qui n'est pas elle-même sténosante. Les mécanismes exacts de ce remodelage constrictif sont imparfaitement connus mais font vraisemblablement intervenir des phénomènes de fibrose au niveau de l'adventice et de la média. (D'après Allaire chap 16. and Bruneval chap 19., Toussaint et al., ed. Masson 2003). Ces mécanismes sont aussi impliqués dans les re-sténoses post-angioplastie avec ici en plus un défaut de synthèse du NO par dysfonction endothéliale (ou désendothélialisation lors de l'angioplastie) et un métabolisme accéléré du collagène sous l'effet des MMPs induisant une augmentation de la densité en collagène de la média et de la néointima (Pasterkamp, de Kleijn et al. 2000; Ward, Pasterkamp et al. 2000).

### **3.3.2. Anévrisme artériel**

Contrairement au remodelage compensateur, il s'agit d'une dilatation de l'artère avec une perte de parallélisme des bords de la paroi artérielle et une augmentation du diamètre vasculaire de plus de 50%. Le développement des anévrysmes serait le fait d'une destruction et d'une désorganisation des éléments structuraux de la matrice extracellulaire et surtout des fibres d'élastine de la média sous l'effet des métalloprotéases. Dans certaines conditions et en fonction de leur localisation, les anévrysmes artériels pourront se rompre et entraîner des complications hémorragiques très graves souvent létales, comprimer les organes de voisinage, se thromboser et emboliser à distance à partir de matériel thrombotique accumulé dans la concavité du vaisseau dilaté. D'après Allaire chap 16., Toussaint et al., ed. Masson 2003.

### **3.3.3. Anomalies de la vasomotricité, spasme**

En situation physiologique, l'endothélium normal répond à diverses stimulations (forces de cisaillement, présence de bradykinine, histamine, sérotonine, ou acétylcholine dans l'environnement des cellules) en produisant du NO (monoxyde d'azote, ou oxyde nitrique) qui entraîne un effet relaxant sur les cellules musculaires lisses de la média aboutissant à une vasodilatation. Ce NO est synthétisé par une synthase d'acide nitrique (NOS) à partir de L-arginine. Au cours de l'athérosclérose, la dysfonction endothéliale diminue la synthèse de NO, ce qui aboutit à une vasoconstriction (Anderson 1999; Deanfield, Halcox et al. 2007). Contrairement au retentissement de la plaque sur la lumière artérielle, ces anomalies de vasomotricité sont des atteintes fonctionnelles

qui peuvent survenir précocement dans le développement de la maladie athéroscléreuse et être à l'origine de manifestations cliniques ischémiques à un stade précoce, même en l'absence de lésion athéromateuse significativement sténosante.

### **3.3.4. Instabilité de la plaque et accident thrombotique**

Les complications graves de l'athérosclérose ne sont pas dues à la taille de la plaque mais à son instabilité (Mann and Davies 1996). L'intégrité de la chape fibreuse est un élément déterminant de la stabilité des plaques d'athérome. Sa rupture ou son érosion aboutissent à des accidents thrombotiques et ischémiques qui sont responsables des événements cliniques et de la gravité de la maladie athéroscléreuse.

Lorsqu'une rupture de la chape fibreuse survient, le sang pénètre dans la fissure et est mis en contact avec le cœur nécrotico-lipidique thrombogène. Ceci entraîne une activation plaquettaire et la formation d'un thrombus intraluminal susceptible d'obstruer la lumière artérielle et d'entraîner une ischémie du territoire d'aval. Ce thrombus peut aussi se fragmenter et emboliser à distance de la lésion d'athérome et être à l'origine d'une ischémie à distance de la plaque initiale.

La stabilité de la plaque dépend du volume et de la consistance du cœur lipidique, de l'épaisseur de la chape fibreuse et de l'importance de la réponse inflammatoire capable de moduler la signalisation des cellules vasculaires environnantes (Libby 2002; Ho-Tin-Noe and Michel 2011)

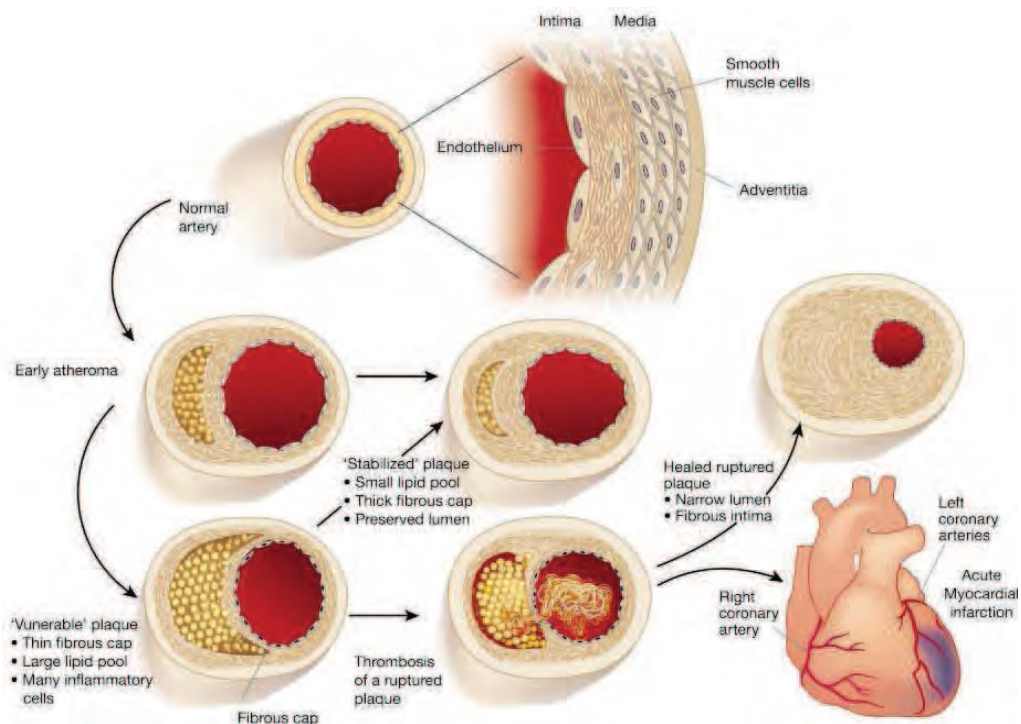
La stabilité de la plaque dépend beaucoup du rapport chape fibreuse / cœur lipidique. Une plaque est stable si elle contient beaucoup de fibres de collagène et de CML et au contraire peu de macrophages ou de cellules spumeuses et de lipides. A l'inverse, une plaque instable est composée d'une chape fibreuse fine présentant peu de CML, une inflammation à l'intérieur de la chape et un cœur nécrotique large (Lafont 2003).

La réaction inflammatoire locale en rapport avec la concentration en macrophages activés, est aussi un facteur d'instabilité. En effet ces macrophages activés qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, sont capables d'induire l'activation des métalloprotéases qui dégradent la matrice extracellulaire. Ceci induit un amincissement de la chape fibreuse favorisant la rupture de la plaque et les accidents thrombotiques (Galis and Khatri 2002).

L'apoptose des cellules constitutives de la plaque, induite par l'environnement inflammatoire, participe également à la fragilisation de la plaque. L'apoptose des cellules endothéliales déstabilise l'endothélium et facilite l'entrée des LDL et des cellules inflammatoires dans l'espace sous-endothélial (Dimmeler, Haendeler et al. 2002). L'apoptose des cellules musculaires lisses contribue à diminuer la synthèse de collagène (Clarke, Figg et al. 2006), et l'apoptose des macrophages favorise la libération de microparticules (Morel, Toti et al. 2006) et de facteur tissulaire procoagulant (Mallat and Tedgui 1999).

Les hémorragies intra-plaques induites par la rupture des microcapillaires néoformés dans la média et l'espace sous intimal, et fragilisés par l'hypoxie et le stress oxydant (Sluimer and Daemen 2009), peuvent induire directement une rupture de la plaque suite à la poussée de l'hématome pariétal, mais aussi favoriser indirectement la déstabilisation de la plaque par l'afflux et l'extravasation de monocytes/macrophages, d'hématies et d'hémoglobine, au moment du saignement. Le cœur

lipidique se trouve ainsi enrichi par le cholestérol membranaire de ces cellules sanguines et par des agents pro-oxydants comme l'hémoglobine et l'hème et les cellules inflammatoires activées (Virmani, Kolodgie et al. 2005; Michel, Virmani et al. 2011).



**Fig 30. Composition de la plaque, facteur de stabilité ou d'instabilité des lésions.** Une chape fibreuse épaisse et un petit cœur lipidique sont des facteurs de stabilité. A l'inverse une chape fine et un cœur lipidique développé favorisent l'instabilité, d'autant plus si les phénomènes inflammatoires locaux sont importants. Cette instabilité favorise les accidents ischémiques aigus. Un développement excessif de la chape fibreuse peut aboutir à un rétrécissement important de la lumière artérielle à l'origine d'une ischémie fonctionnelle lors d'une augmentation des besoins locaux en oxygène. (D'après P. Libby Nature 2002).

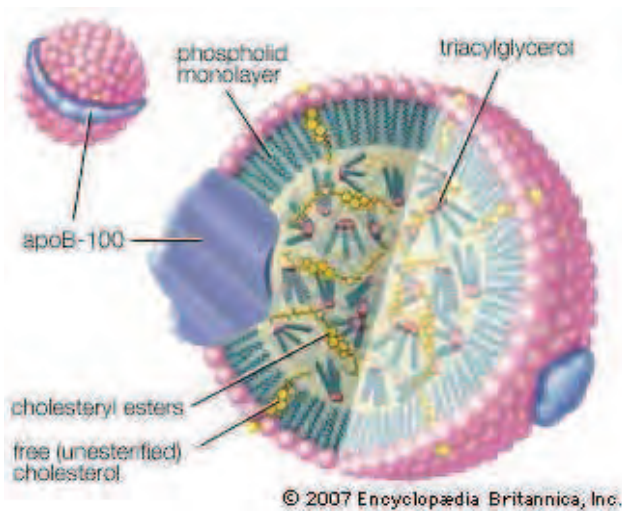
Les progrès de l'image médicale par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) permettent de mieux visualiser la structure des plaques *in vivo*, donc de mieux caractériser les plaques et de tenter de prévoir les évolutions potentiellement à risque athérotrombotique. Elle permet en effet de décrire la composition de la plaque par la visualisation du cœur lipidique, des calcifications, de la fibrose et des hémorragies intra-plaques. Cette nouvelle utilisation de l'IRM, encore au stade des essais clinique, permettra de dépister et de traiter précocement les patients à haut risque thromboembolique (prédiction d'instabilité en fonction de l'importance du cœur lipidique, de la présence d'hémorragies et de l'intégrité de la chape fibreuse) avant l'apparition de la symptomatologie clinique (Corti and Fuster 2011).



## **4. LES LDL OXYDEES**

L'importance de l'hypercholestérolémie, et en particulier des LDL (low density lipoproteins), dans l'athérogenèse chez l'homme est établie depuis de nombreuses années. Des essais cliniques en prévention primaire et secondaire chez des sujets hypercholestérolémiques ont montré un bénéfice des traitements hypocholestérolémiants par Statines, en terme de morbi-mortalité chez des patients atteints de coronaropathies et de cardiopathies ischémiques (Shepherd, Cobbe et al. 1995; Shepherd, Cobbe et al. 2004). Le rôle des LDL dans l'initiation et la transformation de la plaque d'athérome dépend des transformations biochimiques qu'elles subissent au sein de l'intima, notamment par oxydation.

### **4.1. Présentation schématique de la structure des lipoprotéines :**



**Fig 31. Structure d'une lipoprotéine de basse densité (LDL).** Le cœur contient principalement des esters de cholestérol (et quelques triglycérides) hydrophobes, tandis que la couche superficielle contient du cholestérol libre, des phospholipides et l'apolipoprotéine B (apoB100).  
D'après Encyclopædia Britannica, 2007.

Les lipoprotéines représentent la forme de transport sanguin du cholestérol et des triglycérides, qui sont des molécules hydrophobes, donc non hydrosolubles, qui forment des 'globules' gras stabilisés par une couche superficielle amphiphile, formée de phospholipides, de cholestérol et d'apoprotéines, qui sert d'interface avec l'eau environnante. Le cholestérol libre, qui contient une fonction alcool libre se positionne au niveau de la couche superficielle, alors que le cholestérol estérifié avec un acide gras est plus hydrophobe et se situe dans le cœur (ou core) des lipoprotéines. Les lipoprotéines subissent des remaniements constants durant leur transit intravasculaire. On distingue quatre classes majeures de lipoprotéines en fonction de leur composition en lipides et en apoprotéine :

- les chylomicrons, présents dans la circulation lymphatique et sanguine en période post-prandiales, contiennent des lipides d'origine alimentaire majoritairement représentés par des triglycérides, mais aussi dans une moindre proportion, par du cholestérol. Ils ont une densité plus faible que celle de l'eau et sont très volumineux et diffractent la lumière (sérum lactescent en période post prandiale).

- les VLDL (very low density lipoprotein), synthétisées par le foie et présentes en permanence dans la circulation sanguine, transportent des lipides d'origine endogène. Aussi très riches en triglycérides, elles sont plus petites et un peu plus denses que les chylomicrons. Elles peuvent également provoquer une lactescence du serum si elles sont présentes en excès (Hypertriglycéridémie familiale ou Dyslipidémie type IV).

- les LDL (low density lipoproteins), issues de la transformation vasculaire des VLDL par hydrolyse des triglycérides, sont proportionnellement enrichies en cholestérol. Elles ont une densité et une taille intermédiaire au sein des lipoprotéines.

- les HDL (high density lipoproteins), issues de l'enrichissement en cholestérol de lipoparticules discoïdales, synthétisées initialement par le foie et l'intestin sous forme d'apoA-1 secondairement associée à des phospholipides. Elles contiennent majoritairement du cholestérol, des phospholipides et des apolipoprotéines éventuellement des esters cholestérol (synthétisé par la LCAT) et des triglycérides (échangés avec les VLDL par la CETP). Elles sont plus denses et plus petites que les autres lipoprotéines.

Chaque type de lipoprotéine contient un profil caractéristique d'apolipoprotéines.

#### **4.2. Rappel synthétique du métabolisme des lipoprotéines et rôle physiologique :**

On distingue trois voies essentielles dans le métabolisme des lipoprotéines :

- la 'voie exogène (ou entéro-hépatique)', permettant le transport des lipides d'origine alimentaire de l'intestin vers les différents tissus et le foie. Elle est constituée des chylomicrons et de ses remnants.

- la 'voie endogène', qui transporte les lipides du foie vers les différents tissus. Elle est constituée des VLDL, IDL, LDL.

- la 'voie reverse', qui épure et ramène les lipides (essentiellement le cholestérol) des tissus périphériques vers le foie. Elle est constituée des lipoparticules discoïdales et des HDL.

Le foie joue un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines. Il prend en charge les lipides résiduels d'origine intestinale (remnants de chylomicrons), les métabolise, les incorpore dans de nouvelles lipoprotéines (VLDL) qui sont sécrétées et libérées dans la circulation sanguine à destination des tissus périphériques. Les VLDL circulantes subissent une cascade métabolique au cours de laquelle les triglycérides contenus dans le core de ces lipoprotéines sont en partie hydrolysés par la lipoprotéine lipase, et en partie échangés par la CETP (cholesterol ester transfert protein) contre du cholestérol en provenance des lipoprotéines du transport reverse (HDL). En même temps, certaines apolipoprotéines sont échangées avec les autres classes de lipoprotéines. Ce métabolisme intravasculaire transforme progressivement les VLDL en IDL puis en LDL.

Les LDL contiennent de l'apoB100 responsable de leur reconnaissance et de leur internalisation cellulaire par des récepteurs spécifiques, nommés LDL-R ou Récepteur apoB100/E (pouvant lier à la fois l'apoB100 et l'apoE). Le complexe LDL/LDL-R est internalisé dans des 'puits recouverts de clathrines' qui forment ensuite des vésicules d'endocytose. Dans l'endosome s'effectue un tri, les récepteurs étant recyclés vers la membrane plasmique, tandis que les LDL restent dans les vésicules endosomales qui vont fusionner avec les lysosomes. Dans les lysosomes, ces LDL sont dégradées en constituants simples (cholestérol, acides gras, glycérol, acides aminés..) qui sont ensuite réutilisés ou stockés par la cellule. Le cholestérol libre entre dans la composition des membranes cellulaires, ou est utilisé par certaines cellules spécialisées pour la synthèse d'hormones stéroïdes, de vitamine D ou d'acides biliaires. L'excédent de cholestérol libre non utilisé est estérifié dans le cytoplasme par l'ACAT (acyl-CoA cholestérol acyl transférase) et stocké en vue d'une utilisation ultérieure. Goldstein et Brown (1977, 2009) ont reçu le prix Nobel en 1985 pour la découverte des LDL-R (et du déficit de ces récepteurs dans l'hypercholestérolémie familiale) et des récepteurs scavengers, et de leur rôle dans le métabolisme des LDL et des LDL modifiées qui accumulent le cholestérol dans



les macrophages des les lésions d'athérosclérose (Goldstein and Brown 1977; Brown and Goldstein 1983; Brown and Goldstein 1983; Goldstein, Kita et al. 1983; Goldstein and Brown 2009).

L'excédent de cholestérol libre membranaire est exporté de la cellule grâce à des transporteurs d'efflux (ABC transporter) vers l'enveloppe des lipoparticules discoïdales. La LCAT (lecithine cholesterol acyl transférase) estérifie le cholestérol libre avec un acide gras provenant d'une phosphatidylcholine de la surface de la HDL et forme du cholestérol estérifié qui s'enfouit dans le cœur hydrophobe de la lipoprotéine. L'enrichissement progressif en cholestérol estérifié du cœur des lipoprotéines discoïdales conduit à l'apparition des HDL qui ramènent le cholestérol des tissus périphériques vers le foie. A ce niveau le cholestérol peut être réutilisé ou transformé en acides biliaires et éliminé de l'organisme par la bile (Tall 1998).

### **4.3. Implication physiopathologique des lipoprotéines :**

#### **4.3.1. Dyslipidémie :**

Les hyperlipémies ou hyperlipoprotéïnémies correspondent à une augmentation de cholestérol circulant et/ou de triglycérides. Elles sont fréquentes et peuvent être primitives ou secondaires. Elles sont classées en cinq groupes selon la classification des dyslipidémies selon Fredrickson. Les hyper LDL-cholestérolémies (type IIa et IIb) sont les plus athérogènes.

<p><b>□ Type I : Hypertriglycéridémie exogène</b> Elévation des chylomicrons, très rare, non athérogène</p>
<p><b>□ Type IIa : Hypercholestérolémie pure</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ Familiale homozygote</li><li>▪ Familiale hétérozygote</li><li>▪ Non familiale, polygénique</li></ul>
<p><b>□ Type IIb : Dyslipidémie mixte</b> Elévation des triglycérides &amp; VLDL et du c-LDL, fréquente, athérogène</p>
<p><b>□ Type III : Elévation des IDL (intermediate density lipoprotein)</b> Très rare</p>
<p><b>□ Type IV : Hypertriglycéridémie endogène</b> Elévation des triglycérides &amp; VLDL, fréquent, faiblement athérogène</p>
<p><b>□ Type V : Hypertriglycéridémie endo /exogène</b> Elévation des chylomicrons, triglycérides &amp; VLDL, très rare</p>

**Figure 32. Classification des dyslipidémies selon Fredrickson.**  
Collège des Enseignants de Cardiologie et Maladies Vasculaires. BONGARD V.,  
FERRIERES J. 2010-2011 Université Médicale Virtuelle Francophone

#### **4.3.2. LDL et athérosclérose :**

L'athérosclérose correspond à une suite complexe d'évènements dont un des principaux facteurs déclenchant est l'hyper-LDL-cholestérolémie. La classe des LDL est un ensemble de particules hétérogènes, subdivisées en plusieurs sous-fractions (ou sous-classes), caractérisées par leurs propriétés physicochimiques et métaboliques. Les LDL petites et denses ont un catabolisme ralenti

par leur moindre affinité pour les LDL-R, sont plus sensibles à l'oxydation à cause de leur séjour prolongé dans la circulation sanguine, et sont associées à un risque accru de maladies cardiovasculaires (Chapman, Guerin et al. 1998). Les LDL peuvent subir divers types de modifications par aggrégation, glycation, alkylation, nitration et oxydation, ce qui augmente leurs propriétés athérogènes (Steinberg 1997; Schioppa, Frendeus et al. 2007).

L'oxydation des LDL pourrait jouer un rôle majeur dans l'athérogenèse (Witztum and Steinberg 1991; Parthasarathy, Steinberg et al. 1992; Lusis 2000). Les LDL peuvent traverser l'endothélium et pénétrer jusqu'à l'espace sous-endothélial (intima). Dans les zones où l'endothélium est activé par des contraintes mécaniques ou inflammatoires locales, les cellules endothéliales produisent des radicaux oxygénés (ROS) qui peuvent oxyder progressivement les LDL.

L'activation de l'endothélium induit une augmentation de perméabilité et le recrutement de cellules inflammatoires qui migrent dans l'intima. Cette première étape de l'athérogenèse peut regresser (si le stress inflammatoire et métabolique régressent) ou progresser vers les lésions d'athérosclérose plus complexes et moins réversibles (Ross 1999; Lusis 2000).

Les LDLox sont présentes au sein de la plaque et ont des propriétés athérogènes à l'origine de plusieurs phénomènes :

- déviation métabolique: elles sont moins captées par la voie des récepteurs apoB/E présents dans les cellules de la paroi vasculaire, mais elles sont plus captées par les cellules macrophagiques (via les récepteurs scavengers) et par les cellules activées de la paroi vasculaire. Captées par les récepteurs scavengers macrophagiques dont la synthèse n'est pas régulée, elles s'accumulent dans les cellules macrophagiques qui se surchargent en lipides (esters de cholestérol) et se transforment en cellules spumeuses (Brown and Goldstein 1983; Witztum and Steinberg 1991; Parthasarathy, Steinberg et al. 1992)
- surexpression par l'endothélium de protéines d'adhésion (sélectines, VCAM-1) qui facilitent le passage des leucocytes dans l'intima (Ross 1999)
- surexpression de récepteurs scavenger qui favorisent la captation des LDL oxydées et la formation des cellules spumeuses (Yoshida, Quehenberger et al. 1998)
- surexpression de facteurs de croissance et cytokines qui favorisent l'accumulation des macrophages dans les lésions, la prolifération des cellules musculaires lisses, et la réponse inflammatoire (Ross 1999; Libby 2002)
- surproduction de matrice extracellulaire qui est impliquée dans la fibrose, la sténose, la rétention des lipoprotéines dans la plaque et dans la stabilité de la plaque (Kaplan and Aviram 2001)
- surexpression d'enzymes oxydantes et la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui oxydent divers constituants de la paroi vasculaire ainsi que les LDL (Galle, Hansen-Hagge et al. 2006)
- surexpression de métalloprotéases qui activent la migration cellulaire, le remodelage vasculaire, mais aussi fragilise la plaque (Rajavashisth, Liao et al. 1999)
- altération de l'équilibre des protéines de l'hémostase dans un sens globalement prothrombotique avec une augmentation de production de facteur tissulaire et de thromboxane par les plaquettes (Berliner and Heinecke 1996)
- stimulation de l'angiogenèse intraplaque, et fragilisation des vaisseaux néoformés à l'origine d'hémorragies intraplaques et de rupture de plaque (Dandapat, Hu et al. 2007)

De plus, les LDL oxydées exercent un effet biphasique sur les cellules musculaires lisses vasculaires en culture. Elles sont mitogènes à faible concentration et cytotoxiques à plus forte concentration. L'effet mitogène est médié par l'activation concomitante de voies de signalisation mitogènes,

comme la voie des sphingolipides (sphingomyéline/céramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphate), qui activent la voie des MAP Kinases (Auge, Maupas-Schwalm et al. 2004), et de voies de survie impliquant le récepteur à l'EGF et la PI3kinase (Auge, Garcia et al. 2002). L'augmentation du calcium cytosolique induite par les LDL oxydées, est un évènement majeur de la signalisation cytotoxique des LDL oxydées, à l'origine de la mort par apoptose ou nécrose (Vindis, Elbaz et al. 2005). Cet effet biphasique est également retrouvé sur l'effet angiogénique des LDLox (Dandapat, Hu et al. 2007).

#### **4.3.3. Oxydation des LDL :**

L'oxydation des LDL est un processus progressif, qui survient surtout dans l'intima, et qui conduit à la génération de LDL oxydées à divers degrés (faiblement à fortement oxydées). Elle se produit en réponse au stress oxydant généré par les cellules de la paroi artérielle (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses) et les cellules inflammatoires (macrophages et lymphocytes T) et de métaux de transition (cuivre, fer) présents sur le site de la lésion.

#### **4.3.3.1. Stress oxydant :**

Un stress oxydant est provoqué par un déséquilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO ou ROS pour reactive oxygen species) et leur dégradation par les systèmes antioxydants. Les ROS regroupent les radicaux libres oxygénés (espèces chimiques possédant un électron célibataire non apparié: anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$  et radical hydroxyle  $OH^{\cdot}$ ), et les dérivés non radicalaires (ne possédant pas d'électron célibataire) comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

La production de ROS est assurée par différents systèmes présents au niveau des cellules de la paroi vasculaire tels que la NAD(P)H oxydase, les lipooxygénases (LOX), les cyclooxygénases (COX), la NO synthase endothéliale (eNOS), les cytochrome P450, la xanthine oxydase et la chaîne respiratoire mitochondriale (Beaudeau, Peynet et al. 2006; Tsimikas and Miller 2011).

Ces enzymes d'oxydation ont des fonctions biochimiques très spécifiques: oxydation de substrats pour générer des molécules indispensables (stéroïdes, eicosanoïdes..), réactions d'oxydo-réduction de la respiration et production énergétique cellulaire, défenses de l'immunité innée, détoxification. Par ailleurs les ROS ont des fonctions de signalisation et de régulation de diverses fonctions cellulaires, comme la prolifération, la migration, l'angiogenèse, l'apoptose et la sénescence des cellules endothéliales (Frey, Ushio-Fukai et al. 2009). La production de ROS peut être exacerbée par différents stimuli inflammatoires, et notamment les facteurs de risque d'athérosclérose (tabagisme, hypertension, diabète, hyperlipidémie) qui induisent une surexpression des systèmes enzymatiques générant les ROS. La surproduction de ROS peut induire la dysfonction endothéliale, l'hypertension artérielle, certaines complications diabétiques et *in fine* d'athérosclérose. La principale source de ROS dans les cellules endothéliales pourrait être la NAD(P)H oxydase (Frey, Ushio-Fukai et al. 2009).

Des systèmes antioxydants également présents dans les cellules vont neutraliser les ROS en les transformant en produits stables. Il s'agit de la superoxyde dismutase, de la glutathion peroxydase, de la catalase et de la thioredoxine réductase (Beaudeau, Peynet et al. 2006; Ushio-Fukai and Nakamura 2008). Une seconde ligne de défense contre le stress oxydant est représentée par les piègeurs de ROS d'origine alimentaire, tels que la vitamine E (tocophérol), la vitamine C (acide ascorbique) et les caroténoïdes (vitamine A et bêta-carotène), divers polyphénols...

#### **4.3.3.2. Mécanismes de peroxydation lipidique :**

La peroxydation chimique des lipides des LDL résulte de l'attaque de substrats oxydables, (en premier lieu, les Acides Gras Poly-Insaturés (AGPI) qui sont plus oxydables que les acides gras saturés) par des radicaux oxydants ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^{\cdot}$ ). Après une étape d'initiation de la peroxydation d'AGPI qui génère des hydroperoxydes d'acides gras radicalaires, instables et d'autres dérivés oxygénés (endoperoxydes, époxydes, radicaux alkoxyles) qui vont favoriser la propagation de la peroxydation lipidique et finalement aboutir à la formation de dérivés stables (alkanes, alcools, cétones, aldéhydes, acides carboxyliques). Les aldéhydes peuvent se conjuguer à l'apoB et aux phospholipides. Les LDL ne sont alors plus reconnues par le récepteur apoB100/E mais par les récepteurs scavengers (Witztum and Steinberg 1991). Au niveau de la plaque d'athérome, le stress oxydant et le degré d'oxydation des LDL va *crescendo* de la périphérie vers le centre de la plaque à l'origine d'une signalisation et de réponses cellulaires différentes (prolifération, migration et angiogénèse à la périphérie et apoptose dans le cœur de la plaque). Ces différents degrés d'oxydation des LDL sont reproduits *in vitro* par divers systèmes oxydants utilisant du cuivre ( $CuSO_4$ ), des UV, des cellules en culture ...

#### **4.3.3.3. Produits de peroxydation lipidique présents dans les LDLox :**

Les acides gras oxydés. Les AGPI sont présents au niveau des phospholipides de l'enveloppe et au niveau des triglycérides et des esters de cholestérol dans le core des LDL. Ils peuvent tous être oxydés et les produits d'oxydation formés (majoritairement des hydroperoxydes) peuvent induire des réactions d'oxydation en chaîne des AGPI voisins. Ces produits d'oxydation d'acides gras au niveau des plaques, peuvent être le résultat d'oxydations non enzymatiques ou enzymatiques par des lipooxygénases (Folcik, Nivar-Aristy et al. 1995; Heydeck, Upston et al. 2001). Ces enzymes participent au développement des plaques et l'importance des produits d'oxydation d'acides gras formés sont corrélés à l'instabilité des plaques (Waddington, Croft et al. 2003).

Les aldéhydes. Ils résultent de la dégradation des hydroperoxydes et sont moins stables que ces derniers. Ce sont par exemple le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxy-2(E)-nonenal (4-HNE). Ils peuvent diffuser depuis leur site de production et sont des composés très réactifs et toxiques (Uchida 2000). Le 4-HNE qui provient de la peroxydation des acides gras  $\omega_6$ , induit une activation de COX-2 *via* p38MPAK (Uchida and Kumagai 2003). Ils peuvent interagir avec l'apoB des LDL et modifier des résidus lysine (Uchida 2003) induisant une diminution de reconnaissance de ces lipoprotéines par les LDL-R.

Les oxystérols. L'oxydation du cholestérol des LDL conduit à la formation d'oxystérols, qu'on retrouve également au niveau des plaques d'athérome (Brown, Leong et al. 1997). Ils induisent, dans des HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), l'expression de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1 et sélectines) impliquées dans l'adhésion des monocytes à l'endothélium (Lemaire, Lizard et al. 1998). Les oxystérols favorisent également la formation des cellules spumeuses en augmentent l'expression du récepteur scavenger CD36 au niveau des monocytes (Leonarduzzi, Gamba et al. 2008). Certains ont des effets toxiques (apoptotiques) et pourraient jouer un rôle dans la genèse du centre nécrotico-lipidique des plaques (Brown and Jessup 1999).

Les phospholipides oxydés. L'oxydation des phospholipides de l'enveloppe des LDL se fait sur les chaînes des AGPI. Les phospholipides oxydés sont surtout présents dans les LDL minimalement oxydés et ont des propriétés pro-inflammatoires (Watson, Leitinger et al. 1997) et angiogéniques (Bochkov, Philippova et al. 2006). Ils favorisent ainsi le développement de la plaque d'athérome notamment par les dérivés d'oxydation d'acides arachidoniques qui peuvent être des initiateurs importants de l'athérogenèse.

#### **4.3.4. Cibles moléculaires et effets biologiques des LDL oxydés. Implication dans l'angiogenèse :**

Les composés lipidiques bioactifs contenus dans les LDL oxydés peuvent interagir avec des molécules cellulaires à travers divers mécanismes. Lors de l'interaction des LDL oxydés avec les cellules, des lipides oxydés diffusent probablement à travers la membrane plasmique et réagissent avec des composants membranaires protéiques ou lipidiques.

Les LDL oxydés induisent la formation d'adduits 4-HNE ou acroléine sur les récepteurs à l'EGF (EGFR) et au PDGF (PDGFR) à l'origine de leur activation (Escargueil-Blanc, Salvayre et al. 2001; Robbesyn, Auge et al. 2005). Cependant, à long terme, la modification de ces récepteurs perturbe l'affinité pour leur ligand et inhibe leur activité tyrosine kinase (Negre-Salvayre, Vieira et al. 2003; Vindis, Escargueil-Blanc et al. 2006). La formation d'adduits peut également se faire sur d'autres protéines cellulaires comme des enzymes, ou des protéines de signalisation cellulaire et entraîner des dysfonctionnements de voies métaboliques ou de signalisation cellulaire (Negre-Salvayre, Coatrieux et al. 2008)

Les LDLox peuvent également modifier par oxydation, les phospholipides membranaires des cellules vasculaires. Il a été montré que des phosphatidylcholines oxydés ont des propriétés angiogéniques *in vivo*, dans des plugs de Matrigel chez la souris, et peuvent activer *in vitro* la transcription des gènes du VEGF, de la COX-2 et de l'interleukine-8 dans de nombreux types cellulaires (Bochkov, Philippova et al. 2006). Ces résultats suggèrent que les phospholipides oxydés au niveau de la paroi vasculaire des artères athéroscléreuse pourraient favoriser la néoangiogenèse intimale pouvant entraîner une déstabilisation des plaques.

A côté de ces effets directs des LDLox sur les cellules, d'autres effets sont liés à leur interaction avec des récepteurs scavengers présents au niveau des cellules de la paroi vasculaire, à l'origine d'une signalisation cellulaire variée impliquant la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes notamment ceux régulant l'adhésion cellulaire, la migration et l'angiogenèse. Au niveau des cellules endothéliales de coronaires humaines (HCAECs), de faibles concentrations de LDLox (5 µg/ml) sont capable d'induire, *via* le scavenger LOX-1, une activation transcriptionnelle de nombreux gènes impliqués dans l'angiogenèse, en particulier VEGFR-2, PDGFR, NOTCH et NRP-1, et une inhibition transcriptionnelle de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose (Khaidakov, Mitra et al. 2012).

Les effets cellulaires de LDLox sont variables et dépendent de la dose et du degré d'oxydation des LDL. De fortes concentrations (100 µg/ml) de LDLox (oxydés par CuSO<sub>4</sub>), bloquent la prolifération de cellules endothéliales bovines (BAECs pour bovine aortic endothelial cells) *in vitro* et l'angiogenèse. Cet effet anti-angiogénique passe par une diminution du mRNA du bFGF sans modification de l'expression du FGFR-1. Au delà de cette concentration on observe une diminution de la viabilité cellulaire (Chen, Jiang et al. 2000). La migration de BAECs *in vitro* après lésions d'un



tapis cellulaire confluent, est d'autant plus inhibée que le degré d'oxydation des LDL est important (dosée par TBARs donnant un équivalent de la quantité de malonedialdéhyde présente par mg d'apoB) (Murugesan, Chisolm et al. 1993).

De faibles concentrations (5 à 10 µg/ml) sont au contraire angiogéniques, cet effet angiogénique semblant passer par plusieurs voies. Des doses de l'ordre de 10 µg/ml de LDL oxydées (par 10 µM de CuSO<sub>4</sub>), induisent une angiogenèse *in vitro* (prolifération, migration et tubulogenèse) sur des HCAECs (cellules endothéliales coronaires humaines) via l'activation de PI3K/Akt/eNOS (Yu, Wong et al. 2011). Des doses de l'ordre de 5 µg/ml de LDLox sur ce même type cellulaire, induisent une angiogenèse impliquant LOX-1 et la NAD(P)H oxydase à l'origine d'une génération intracellulaire de ROS et l'activation consécutive de p38MPAK/p44/42MPAK induisant la transcription du VEGF (Dandapat, Hu et al. 2007). De plus, l'expression des récepteurs LOX-1 au niveau de HCAECs, est stimulée par l'angiotensine-II *via* son récepteur-1 qui active la NAD(P)H oxydase et la génération de ROS, qui pourrait rendre les cellules plus sensible à l'effet angiogénique des LDLox (Hu, Dandapat et al. 2007).

Le lien entre la NAD(P)H oxydase, la génération de ROS et l'angiogenèse est maintenant établi (Ushio-Fukai 2007). Les ROS pourraient potentialiser l'autophosphorylation de VEGFR-2 et l'angiogenèse (Ushio-Fukai, Tang et al. 2002). De faibles doses de LDLox administrées à des CML vasculaires induisent une activation de la voie de signalisation des sphingolipides SMase/CDase/SK conduisant à la génération de S1P et à une prolifération cellulaire (Auge, Nikolova-Karakashian et al. 1999). De plus, des doses physiologiques d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induisent une augmentation de l'expression des récepteurs de la sphingosine-1-phosphate (les récepteurs S1P1) au niveau des cellules endothéliales (BAECs), à l'origine d'une activation de eNOS et des MAPK/ERK1/2, induisant une prolifération cellulaire (Igarashi, Miyoshi et al. 2007).

Il semble donc exister des mécanismes de transactivation entre les LDLox, le stress oxydant et la voie des sphingolipides, ce qui nous a amené à nous intéresser à cette voie de signalisation dans le contexte de l'angiogenèse induite par les LDL oxydées.



## 5. LES SPHINGOLIPIDES

### 5.1. Introduction sur le métabolisme des sphingolipides :

Les sphingolipides sont une grande famille de lipides cellulaires complexes ayant un rôle structural et métabolique, qui sont tous deux intimement liés. Ces lipides sont définis par la présence d'une base sphingoïde dans leur structure et sont formés à partir du céramide qui occupe une position centrale dans la biosynthèse et le catabolisme des ces molécules.

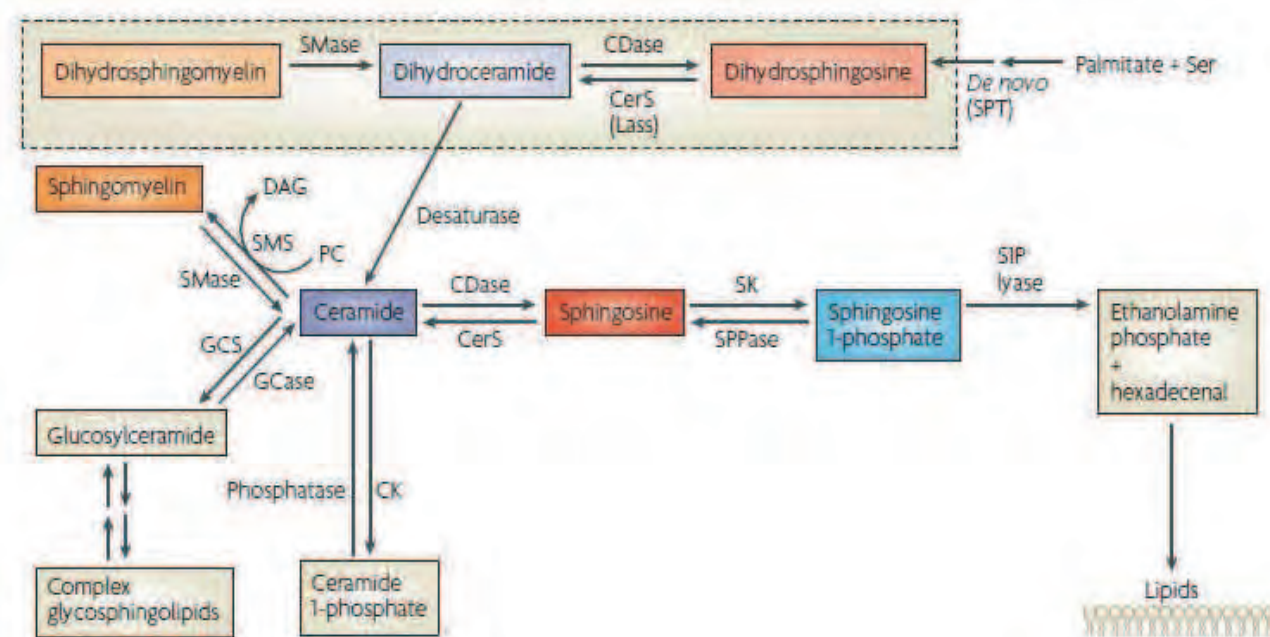


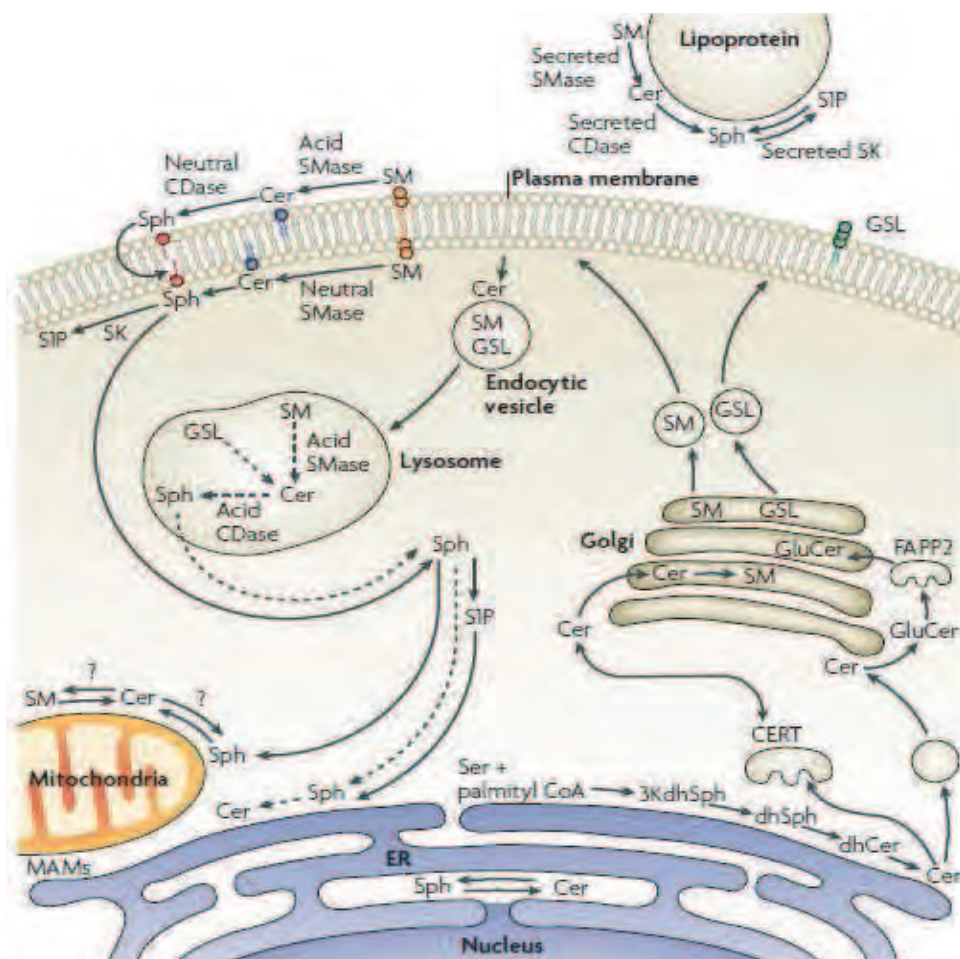
Fig 33. Métabolisme des sphingolipides et interconnexion des lipides bioactifs. (Hannun and Obeid 2008)

La première étape de la biosynthèse *de novo* des sphingolipides est représentée par la sérine palmitoyl transférase (SPT) qui génère la 3-cétosphinganine à partir de la condensation d'un palmitoyl-coenzyme A et d'un acide aminé alcool, la sérine. La 3-cétosphinganine est ensuite réduite en sphinganine par la 3-cétosphinganine réductase, puis une chaîne d'acide gras sous forme d'acyl-coenzyme A est ensuite liée par une liaison amide sur la fonction amine du C<sub>2</sub> de la sphinganine pour former le dihydrocéramide (ou plutôt, les dihydrocéramides, selon la longueur de chaîne de l'acide gras). Ces dihydrocéramides sont ensuite transformés en céramides par une dihydrocéramide réductase. Toutes ces étapes de biosynthèse, aboutissant à la formation du céramide, se déroulent à la face cytoplasmique du réticulum endoplasmique où se situent toutes ces enzymes (Spiegel and Milstien 2003).

A partir du céramide, différents sphingolipides vont pouvoir être synthétisés.

En ce qui concerne les glycosphingolipides, le galactosyl céramide est synthétisé par une galactosyl céramide synthase au niveau de la membrane interne du réticulum endoplasmique (feuillet luminal). Les autres glycosphingolipides sont formés dans l'appareil de Golgi. Pour cela, le céramide néosynthétisé au niveau du RE est transféré, par un transport vésiculaire, au niveau de la membrane externe du Golgi où il peut être glycosylé par une glucosyl céramide synthase. Ce glucosyl céramide ainsi formé bascule ensuite dans le feuillet interne de la membrane du Golgi (probablement grâce à un ABC transporteur) pour permettre la synthèse de l'oligosaccharide des gangliosides et des autres

glycosphingolipides. Ce dernier processus étant particulièrement développé dans les cellules de la substance grise du système nerveux central (Hannun and Obeid 2008). Le céramide néoformé dans le réticulum peut aussi être transféré vers l'appareil de Golgi grâce à une céramide transfert protéine (CERT), (Hanada, Kumagai et al. 2003) et sera dans ce cas préférentiellement le substrat d'une sphingomyéline synthase qui transfère la phosphoryl-choline d'une phosphatidylcholine sur le céramide pour générer de la sphingomyéline et du diacylglycérol. Le céramide peut également être le substrat d'une céramide kinase qui génère du céramide-1-phosphate. Cette sphingomyéline et ces glycosphingolipides sont ensuite amenés par des vésicules de transport en provenance de l'appareil de Golgi (TGN pour Trans Golgi Network) vers la membrane plasmique avec laquelle elles peuvent fusionner (Hannun and Obeid 2008; Bartke and Hannun 2009)



**Fig 34 : Compartimentation du métabolisme des sphingolipides.** (Hannun and Obeid 2008)

La sphingomyéline membranaire peut être hydrolysée en céramide par une sphingomyélinase, le céramide peut ensuite être dégradé en sphingosine par une céramidase, et la sphingosine phosphorylée en sphingosine-1-phosphate par une sphingosine kinase. Cette cascade réactionnelle peut se dérouler sur plusieurs sites, où interviennent des enzymes spécifiques : i/ au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique où interviennent la sphingomyélinase neutre, une céramidase et la sphingosine kinase-1 ; ii/ dans les lysosomes où interviennent la sphingomyélinase acide et la céramidase acide qui génèrent de la sphingosine qui est ensuite exportée dans le cytoplasme où elle peut être réutilisée ; iii/ à l'extérieur de la cellule (ou sur le feuillet externe de la

membrane plasmique) où interviennent la sphingomyélinase acide, une céramidase et, peut-être la sphingosine kinase-1 (sécrétées par la cellule) ; iv/ enfin, dans le noyau, où certaines étapes de ce métabolisme semblent aussi pouvoir se produire (Ogretmen and Hannun 2004; Hannun and Obeid 2008).

Les glycosphingolipides (cérébrosides et gangliosides) membranaires peuvent être internalisés et dégradés dans les lysosomes par l'action séquentielle de plusieurs enzymes, chacune étant spécifique d'un intermédiaire métabolique précis. Le déficit fonctionnel (dû à une mutation) d'une (ou plusieurs) de ces hydrolases lysosomales, interrompt la voie catabolique, ce qui induit une accumulation du substrat non dégradé dans le lysosome. Ces mutations sont à l'origine des maladies de surcharge lysosomale en sphingolipides, appelées sphingolipidoses (Kolter and Sandhoff 2005; Sandhoff and Harzer 2013).

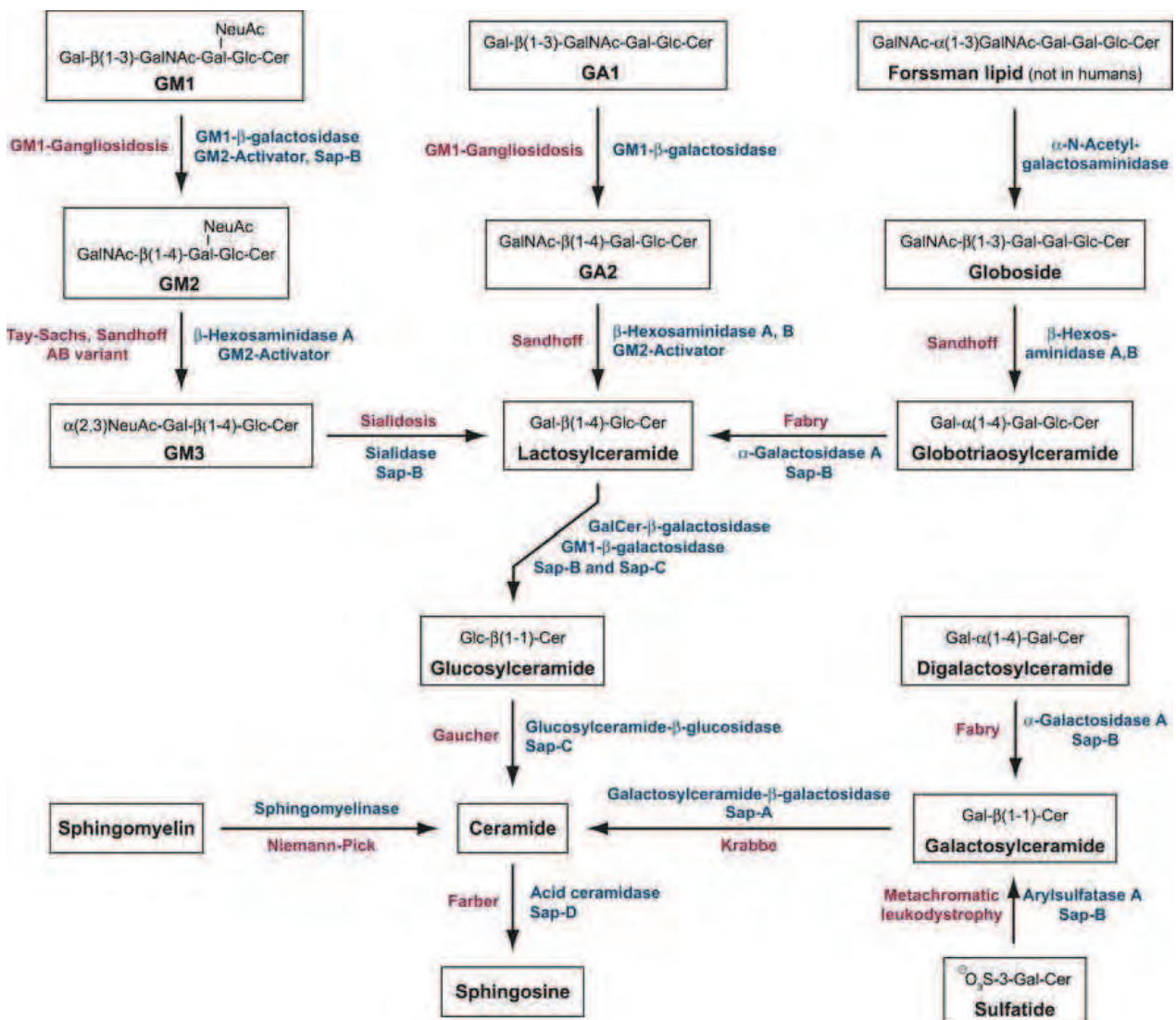


Fig 35. Cascade de dégradation lysosomale des sphingolipides et noms des différentes sphingolipidoses congénitales. (D'après Kolter and Sandhoff 2005)



La dégradation lysosomale de ces sphingolipides abouti à la génération de sphingosine, capable de passer au niveau de la face cytosolique des membranes lysosomales où elle est phosphorylée par une sphingosine kinase aboutissant à la génération de S1P, qui compte tenu de son caractère polaire peut diffuser dans le cytosol jusqu'au réticulum endoplasmique où elle est reconvertie en sphingosine par une S1P phosphatase 1 ou 2 (SPP1 ou SPP2). Cette reformation de sphingosine à partir de la S1P cytosolique, permet d'incrémenter le taux de céramide au niveau du réticulum grâce à une céramide synthase, c'est la voie de sauvegarde ('salvage pathway') des sphingolipides (Spiegel and Milstien 2003).

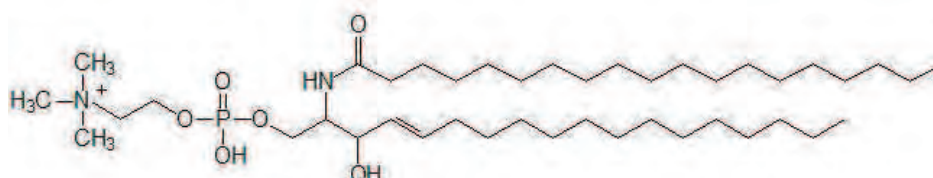
Le céramide qui est considéré comme étant la plaque tournante du métabolisme des sphingolipides, il est soit le substrat, soit le produit d'une des multiples enzymes qui régulent le taux de céramide intracellulaire. Il existe environ une cinquantaine de céramides différents chez l'Homme, en fonction de la longueur de la chaîne d'acide gras, de l'absence (dihydrocéramide) ou de la présence (céramide) d'une double liaison sur la base sphingoiïde, ainsi que la présence d'un ou plusieurs groupements hydroxyles et de leur position sur cette base. Chacun de ces céramides pouvant contenir différents types d'acides gras (Hannun and Obeid 2011).

Enfin, l'étape de dégradation terminale de la sphingosine-1-phosphate est catalysée par la sphingosine-1-phosphate lyase qui dégrade la sphingosine-1-phosphate en deux molécules non sphingolipidiques, l'éthanolamine-1-phosphate et un aldéhyde gras, l'hexadécanal, au niveau de la face cytosolique du réticulum endoplasmique (Ikeda, Kihara et al. 2004).

Le métabolisme des sphingolipides est donc très complexe. Il implique des enzymes dont l'activité dépend de leur localisation subcellulaire et de leur mécanisme d'activation. Il comprend de nombreuses interconnexions qui régulent le niveau des lipides bioactifs et leurs interconversions pour induire des réponses cellulaires variées (Hannun and Obeid 2008). Les données bibliographiques actuelles sur le céramide, la sphingosine et la sphingosine-1-phosphate sont considérables. La connaissance des mécanismes de régulation du métabolisme des sphingolipides et l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la transduction du signal de ces lipides bioactifs progresse et permet de mieux comprendre leurs effets pléiotropiques dans la biologie de la cellule et aussi leurs rôles multiples en physiologie et dans des diverses pathologies (cancer, l'inflammation, le diabète et les maladies cardiovasculaires) dans lesquelles ils semblent intervenir.

## **5.2. Structure, transport et fonction des sphingolipides :**

### **5.2.1. La sphingomyéline :**

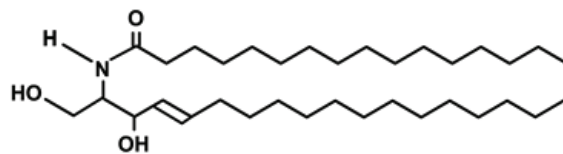


**Fig 36 : Structure de la sphingomyéline**

Sur le plan structural, la sphingomyéline (céramide-phosphocholine) est un terme générique, qui inclut des molécules qui peuvent varier dans la structure de la base sphingoiïde et de l'acide gras.

La sphingomyéline (SM) est un le sphingolipide le plus abondant des membranes cellulaires chez les mammifères, (Gault, Obeid et al. 2010) (Elle représente quantitativement 2 à 15 % des phospholipides totaux (Hanada 2010). Elle est synthétisée dans le feuillet interne de l'appareil de Golgi à partir du céramide, par une sphingomyéline synthase et amenée à la membrane plasmique par transport vésiculaire. C'est une molécule amphiphile et polaire, qui est ionisée au pH de l'organisme, ce qui limite son flip-flop spontané d'un feuillet à l'autre de la bicouche phospholipidique. Elle se situe majoritairement au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique, (Calderon and DeVries 1997) où elle peut être dégradée en céramide par une sphingomyélinase acide. On la retrouve aussi en petite quantité au niveau du feuillet interne où elle peut être hydrolysée en céramide par une sphingomyélinase neutre (Bartke and Hannun 2009). La sphingomyéline est un constituant important des radeaux lipidiques et des cavéoles qui sont des structures membranaires riches en cholestérol et en sphingolipides, et représentent des plateformes majeures de signalisation (Brown and London 2000; Milhas, Clarke et al. 2010). Elle est particulièrement abondante dans la myéline, manchon cellulaire s'enroulant autour des axones des neurones du système nerveux périphérique et constitué de près de 300 couches. Elle subit une dégradation lysosomale par une sphingomyélinase acide, après endocytose par voie endosomale. Le déficit en sphingomyélinase acide est à l'origine d'une sphingolipidose appelée maladie de Niemann-Pick (Kolter and Sandhoff 2005).

### 5.2.2. Le céramide :



**Fig 37 : Structure du céramide**

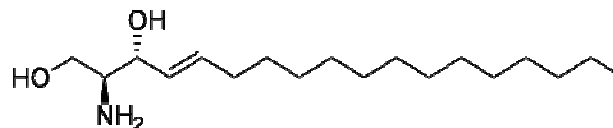
Les sources cellulaires du céramide sont multiples et il existe plusieurs types de molécules de céramide selon le mécanisme de production et selon le compartiment cellulaire dans lequel il est généré (Hannun and Obeid 2008). Par exemple, la synthèse *de novo* de dihydrocéramide est réalisée par des six céramide-synthases qui ont des spécificités de substrat partiellement différentes (acides gras de longueur différente). Les céramide-synthases 5 et 6 (CerS5 et CerS6) incorporent préférentiellement des acides gras C14-C16, la céramide-synthase 1 est spécifique de C18, la céramide-synthase 4 est spécifique de C18-C20, les céramide-synthases 2 et 3 sont spécifiques de C22 à C25 (Levy and Futerman 2010).

Le céramide est une molécule hautement hydrophobe qui contient une toute petite partie polaire non ionisée au pH de l'organisme. En l'absence de transporteur protéique ou de transfert vésiculaire, il tend donc à rester dans les membranes où il a pris naissance (Hanada 2010). En plus de sa génération *de novo* dans le RE, il peut être généré dans la membrane plasmique par une sphingomyélinase acide (feuillet externe) ou neutre (feuillet interne), dans le lysosome sous l'effet d'une sphingomyélinase acide ou d'une glucosylcéramide- $\beta$ -glucosidase et dans la membrane mitochondriale externe sous l'effet d'une sphingomyélinase neutre (Gault, Obeid et al. 2010; Hannun and Obeid 2011). Il existe également une voie de sauvegarde des sphingolipides à partir du système endolysosomal où le céramide est généré à partir de l'hydrolyse d'une sphingomyéline puis

transformé en sphingosine par une céramidase. La sphingosine libérée, relativement soluble dans le cytosol puisqu'elle ne contient plus qu'une seule chaîne lipidique, est recyclée en céramide au niveau du RE par une céramide synthase. Enfin le taux de céramide généré est contrebalancé par des enzymes qui le métabolisent pour générer des sphingolipides complexes. Il est actuellement estimé que plus de 28 enzymes agissent sur le céramide soit en tant que substrat, soit en tant que produit (Hannun and Obeid 2011).

Le Cer et ses dérivés jouent un rôle majeur en tant que seconds messagers, en particulier dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Il a été montré que le céramide interagit avec de nombreuses protéines cellulaires, notamment des sérine-thréonine-phosphatases (PP1 et PP2A) (Chalfant, Kishikawa et al. 1999) induisant entre autre la déphosphorylation d'Akt à l'origine de l'inhibition du signal anti-apoptotique (Zhou, Summers et al. 1998). L'activation de la sphingomyélinase acide lysosomale par le TNF $\alpha$  conduit à l'activation par le céramide, de protéases lysosomales comme la cathepsine D couplée à la voie pro-apoptotique mitochondriale (Heinrich, Neumeyer et al. 2004). Le céramide peut lier et activer directement des kinases de la famille de PKC, notamment PKC $\zeta$  impliquée dans la régulation des potentiels de membrane, l'inhibition d'Akt et l'arrêt du cycle cellulaire (Bourbon, Sandirasegarane et al. 2002; Wang, Silva et al. 2005). Cependant, les réponses cellulaires induites par le Cer dépendent de sa localisation subcellulaire. En effet, les enzymes régulant le métabolisme du céramide sont localisées, dans différents compartiments subcellulaires et cette compartimentalisation joue un rôle dans la bio régulation de ses effet (Arana, Gangoiti et al. 2010).

### **5.2.3. La sphingosine :**

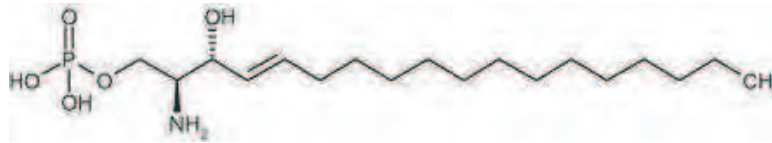


**Fig 38 : Structure de la sphingosine.**

La sphingosine est issue de la dégradation du céramide par une céramidase, ou bien de la déphosphorylation de la sphingosine-1-phosphate par une phosphatase. C'est une molécule relativement soluble en milieu aqueux du fait de la présence d'une seule chaîne lipidique, ce qui lui permet de passer d'un feuillet membranaire à l'autre par flip-flop et également de diffuser dans le cytosol et de passer d'un compartiment cellulaire à l'autre. Elle est un peu plus retenue dans les organelles à pH acide, consécutivement à l'ionisation de sa fonction amine à un tel pH (Hannun and Obeid 2008). Les enzymes responsables de son métabolisme présentent une activité catalytique principalement située à la face cytosolique des membranes cellulaires suggérant que la sphingosine cytosolique est celle qui est préférentiellement modifiable et que sa disponibilité va dépendre de la localisation des sphingosines kinases (Siow and Wattenberg 2011; Siow, Anderson et al. 2011). La Sph module des protéines kinases et des protéases (caspases) et participe à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose. Elle régule le cytosquelette d'actine et les processus d'endocytose. Elle inhibe des protéines de la famille des PKC (Smith, Merrill et al. 2000).

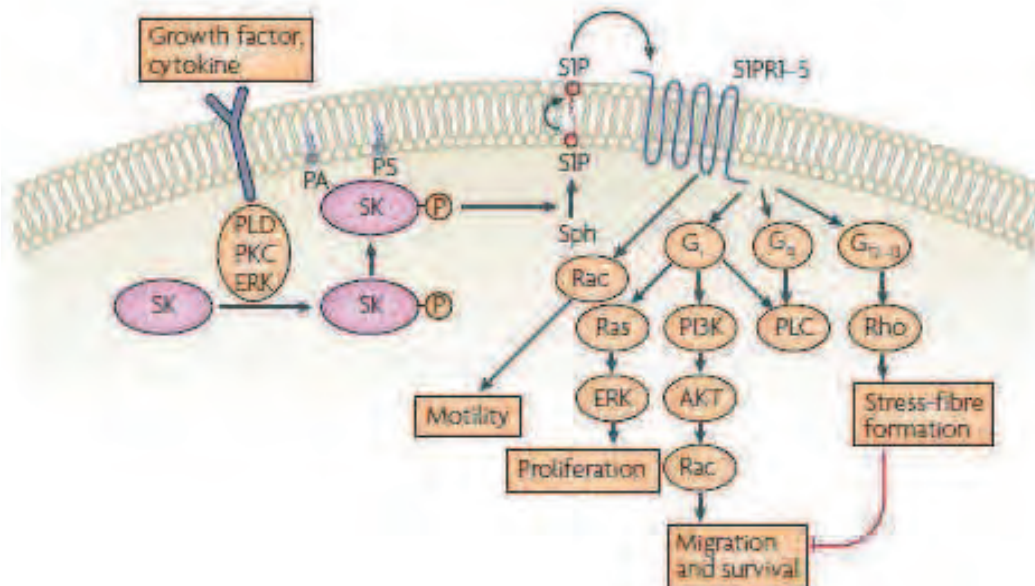


**5.2.4. La sphingosine-1-phosphate :**



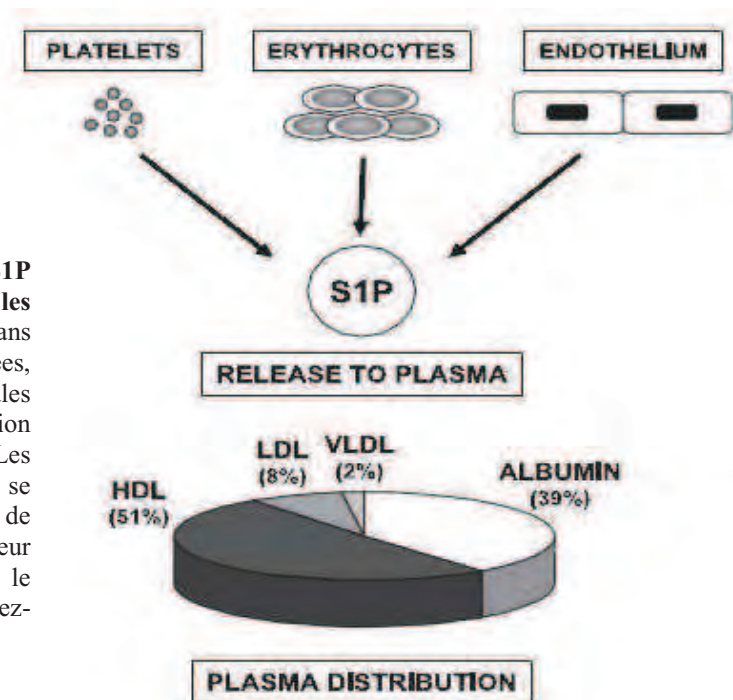
**Fig 39. Structure de la sphingosine-1-phosphate.**

La sphingosine-1-phosphate (S1P) est issue de la phosphorylation de la sphingosine par une sphingosine kinase, SK1 ou SK2 selon le compartiment cellulaire (voir plus loin chapitre « sphingosine kinase »). La S1P peut être générée au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique sous l’effet de SK1 (Chan and Pitson 2013). Bien qu’elle soit (comme la sphingosine) amphiphile avec une seule chaîne aliphatique, il est peu probable qu’elle passe spontanément d’un feuillet membranaire à l’autre par flip-flop en raison de la présence dans sa structure d’une tête polaire zwitterionique dont le phosphate est chargé au pH physiologique. Pour passer au niveau extracellulaire où se situent ses récepteurs, elle utilise un transporteur d’efflux, soit de la famille ABC (Mitra, Oskeritzian et al. 2006), soit le transporteur Spns2 (S1P transporter spinster homolog 2) (Fukuhara, Simmons et al. 2012). Les récepteurs de la S1P font partie de la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Il en existe cinq types, S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4, S1PR5, différemment répartis en fonction des types cellulaires et couplés à différentes protéines G, induisant des réponses cellulaires diverses par l’activation de différentes voies de signalisation, notamment la prolifération, la migration et la survie cellulaire ainsi que l’angiogénèse (Leclercq and Pitson 2006)



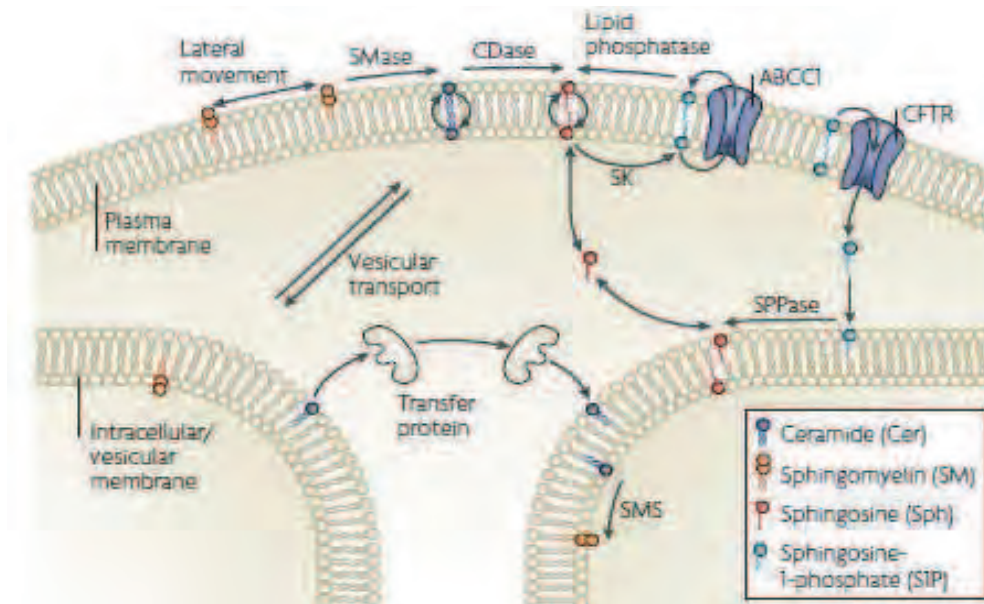
**Fig 40. Mécanismes de synthèse, transport et action extracellulaire de la S1P.** L’activité sphingosine kinase est activée par de nombreux stimuli. La S1P produite peut être externalisée et agir en se fixant sur ces récepteurs. Ce sont des récepteurs couplés à des protéines G qui vont activer de nombreuses voies de signalisation, telles que les MAPK ou PI3K/Akt, aboutissant à divers effets biologiques comme la prolifération et la migration cellulaires. (D’après Hannun and Obeid 2008)

Il y a un gradient de concentration de S1P entre le secteur vasculaire et le secteur cellulo-interstitiel. En effet, la concentration plasmatique de la S1P se situe entre 0.1 et 0.9  $\mu\text{M}$  alors qu'elle n'est que de quelques nM voire pM au niveau des cellules. Cela laisse supposer l'existence d'une signalisation liée à S1P par l'intermédiaire de ses récepteurs membranaires en dehors d'une activation de la voie des sphingolipides. Au niveau vasculaire, la S1P est principalement présente sur les HDL, l'albumine, les plaquettes et les hématies (Takabe, Paugh et al. 2008). Les plaquettes activées par une hypercholestérolémie dans le cadre de l'athérosclérose, génèrent davantage de S1P que des plaquettes non activées ou activées mais chez un sujet non hypercholestérolémique. Cette S1P générée pourrait potentialiser l'effet prolifératif des LDLox sur les CML et contribuer au développement de l'athérosclérose (Son, Lee et al. 2008). La S1P s'accumule également sur les HDL et leur confère leurs propriétés anti-athérogènes en enduisant l'activation de eNOS et COX-2 au niveau des cellules endothéliales, générant respectivement du NO et de la prostacycline, myorelaxantes et anti-thrombotiques (Rodriguez, Gonzalez-Diez et al. 2009). Cette S1P exogène quantitativement importante, peut interférer au niveau des récepteurs membranaires avec la S1P endogène et en moduler la signalisation (Murata, Sato et al. 2000) La S1P paraît également être générée par l'endothélium (Skoura and Hla 2009) et recruter les cellules inflammatoires (lymphocytes B et T) via S1P1 depuis les organes lymphoïdes vers la circulation générale (Michaud, Im et al. 2010).



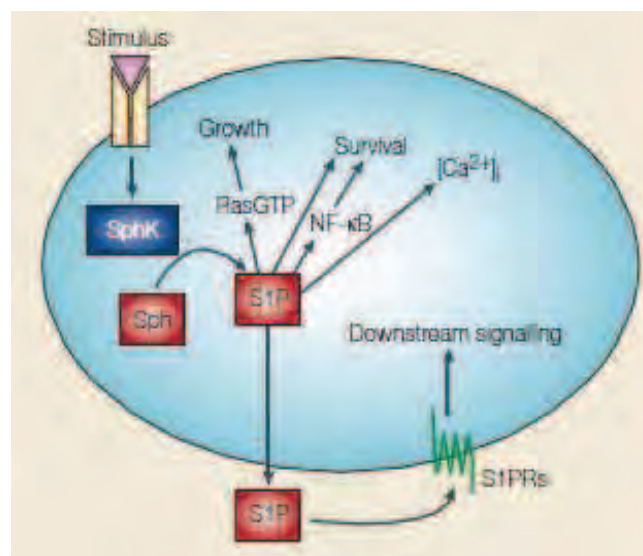
**Fig 41. Sources de S1P plasmatique et transport par les lipoprotéines.** La S1P est libérée dans le plasma par les plaquettes activées, les érythrocytes et les cellules endothéliales, leur contribution relative étant encore mal connue. Les lipoprotéines et l'albumine se comportent comme des accepteurs de la S1P, les HDL étant le transporteur le plus important de S1P dans le plasma. (D'après Rodriguez, Gonzalez-Diez et al. 2009)

La S1P peut aussi être générée au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique par SK2 (Chan and Pitson 2013) et agir par l'intermédiaire de ses récepteurs membranaires de manière autocrine ou paracrine (Rosen and Goetzl 2005) ou bien entrer dans le cytosol par un transporteur CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator), et avoir des effets intracellulaires, la S1P étant suffisamment soluble pour se déplacer dans le cytosol et agir à distance de son site de génération (Hannun and Obeid 2008).



**Fig 42. Transport et mouvements des sphingolipides bioactifs.** (D'après Hannun and Obeid 2008)

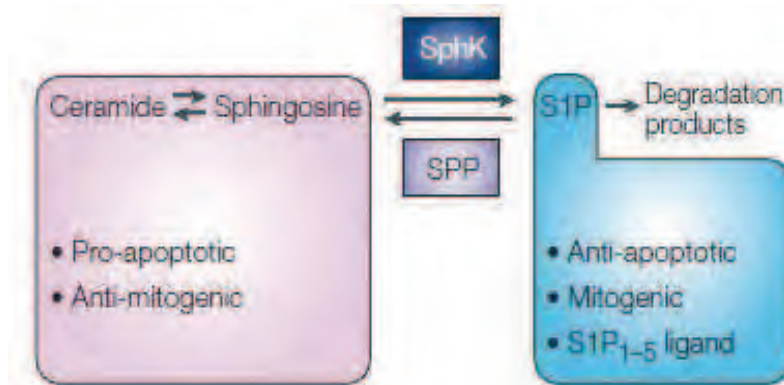
Au niveau nucléaire, la S1P contribue à la survie cellulaire et à la prolifération, en inhibant les histones désacétylases 1 et 2 (HDAC1/2), augmentant ainsi la transcription génique (Hait, Allegood et al. 2009). Elle protège les cellules de l'apoptose en bloquant l'activation des caspases et la fragmentation nucléaire induites par des agents proapoptotiques exogènes comme le C2-céramide, et elle inhibe l'activation de JNK (c-Jun N-terminale kinase) initialement activées par le céramide pour médier l'apoptose et ceci indépendamment de sa fixation à ses récepteurs membranaires (Edsall, Cuvillier et al. 2001). La S1P joue un rôle dans le cycle cellulaire et dans la régulation de différentes réponses physiologiques telles que l'angiogenèse et la maturation vasculaire, le développement cardiaque et l'immunité (Spiegel and Milstien 2003). Il peut toutefois s'avérer assez compliqué de distinguer les effets extracellulaires et intracellulaires de S1P (Tolan, Conway et al. 1999).



**Fig 43. Signalisation intracellulaire de la S1P.** A côté de sa signalisation extracellulaire dépendante des récepteurs S1PRs, la S1P peut directement induire une signalisation intracellulaire variée. (D'après Spiegel and Milstien 2003)

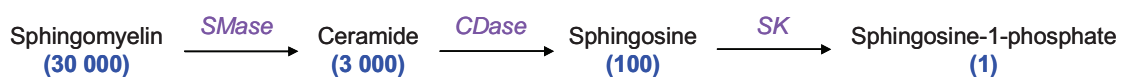
**5.2.5. Le rhéostat sphingolipidique :**

Le céramide et la S1P ont des effets biologiques opposés puisque le céramide et la sphingosine sont pro-apoptotiques et antiprolifératifs, alors que la S1P est impliquée dans la survie, la prolifération et l'angiogénèse, et inhiberait l'apoptose (Pavoine and Pecker 2009). Tous ces métabolites sont interconvertibles et plus que leur quantité, c'est le niveau relatif entre le céramide et la S1P qui détermine le devenir de la cellule (Spiegel and Milstien 2003).



**Fig 44. Le rhéostat sphingolipidique.** Le Cer et la Sph sont associés à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose alors que la S1P est associée à la survie et à la prolifération cellulaire. (D'après Spiegel and Milstien 2003)

L'augmentation du taux cellulaire de S1P secondairement à l'activation d'une sphingosine kinase qui phosphoryle la sphingosine, elle-même issue de la dégradation du céramide par une céramidase, augmente la prolifération, active le cycle cellulaire et augmente la synthèse d'ADN (Olivera, Kohama et al. 1999). Cependant les quantités cellulaires de S1P sont minimes par rapport aux quantités de sphingosine et de céramide (figure 43). On comprend ainsi que la dégradation de faibles quantités de sphingomyéline par la SMase, produise de fortes variations du pool de céramide. De la même manière une faible diminution des quantités de céramide sous l'effet de la CDase s'accompagne de fortes variations de sphingosine et de très fortes variations de sphingosine-1-phosphate (Hannun and Obeid 2008). Une signalisation venant interférer avec cette cascade réactionnelle peut donc faire pencher la balance de ce rhéostat vers l'apoptose. En effet, la S1P peut, sous l'effet d'une S1P phosphatase (SPP1 ou SPP2), être convertie en sphingosine puis en céramide, dans la voie de sauvegarde des sphingolipides (Le Stunff, Galve-Roperh et al. 2002).



**Fig 45. Proportions relatives des différents sphingolipides dans la cellule.** Les quantités de S1P dans la cellule sont très faibles, de l'ordre de quelques nanomolaires, en contre partie l'affinité pour ses récepteurs est très élevée de façon à pouvoir induire une signalisation pour de faibles variations de concentration. Les lipides retrouvés à des concentrations intermédiaires comme le céramide et le diacylglycérol (qui représentent environ 0,1 à 1 % des lipides membranaires totaux) agissent sur leur cible avec une affinité moyenne. La sphingomyéline qui est présente en quantité abondante dans la cellule ne semble pas avoir de cibles protéiques spécifiques. Par contre des variations abondantes des sphingomyéline peuvent induire des modifications des propriétés physiques et structurales des membranes biologiques. (D'après Hannun and Obeid 2008)



Il apparait donc que ce rhéostat sphingolipidique est en fait finement régulé, par diverses signalisations qui régulent les enzymes du métabolisme des sphingolipides.

### **5.3. Les enzymes de la voie des sphingolipides :**

#### **5.3.1. Les sphingomyélinases :**

Les sphingomyélinases (SMases) catalysent l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide et phosphocholine. Trois catégories de sphingomyélinases ont été identifiées. Elles diffèrent entre elles par leur pH optimal et leur localisation tissulaire et/ou subcellulaires (Levade and Jaffrezou 1999).

##### **5.3.1.1. Sphingomyélinase acide :**

La sphingomyélinase acide (aSMase) est localisée au niveau des lysosomes et du feuillet externe de la membrane plasmique. Son expression est ubiquitaire. Au niveau vasculaire, elle peut être sécrétée et retrouvée dans le sérum (Goni and Alonso 2002). Elle est codée par le gène *smpd1* (pour SphingoMyéline PhosphoDiesterase), à partir duquel un pro-précurseur commun à la forme lysosomale et sécrétée, est synthétisé. Ce pro-précurseur est clivé dans le réticulum endoplasmique (RE) pour former le précurseur et subit une maturation différentielle qui débute dans le RE et se poursuit dans Golgi. La forme lysosomale est N-glycosylée, ce qui la protège d'une part de la protéolyse dans le lysosome et qui permet surtout son adressage subcellulaire vers cet organelle grâce à la présence d'un mannose-6-phosphate à l'extrémité du motif glycanique (Schissel, Keesler et al. 1998). Le précurseur est enfin clivé dans le compartiment endo-lysosomal pour former la aSMase active et mature. Son pH optimum se situe entre 4,5 et 5,5 (Marchesini and Hannun 2004). Elle hydrolyse la sphingomyéline apportée par les vésicules endosomales depuis la membrane plasmique.

La forme sécrétée dans le milieu extracellulaire hydrolyse la sphingomyéline du feuillet externe de la membrane plasmique mais aussi la sphingomyéline présente au niveau des lipoprotéines circulantes, lorsqu'elle est sécrétée dans le secteur vasculaire. Son activité enzymatique est dépendante du zinc (Schissel, Schuchman et al. 1996).

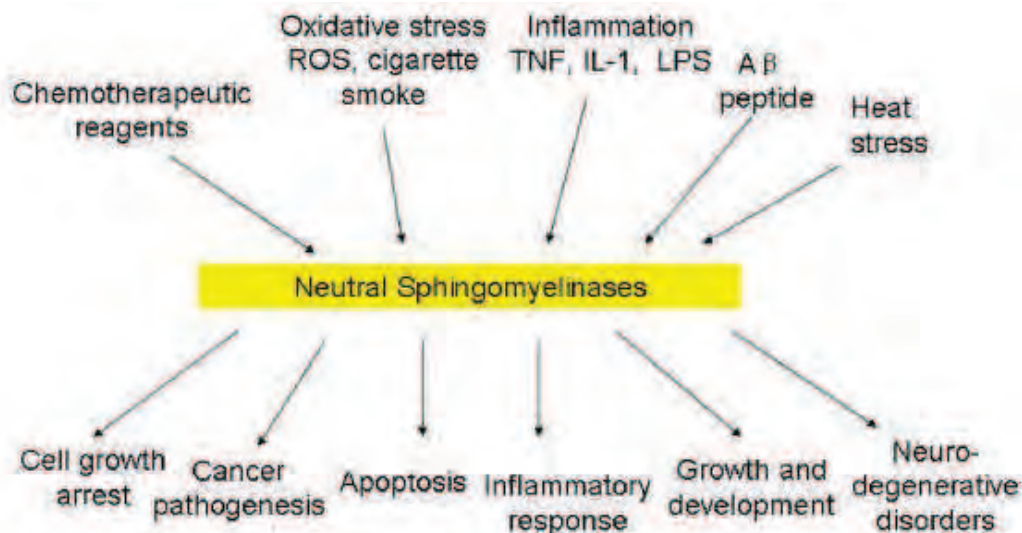
La translocation à la membrane de la aSMase génère du céramide au niveau des rafts lipidiques et participe à la transmission d'une signalisation en réponse à des modifications du milieu extracellulaire. Elle est notamment activée sous l'effet du TNF- $\alpha$ , des rayons ultraviolets (UV), et des agents chimiothérapeutiques aboutissant à l'apoptose (Rotolo, Zhang et al. 2005). Un rôle des espèces réactives de l'oxygène (ERO) est également suspecté (Castillo, Levy et al. 2007).

Une mutation du gène *smpd1* entraînant un déficit en sphingomyélinase acide est à l'origine de la maladie de Niemann-Pick caractérisée par une surcharge lysosomale en sphingomyéline. En fonction des signes cliniques liés à cette mutation on distingue deux formes. La forme A neurologique et viscérale à début précoce et la forme B strictement viscérale pour laquelle l'âge de début est variable (Sedel 2007; Vanier 2013).

##### **5.3.1.2. Sphingomyélinases neutres :**

Les sphingomyélinases neutres (nSMases) sont une famille d'enzymes qui hydrolysent la sphingomyéline en céramide à un pH de 7,4. Les nSMases Mg<sup>2+</sup> dépendantes sont ubiquitaires chez

les mammifères et sont liées à la membrane alors que les nSMases  $Mg^{2+}$  indépendantes sont retrouvées au sein des gaines de myéline et dans le cytosol des leucocytes et des cellules musculaires squelettiques (Levade and Jaffrezou 1999). Elles peuvent être activées par différentes signaux et être à l'origine d'une signalisation cellulaire variée. (Fig ci-dessous)



**Figure 46. Activateurs de l'activité nSMase et effets biologiques associés**

Les nSMase sont activées par de nombreux agents et elles jouent un rôle dans la physiologie et la physiopathologie. Les nSMase sont impliquées dans l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire mais aussi dans la croissance et le développement. Leur rôle dans le cancer, l'inflammation et les maladies neurodégénératives a été mis en évidence (D'après Wu, Clarke et al. 2010)

Trois types de nSMases membranaires ont été identifiées :

La nSMase de type 1 est codée par le gène *smpd2*. Elle ne semble pas avoir de rôle majeur dans le métabolisme des sphingolipides puisque sa surexpression n'influe pas sur le taux de sphingomyéline, ou de céramide, ni sur la signalisation pro-apoptotique (Tepper, Ruurs et al. 2001). Les souris *smpd2*<sup>-/-</sup> ne présentent pas de phénotype particulier, ni d'accumulation ou d'altération du métabolisme de la sphingomyéline ou des autres lipides (Zumbansen and Stoffel 2002).

La nSMase de type 2 est codée par le gène *smpd3*. C'est la plus étudiée des sphingomyélinases neutres. Elle est impliquée dans de nombreuses réponses physiologiques comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, le développement embryonnaire et l'inflammation (Wu, Clarke et al. 2010). Dans les cellules subconfluentes, elle est située au niveau du feuillet cytosolique de l'appareil de Golgi et transloque au niveau du feuillet interne de la membrane plasmique au niveau des zones de contact intercellulaire (Clarke, Snook et al. 2006) lorsque les cellules arrivent à confluence, ce qui suggère son implication dans l'arrêt du cycle cellulaire lors de l'inhibition de contact. Dans ces conditions, elle hydrolyse préférentiellement des sphingomyélines à chaîne longue à l'origine de la génération de C24 ou C24:1-céramide (Marchesini, Osta et al. 2004). Des souris *smpd3*<sup>-/-</sup> présentent un retard de la croissance, une hypoplasie viscérale, un retard pubertaire et des dysplasies osseuses associés à un panhypopituitarisme (Stoffel, Jenke et al. 2005). Une délétion sur le gène *smpd3*, responsable de la synthèse d'une nSMase2 inactive est à l'origine du phénotype Fro (pour Fragilitas Ossium) chez la souris, caractérisé par une ostéogenèse et une dentinogenèse imparfaite et un retard de croissance (Aubin, Adams et al. 2005). Le stress oxydant joue un rôle important dans l'activation de la nSMase, (Levy, Castillo et al. 2006) notamment sous l'effet de



H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cinq-Frais, Coatrieux et al. 2013). Cette activation s'accompagne de son transfert à la membrane plasmique où elle génère du céramide responsable d'un signal d'apoptose (Levy, Castillo et al. 2006). Son activation est dépendante de sa phosphorylation au niveau de 5 résidus sérines également impliqués dans la stabilité structurale de la protéine (Filosto, Ashfaq et al. 2012). Sous l'effet du TNF- $\alpha$ , la nSMase2 est phosphorylée par p38-MAPK, et ainsi activée induit une augmentation des molécules d'adhésion, ICAM-1 et VCAM-1, au niveau de cellules endothéliales bronchoalvéolaires (Clarke, Truong et al. 2007). Au niveau des cellules endothéliales, le TNF- $\alpha$  induit la synthèse de eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) via la nSMase2, la SK1 et la génération de S1P, (De Palma, Meacci et al. 2006) tout ceci suggérant l'implication de la nSMase2 dans la régulation de l'inflammation, de la migration cellulaire et du tonus vasculaire.

La nSMase de type 3 est codée par le gène *smpd4* qui présente une faible homologie avec les gènes *smpd2* et *smpd3*. Comme la nSMase1 et la nSMase2, elle est dépendante du magnésium et son activité est optimale à pH 7. La nSMase 3 fait partie des « C-tail-anchored integral membrane proteins » (Krut, Wiegmann et al. 2006). Elle est localisée au niveau du RE, et pourrait être impliquée dans la tumorigénèse (Corcoran, He et al. 2008). Elle est activée par le TNF- $\alpha$ . Elle s'associe au récepteur du TNF de type 1 (TNFR1) et à la protéine FAN (factor associated with nSMase activation) en réponse au stress cellulaire (Krut, Wiegmann et al. 2006).

### **5.3.1.3. Sphingomyélinase alcaline :**

Une sphingomyélinase alcaline a été détectée au niveau des entérocytes et de la bile. Elle hydrolyse la sphingomyéline d'origine alimentaire (Nyberg, Duan et al. 1996) et pourrait également jouer un rôle dans le développement des cancers du colon, des pathologies inflammatoires et de l'athérosclérose (Duan 2006).

### **5.3.2. Les céramidases :**

Les céramidases sont responsables de la désacylation du Céramide en Sphingosine. Elles sont également classées en fonction de leur pH optimal d'activation : acide, neutre ou alcalin (Mao and Obeid 2008). Elles diffèrent également les unes des autres par leur localisation cellulaire et leur spécificité de substrat, puisqu'il y a différents céramides (Gault, Obeid et al. 2010).

#### **5.3.2.1. Céramidase acide :**

La céramidase acide (AC) est localisée dans les lysosomes et désacyle les céramides issus de la dégradation des sphingolipides d'origine membranaires. Elle est codée par le gène *ASAH1*. Elle s'active par autoprotéolyse à pH 4.5 ce qui protège la cellule vis-à-vis d'une activation prématurée de l'enzyme avant son adressage lysosomal. Elle dégrade préférentiellement des céramides à chaînes moyenne et longue (Gault, Obeid et al. 2010). Diverses mutations sur le gène *ASAH1* transmises sur un mode autosomal récessif sont à l'origine de la Maladie de Farber ou lipogranulomatose (Bashyam, Chaudhary et al. 2013) (voir figure des maladies lysosomales), caractérisée au niveau cellulaire par une accumulation lysosomale de céramide et au niveau clinique par l'apparition à un âge précoce d'une arthrite, de lymphanédopathies, de difficultés psychomotrices et d'anomalies des cordes vocales (Gault, Obeid et al. 2010).

### **5.3.2.2. Céramidase neutre :**

La céramidase neutre (NC), est codée par le gène *ASAH2*. Son pH optimum est de 7. Son expression est ubiquitaire mais faible. C'est une O-glycosyl protéine soluble, le plus souvent localisée au niveau de la face externe de la membrane plasmique. Son motif glycanique joue un rôle dans l'interaction de la céramidase neutre avec la membrane plasmique (Gault, Obeid et al. 2010) où elle intervient dans la régulation de la production de sphingosine et de sphingosine-1-phosphate (Kono, Dreier et al. 2006). Elle dégrade préférentiellement des C16, des C18 ou des C18:1-céramides (Mao and Obeid 2008). La céramidase neutre est fortement exprimée par les entérocytes de l'intestin grêle et sécrétée au niveau de leur bordure en brosse, et participerait à la digestion des sphingolipides d'origine alimentaires (Kono, Dreier et al. 2006). Toutefois des souris *ASAH2*<sup>-/-</sup> sont apparemment normales et ne présentent aucune anomalie ou altération majeure de leur taux tissulaire en céramide, mais uniquement une absence de digestion du céramide dans l'intestin (Kono, Dreier et al. 2006).

### **5.3.2.3. Céramidases alcalines :**

Il existe trois céramidases alcalines, ACER1, ACER2 et ACER3, qui ont toutes les trois une forte homologie de structure (Mao and Obeid 2008). Elles fonctionnent toutes les trois à pH alcalin et sont activées par le calcium (Gault, Obeid et al. 2010).

ACER1 est codée par le gène *ASAH3*. Elle est exprimée au niveau de l'épiderme. Elle a un pH optimum à 8.5. On la retrouve au niveau du réticulum où elle hydrolyse préférentiellement les céramides à très longue chaîne surtout insaturée, notamment le C24:1-céramide plus que le C24-céramide. Elle n'a pas d'action sur les céramides en dessous de C18, ni sur le dihydrocéramide ou le phytocéramide, formes particulières de céramide surtout retrouvées au niveau de la peau (Mao and Obeid 2008). Elle aurait un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire et la différenciation des kératinocytes (Sun, Xu et al. 2008).

ACER2 est codée par le gène *ASAH3L*. Elle est surtout exprimée dans le placenta, mais de faibles activités peuvent être détectées dans d'autres tissus. Elle est associée à l'appareil de Golgi. Sa spécificité de substrat est moins restreinte que celle d'ACER1. Elle peut métaboliser du C16, C18 ou C20-céramide ainsi que des dihydrocéramides ou des phytocéramides à longue chaîne saturée ou insaturée et même du C24 et du C24:1-céramide (Gault, Obeid et al. 2010). La céramidase alcaline 2 serait impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire (Xu, Jin et al. 2006).

ACER3 est codée par le gène *PHCA*. Comme ACER2, elle est localisée préférentiellement dans le placenta. On la retrouve associée au réticulum et au Golgi. Elle a une forte affinité pour le phytocéramide mais désacyle aussi le dihydrocéramide et les céramides ayant des chaînes plus courtes que C20 et insaturées. La céramidase alcaline 3 serait impliquée dans la prolifération et l'apoptose (Hu, Xu et al. 2010).

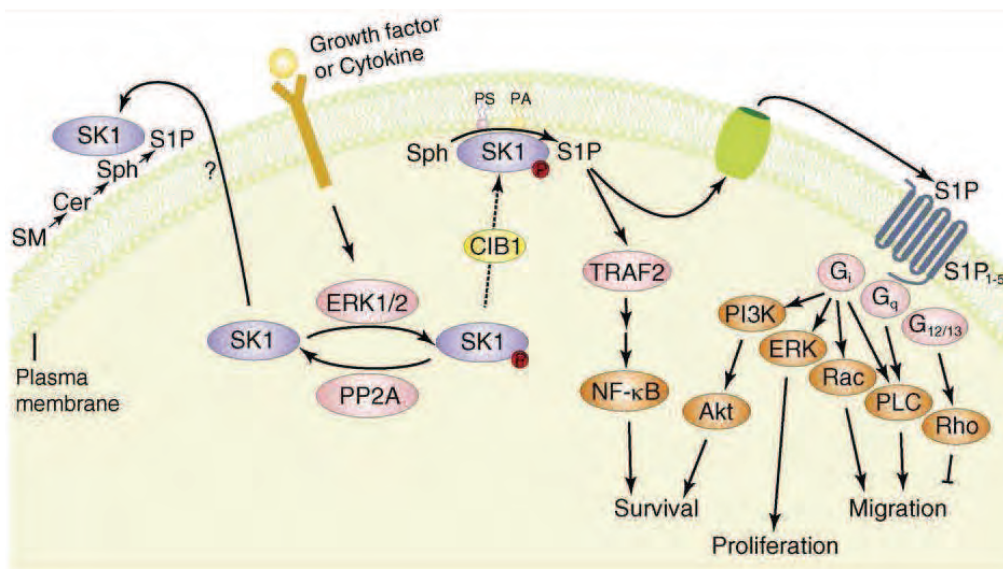
### **5.3.3. Les sphingosines kinases :**

Les sphingosine kinases 1 et 2 (SK1 et SK2) font partie de la famille des diacylglycerol kinases (Wattenberg, Pitson et al. 2006). Elles sont très différentes du point de vue de leur séquence, de leur activité catalytique, de leur localisation et de leur fonction, SK1 étant impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire alors que SK2 pourrait participer à l'apoptose (Maceyka, Sankala et al. 2005).

Ce sont des enzymes cytosoliques associées aux membranes, et dont la localisation subcellulaire va moduler le métabolisme des sphingolipides (Wattenberg, Pitson et al. 2006).

### 5.3.3.1. La sphingosine kinase 1 :

La sphingosine kinase 1 (SK1) est une enzyme principalement cytosolique. Sous l'effet de divers facteurs de croissance elle est phosphorylée par ERK1/2 (Pitson, Moretti et al. 2003), ce qui conduit à son activation et à sa translocation à la membrane plasmique (Chan and Pitson 2013). Sa rétention membranaire est favorisée par son interaction avec une phosphatidylsérine (PS) ou un acide phosphatidique (PA) (Pitson 2011). La S1P générée au niveau du feuillet interne par SK1 peut être exportée de la cellule par un transporteur soit SPNS2, soit un transporteur de la famille ABC (Hannun and Obeid 2008; Takabe, Paugh et al. 2008; Nishi, Kobayashi et al. 2013) et agir de façon autocrine ou paracrine au niveau de ses récepteurs couplé aux protéines G, conduisant au contrôle de la prolifération, de la migration et de la survie cellulaire (Pitson 2011). La S1P peut également agir directement au niveau de cibles intracellulaires et activer des voies de survie (Chan and Pitson 2013).



**Fig 47. Localisation cellulaire de SK1 et génération de S1P.** (D'après Pitson 2011)

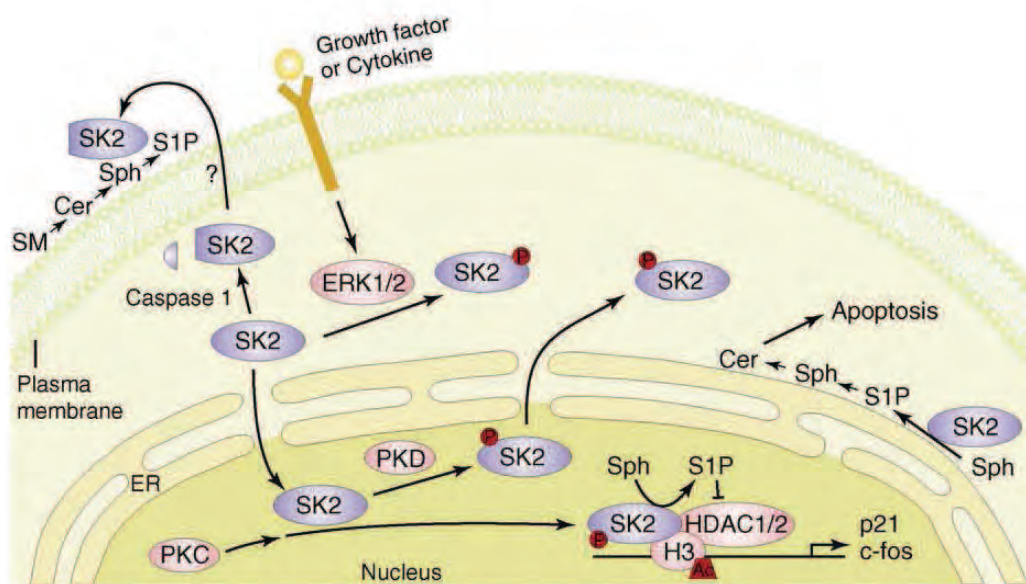
La protéine PP2A induit la déphosphorylation de SK1 et son inactivation (Barr, Lynn et al. 2008). SK1 peut aussi être exportée dans le milieu extracellulaire, notamment par les cellules endothéliales et participer à la régulation de taux de S1P dans le système vasculaire (Ancellin, Colmont et al. 2002).

SK1 exerce des effets pro- et anti-inflammatoires. Elle est impliquée dans l'induction de la cyclooxygénase 2 (COX-2) (Pettus, Bielawski et al. 2003) et des molécules d'adhésion (Lee, Thangada et al. 1999), la production de prostaglandines (PG) ainsi que l'activation de la eNOS induites par le TNF- $\alpha$ , dans une cascade de signalisation impliquant l'activation de la nSMase2 en amont (De Palma, Meacci et al. 2006). La S1P produite par SK1 protège contre l'apoptose (Spiegel and Milstien 2003).

L'axe SK1/S1P/S1PR joue un rôle important dans la vasculogénèse et l'angiogénèse (Argraves, Wilkerson et al. 2010). La S1P régule la prolifération et la migration de ces cellules vasculaires, ainsi que l'intégrité de la barrière endothéliale (Peters and Alewijnse 2007). S1P participe aussi à la régulation de la fonction lymphocytaire (Rosen, Sanna et al. 2003).

### 5.3.3.2. La sphingosine kinase 2 :

La sphingosine kinase 2 aurait une localisation plutôt nucléaire et cytoplasmique périnucléaire (Gault, Obeid et al. 2010). Les mécanismes d'activation de SK2 sont moins bien connus que ceux de SK1. Il semblerait toutefois que SK2 soit phosphorylée et activée au niveau du cytosol par ERK1/2 en réponse à l'EGF (Epidermal Growth Factor) (Hait, Bellamy et al. 2007).



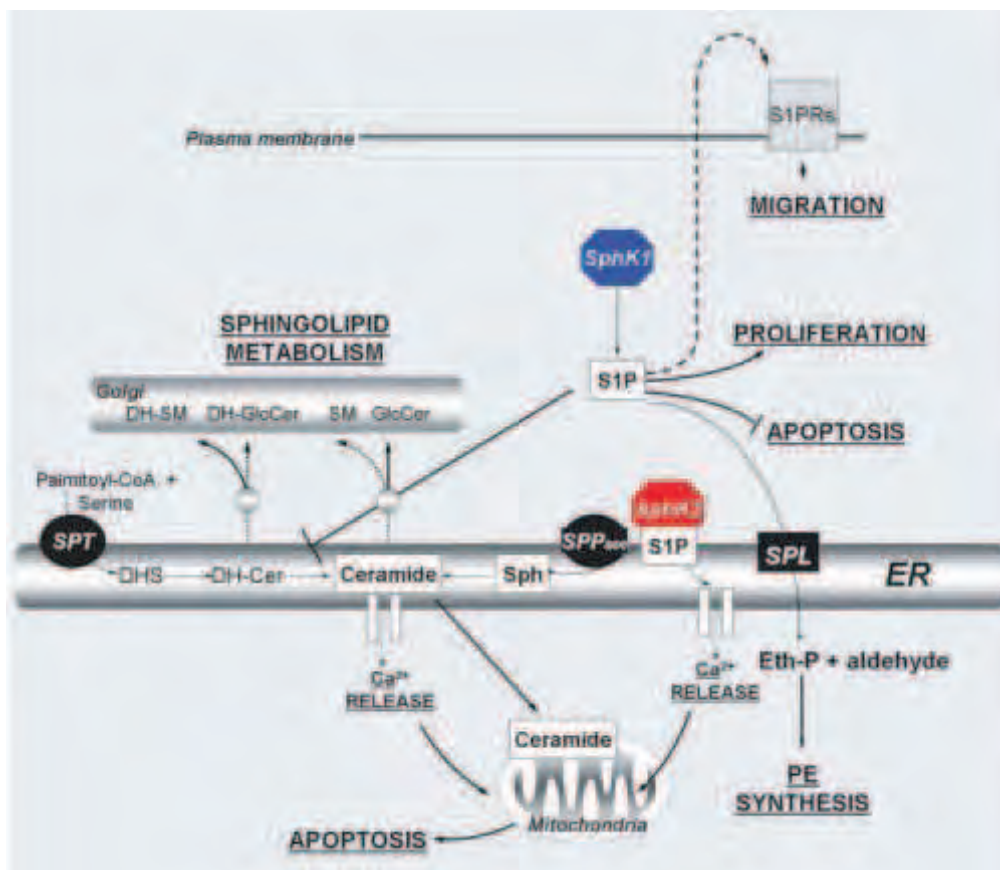
**Fig 48. Les effets biologiques de SK2 dépendent de sa localisation subcellulaire.** (D'après Pitson 2011)

La localisation de SK2 au niveau du réticulum peut se faire en réponse à un stress comme la déprivation en sérum (Maceyka, Sankala et al. 2005), qui permet de générer à ce niveau, de la S1P à l'origine de la synthèse de céramide pro-apoptotique par la voie de sauvegarde des sphingolipides, engageant aussi la S1P phosphatase et la céramide synthase du réticulum (Maceyka, Sankala et al. 2005). La rétention de SK2 au niveau des compartiments intracellulaires est favorisée par son interaction avec des phosphatidylinositol phosphates (PIPs) (Chan and Pitson 2013).

La surexpression de SK2 favorise également la libération du calcium du réticulum vers le cytosol induisant une apoptose mitochondriale (Maceyka, Sankala et al. 2005).

Dans le noyau, SK2 s'associe aux histones H3 et produit de la S1P qui se lie aux histones désacétylases HDAC1 et HDAC2 et inhibe leur activité enzymatique. Ceci augmente localement l'acétylation des histones H3 et la transcription génique (Hait, Allegood et al. 2009). La localisation de SK2 au niveau du noyau est régulée par un signal de localisation nucléaire et un signal d'export nucléaire, ce dernier étant induit par la phosphorylation de SK2 par PKD (Ding, Sonoda et al. 2007). Enfin SK2 pourrait être libérée dans le milieu extracellulaire consécutivement à son clivage partiel par la caspase-1, permettant la génération extracellulaire de S1P (Pitson 2011).





**Fig 49. Rôle opposé de SK1 et SK2 dans le métabolisme des sphingolipides.** Dans les cellules des mammifères SK2 jouerait un rôle dans la voie de sauvegarde des sphingolipides et fonctionnerait conjointement avec les S1P phosphatases pour générer de la sphingosine puis du céramide au niveau du réticulum, induisant l'augmentation de calcium cytosolique et l'apoptose. La S1P générée dans le cytosol par SK1 agit après son externalisation, sur ses récepteurs membranaires, ou directement sur des protéines cibles du cytosol conduisant à la prolifération et à la migration cellulaire. La S1P cytosolique inhibe également la synthèse *de novo* du céramide et joue un rôle de senseur dans la balance apoptose/survie et la prolifération cellulaire. (D'après Maceyka, Sankala et al. 2005).

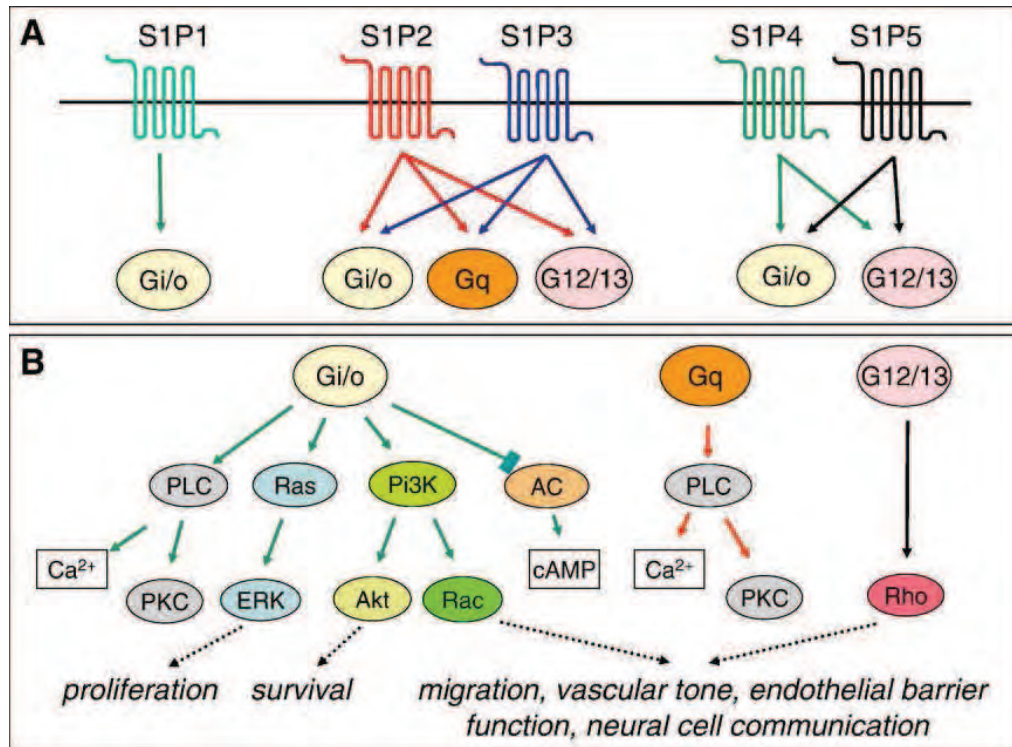
Malgré leurs différences, SK1 et SK2 pourraient se substituer l'une à l'autre en cas d'absence ou d'inactivation d'une des deux. Les souris SPHK1<sup>-/-</sup> n'ont pas de phénotype particulier, elles présentent une diminution importante du taux de S1P dans le sérum (Allende, Sasaki et al. 2004). Les souris SPHK2<sup>-/-</sup> ont un phénotype également viable mais n'ont peu ou pas de modification de la concentration sérique de S1P (Kharel, Lee et al. 2005). Par contre, les souris doublement invalidées ont un phénotype létal lié à des altérations des processus de neurogenèse et d'angiogenèse (Mizugishi, Yamashita et al. 2005).

#### **5.4. Les récepteurs de la S1P :**

La S1P exerce une grande partie de ses effets biologiques connus grâce à sa fixation sur ces récepteurs S1PRs, anciennement appelés EDG (Endothelial Differentiation Gene). Ce sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplé à des protéines G. Il existe cinq types de récepteurs pour la S1P, nommés S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 et S1P5 (codés par les gènes S1PR1, S1PR2, S1PR3, S1PR4, S1PR5), différemment exprimés sur le plan qualitatif et quantitatif, selon les types cellulaires (Cuvillier 2012). Ces récepteurs à 7 domaines transmembranaires sont couplés à

différentes protéines G hétérotrimériques (RCPG) à l'origine d'une signalisation intracellulaire variée. Les effets de la S1P dépendent du type de récepteur impliqué et de la signalisation qui lui est associée. (voir figure ci-dessous) (Brinkmann 2007).

Le système cardiovasculaire exprime seulement les récepteurs S1P1, S1P2 et S1P3, dont l'action est coordonnée dans les différentes fonctions physiologiques qu'ils régulent, notamment la vasculogénèse (Kono, Mi et al. 2004).



**Fig 50. Les voies de transduction du signal en aval des récepteurs de la S1P.** Le couplage différentiel des S1PR aux protéines Gi/o, Gq ou G12/13 est à l'origine de l'activation de différentes voies de signalisations et de réponses cellulaires variées. (D'après Brinkmann 2007)

#### **5.4.1. S1P1 (EDG-1) :**

S1P1 est couplé à des protéines Gi, inhibitrices de l'adénylate cyclase (AC) qui produit l'AMP cyclique (AMPc). L'activation de S1P1 diminue le taux intracellulaire d'AMPc et stimule la voie des MAPK, la voie PI3K/Akt/eNOS et la voie PLC qui permet une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. S1P1 est associé à la prolifération, à la migration et à la tubulogénèse des cellules endothéliales, ainsi qu'à la relaxation des CML (Yonesu, Nakamura et al. 2010). Ce récepteur est exprimé par de nombreux types cellulaires et tout particulièrement par les cardiomyocytes et les cellules endothéliales où il est nettement majoritaire par rapport aux autres S1PR (Kluk and Hla 2002; Mazurais, Robert et al. 2002). Ce récepteur joue donc un rôle important dans le développement du système cardiovasculaire. Au niveau cardiaque il induit un effet inotrope négatif par l'inhibition de l'adenyl-cyclase et antagonise ainsi les effets des récepteurs adrénergiques (Means and Brown 2009). Les souris S1PR1<sup>-/-</sup> présentent des malformations cardiaques avec des anomalies de la communication atrio-ventriculaire (Poulsen, McClaskey et al. 2011) et des saignements liés à une maturation vasculaire incomplète caractérisée par la quasi absence de CML et de péricytes autour des vaisseaux conduisant à un décès des embryons in utero (Liu, Wada et al.



2000; Allende, Yamashita et al. 2003). Les souris PDGF-B<sup>-/-</sup> ou PDGFR $\beta$ <sup>-/-</sup> présentent les mêmes anomalies vasculaires (Kluk and Hla 2002). La présence de S1P1 est d'ailleurs indispensable à la transduction du signal migratoire du PDGF (Hobson, Rosenfeldt et al. 2001). Au niveau du système lymphoïde, S1P1 est impliqué dans la mobilisation des lymphocytes T et B depuis les organes lymphoïdes vers la circulation générale. Cet effet est contre balancé par les récepteurs S1P2 (Michaud, Im et al. 2010).

#### **5.4.2. S1P2 (EDG-5) :**

S1P2 est exprimé dans de nombreux types cellulaires, notamment le système cardiovasculaire, mais il est surtout exprimé au niveau du cerveau au cours de l'embryogenèse (Kluk and Hla 2002). S1P2 est associé à plusieurs types de protéines G : Gi, Gq et G12/13, sa signalisation étant plus fortement couplée à celle de G12/13 (Skoura and Hla 2009). S1P2 a globalement des effets opposés à ceux de S1P1. Les protéines G12/13 activent la voie Rho/ROK qui est impliquée dans le remodelage du cytosquelette, notamment dans la formation des fibres de stress à l'origine d'une désorganisation des jonctions adhérentes de l'endothélium et d'une augmentation de la perméabilité vasculaire (Adada, Canals et al. 2013). Cette activation de la voie Rho/ROK est également responsable d'une inhibition de PI3K/Akt, bloquant ainsi le remodelage vasculaire, la migration et la prolifération cellulaire ainsi que la réparation tissulaire et peut conduire également à l'apoptose (Kluk and Hla 2002). Des souris S1P2<sup>-/-</sup> greffées avec des cellules tumorales présentent une angiogenèse accrue par rapide association des CML et des péricytes autour des vaisseaux. Des cellules endothéliales S1P2<sup>-/-</sup> ont une activité Rac et une phosphorylation d'Akt plus élevées ainsi que des capacités migratoires, prolifératives et une tubulogenèse accrues (Shimizu, Nakazawa et al. 2007; Du, Takuwa et al. 2010). Mais S1P2 est aussi impliqué dans l'organogenèse cardiaque chez le poisson zèbre où une délétion homozygote pour S1P2 est responsable de cardia bifida par anomalie de migration des précurseurs cardiomyocytaires au niveau de la ligne médiane. Des souris S1P2<sup>-/-</sup>, ne présentent par contre aucune anomalie du système cardiovasculaire, alors que des doubles KO S1P1<sup>-/-</sup> et S1P2<sup>-/-</sup> présentent une mortalité précoce in utero accompagnée d'une raréfaction du réseau capillaire par rapport à des simples KO S1P<sup>-/-</sup>. S1P2 contribuerait donc à l'établissement et à la maintenance du système cardiovasculaire mature pendant la vie embryonnaire, de façon synergique et/ou complémentaire avec les autres S1PR (Skoura and Hla 2009). La signalisation de S1P2 via Gq est associée à l'activation de la voie PLC/IP3/Ca<sup>++</sup> qui peut être impliquée dans la contraction des CML. S1P2 est très exprimé au niveau des CML aortiques avec S1P3 alors que S1P1 n'y est pas exprimé (Mazurais, Robert et al. 2002). Enfin S1P2 jouerait un rôle dans l'inflammation vasculaire et la congestion (Skoura and Hla 2009). Il a été décrit une augmentation de l'expression de S1P2 dans les cellules endothéliales de la rétine suite à un stress hypoxique avec une augmentation consécutive de l'expression de COX-2 et une répression de eNOS (Skoura, Sanchez et al. 2007). La signalisation en aval de S1P2 est donc variable et régule le développement et le maintien du système cardiovasculaire selon le contexte physiopathologique.

#### **5.4.1. S1P3 (EDG-3) :**

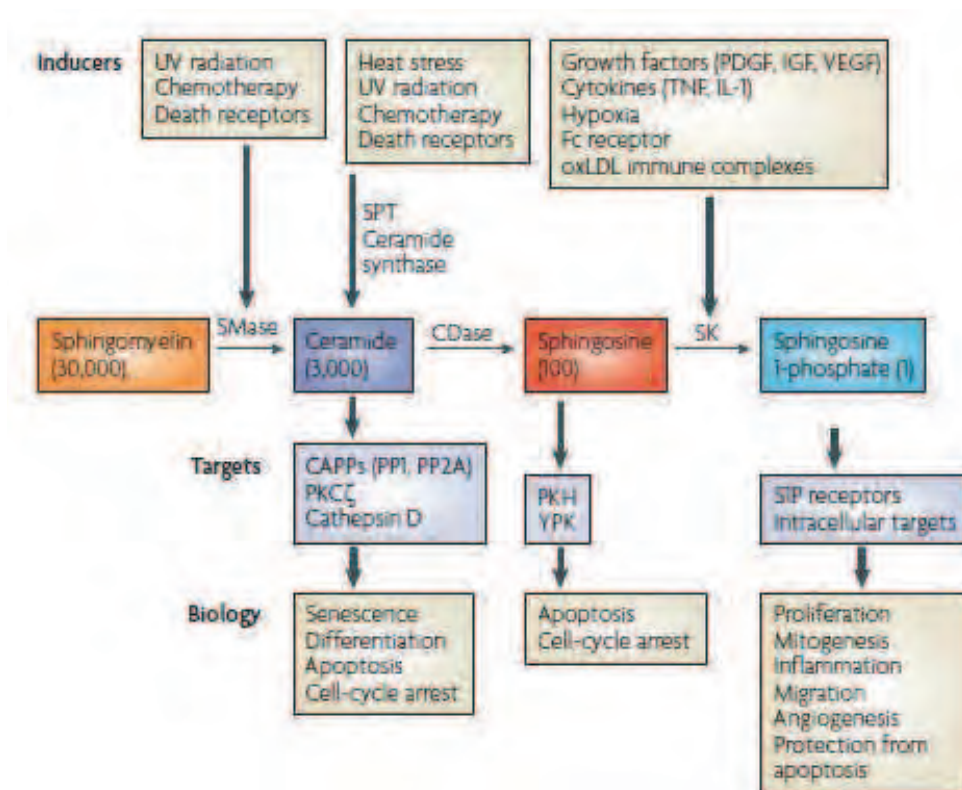
S1P3 ou EDG-3 est exprimé dans de multiples types cellulaires. Comme S1P2, il peut activer les protéines Gi/o, Gq et G12/13, et partage des fonctions cellulaires avec S1P1 et d'autres avec S1P2. Il peut ainsi réguler la migration, la prolifération cellulaire et la survie via Gi (Shimizu, De

Wispelaere et al. 2012). Par rapport à S1P1 ou S1P2, ses effets cellulaires sont très liés à l'activation de la PLC et à l'augmentation du calcium intracellulaire, en partie via Gi et en partie via Gq, à l'origine d'une vasoconstriction des CML vasculaires (Kluk and Hla 2002; Murakami, Takasugi et al. 2010). Il est également impliqué dans l'organisation du cytosquelette et l'assemblage des jonctions adhérentes des HUVEC (Kluk and Hla 2002), et dans l'effet bradycardisant de la S1P au niveau des cardiomyocytes (Murakami, Takasugi et al. 2010). Il active également, via Gi, la voie Ras/MAPK/ERK1/2 impliquée dans la prolifération et p38MAPK impliquée dans la migration des cellules endothéliales (Kimura, Watanabe et al. 2000). Il est impliqué dans le recrutement des macrophages au niveau des sites inflammatoires, notamment la plaque d'athérome (Keul, Lucke et al. 2011). Pourtant des souris S1PR3<sup>-/-</sup> n'ont pas de phénotype particulier, aucun trouble du développement, de la fertilité ni de la longévité, probablement par compensation des autres récepteurs, notamment S1P1 et S1P2 avec qui il y a des redondances dans les voies de signalisation activées (Kluk and Hla 2002).

Des nombreux agonistes et antagonistes des S1PR sont disponibles. Le FTY720 est un agoniste de tous les S1PR sauf S1P2. Phosphorylé par SK2, il se fixe aux récepteurs de la S1P et induit leur internalisation et leur dégradation, à l'origine d'une indisponibilité prolongée des récepteurs à la surface cellulaire, empêchant temporairement la S1P d'agir (Matloubian, Lo et al. 2004; Rodriguez, Gonzalez-Diez et al. 2009; Keul, Lucke et al. 2011). Le KRP-203 est un agoniste sélectif de S1P1 tout comme le SEW2871. Comme le FTY720, ces agonistes ont un effet similaire à la S1P sur le court terme mais un effet antagoniste sur le long terme par désensibilisation des cellules : séquestration et down régulation des récepteurs (Matloubian, Lo et al. 2004; Huwiler and Pfeilschifter 2008). Le VPC23019 est largement utilisé en tant qu'antagoniste de S1P1 et de S1P3. Le JTE013 est un antagoniste de S1P2. Le TY-52156 est un antagoniste de S1P3 (Murakami, Takasugi et al. 2010; Cuvillier 2012).

### **5.5. Activation et effets de la voie des sphingolipides dans les cellules de la paroi vasculaire :**

La voie des sphingolipides est activée par de nombreux stimuli extracellulaires aboutissant à des réponses cellulaires variées (Figure ci-dessous). L'activation des sphingomyélinases, en particulier la nSMase2, initie la voie de signalisation des sphingolipides par l'hydrolyse de la sphingomyéline en céramide. Des céramidases et des sphingosines kinases pourront être activées en cascade et aboutir à la production de sphingosine et de sphingosine-1-phosphate. Le niveau d'activation successif de ces enzymes conditionne l'équilibre de la balance entre les propriétés pro-apoptotiques du céramide et de la sphingosine (Cuvillier, Pirianov et al. 1996; Bourbon, Sandirasegarane et al. 2002) et les propriétés mitogènes et de survie de la S1P (Auge, Nikolova-Karakashian et al. 1999; Maceyka, Milstien et al. 2009). Il existe donc un équilibre, un rhéostat, entre le niveau des différents sphingolipides bioactifs, qui conditionne le devenir des cellules (Maceyka, Milstien et al. 2009). Notre équipe de recherche s'intéresse depuis de nombreuses années à cette voie de signalisation et aux mécanismes cellulaires impliqués dans son activation, afin de mieux connaître le rôle des sphingolipides bioactifs dans la physiologie et la physiopathologie cardiovasculaire, en particulier l'athérosclérose.



**Fig 51. Activateurs de la voie des sphingolipides et réponse cellulaires variées.** Les sphingolipides bioactifs sont interconnectés entre eux et ont des cibles cellulaires spécifiques (phosphatases, kinases, récepteurs couplés aux protéines G) qui médient leurs effets biologiques respectifs, voire les effets des agents inducteurs de la voie. (D'après Hannun and Obeid 2008)

### 5.5.1. Sphingolipides et apoptose :

La sphingomyélinase acide semble impliquée dans l'apoptose des cellules endothéliales induite par de fortes doses de radiation ionisante, induisant une translocation de la sphingomyélinase acide lysosomale vers le feuillet externe de la membrane plasmique et la génération de céramide pro-apoptotique, probablement via la génération d'espèces réactives de l'oxygène (Corre, Guillonnet et al. 2013). Une activation de la sphingomyélinase neutre et une apoptose radio-induite a également été décrite via le TNF- $\alpha$  (Haimovitz-Friedman, Kan et al. 1994). La formation des calcifications au niveau des plaques d'athérome est fortement liée à l'apoptose des CML. Cet effet a été mimé par l'administration de LDL fortement oxydées (par CuSO<sub>4</sub> à 5 mM à 37°C pendant 3 heures) sur des CML d'artères fémorales, à l'origine d'une activation de la sphingomyélinase neutre via p38-MAPK conduisant à l'apoptose et à la calcification de ces cellules (Liao, Zhou et al. 2013). Diverses cytokines inflammatoires activent la SMase et la synthèse de céramide qui induit l'apoptose via l'activation de JNK. Les facteurs de croissance activent également la SMase et la synthèse de céramide mais ils activent aussi la CDase et la SK ce qui contrebalance l'effet pro-apoptotique de la nSMase2 en générant de la S1P qui bloque JNK et les caspases impliquées dans la fragmentation de l'ADN et l'apoptose, et fait basculer la signalisation cellulaire vers la survie via ERK (Spiegel, Cuvillier et al. 1998). Dans l'infarctus du myocarde les phénomènes d'ischémie/reperfusion engendrent un stress oxydant avec une génération de ROS par les cellules myocardiques. Ces ROS activent la SMase et la génération de céramide pro-apoptotique, et induisent de façon concomitante

l'inactivation de la SK ne pouvant contrebalancer l'effet du céramide. De façon intéressante il a été montré qu'une brève période d'ischémie protège les cellules contre le stress oxydant de l'ischémie/reperfusion, et représente un pré-conditionnement à l'ischémie, par induction de la synthèse de céramide et de S1P, et par inhibition de la dégradation de la SK lors d'une ischémie prolongée (Maceyka, Milstien et al. 2007). La S1P exogène, transportée par les HDL peut également bloquer l'apoptose post infarctus des cardiomyocytes, en inhibant l'expression des molécules d'adhésion (VCAM-1 et ICAM-1) au niveau de l'endothélium, empêchant le recrutement de monocytes et des lymphocytes dans l'espace sous endothélial, réduisant ainsi la réponse inflammatoire. Cet effet est médié à la fois par le récepteur SRB-1 des HDL et le récepteur S1P1 (Argraves and Argraves 2007).

### **5.5.2. Sphingolipides et prolifération :**

La voie des sphingolipides est également impliquée dans la prolifération cellulaire induite par les agents de stress. Cet effet prolifératif est fonction d'une balance S1P/céramide en faveur de la S1P induisant la survie cellulaire et la prolifération. La croissance cellulaire induite par l'hypoxie semble passer par une activation de SK/S1P et une inhibition de SMase/Cer (Yun and Kester 2002). L'effet de la S1P sur la prolifération cellulaire dépend du récepteur impliqué. S1P1 et S1P3 induisent une prolifération des CML alors que S1P2 a plutôt un effet antiprolifératif (Daum, Grabski et al. 2009). Il a été démontré dans notre équipe, que les LDL moyennement oxydées (par les UV pendant 1h30 à 2h) stimulent la prolifération des cellules musculaires lisses (CML), *via* l'activation de nSMase2 et de SK1 (Auge, Nikolova-Karakashian et al. 1999). Cette prolifération des CML induite par les LDL oxydées ferait intervenir plusieurs voies de signalisation concomitantes. Des LDL moyennement oxydées par les UV, activent d'une part la voie de survie PI-3K/Akt *via* l'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor), ce qui protège les CML de la toxicité des LDLox, alors que l'activation de la voie sphingoméline/céramide/S1P induit l'activation et la translocation nucléaire des MAP kinases ERK1/2 induisant la prolifération cellulaire (Auge, Garcia et al. 2002). L'activation des métalloprotéases MT1-MMP et MMP-2 intervient en amont de l'activation de la voie des sphingolipides sous l'effet des LDLox mais n'interagit pas avec la voie PI-3K/Akt indépendamment activée par l'EGFR (Auge, Maupas-Schwalm et al. 2004). Le TNF- $\alpha$  à concentration mitogène active également la voie des sphingolipides et la prolifération des CML et des fibroblastes *via* la cascade protéolytique qui implique la furine, MT1-MMP et MMP 2 (Tellier, Negre-Salvayre et al. 2007). Il a été montré tout récemment dans l'équipe que le stress oxydant, lié à l'effet de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur les CML et les fibroblastes, joue un rôle important dans l'activation de la nSMase2 avec un effet dual sur le rhéostat sphingolipidique, dépendant de la dose d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Des faibles doses induisent une prolifération cellulaire impliquant l'activation de la nSMase2 et SK1 alors que de fortes doses activent la nSMases2 mais pas la SK1 faisant basculer la cellule vers l'apoptose (Cinq-Frais, Coatrieux et al. 2013). Cette voie de prolifération des CML induite par les LDLox et les agents de stress (cytokines, stress oxydant) pourrait intervenir au niveau de la plaque d'athérosclérose dans l'épaississement de la chape fibreuse, mais également au cours de la vasculopathie de transplantation, caractérisée par une hyperprolifération intimale des CML, générée entre autre par l'alloréaction humorale (Galvani, Trayssac et al. 2011).

### **5.5.3. Sphingolipides et migration :**

La S1P stimule la migration des cellules endothéliales via ses récepteurs S1P1 et S1P3 (Wang, Van Brocklyn et al. 1999; Harvey, Welch et al. 2010). Des travaux ont montré que S1P pouvait médier l'action migratoire du PDGF. Après fixation de son ligand, le PDGFR pourrait activer la sphingosine kinase à l'origine d'une génération de S1P qui induit de la migration cellulaire par l'intermédiaire de S1P1 (Hobson, Rosenfeldt et al. 2001) A l'inverse, la S1P peut inhiber la migration cellulaire sur des cellules où S1P1 est peu représenté surtout si S1P2 est majoritairement présent, via une régulation négative de Rac. Sur des CML aortiques humaines où S1P2 prédomine, la S1P inhibe le chimiotactisme induit par l'activation du PDGFR $\beta$ , alors que sur des HUVEC où S1P2 est faiblement exprimé mais où S1P1 est très représenté, S1P a un effet pro-migratoire (Osada, Yatomi et al. 2002; Ryu, Takuwa et al. 2002). L'influence de la S1P sur la migration cellulaire dépend donc du type cellulaire, mais aussi du sous type de récepteur exprimé par la cellule et du couplage préférentiel de ce récepteur avec l'une ou l'autre des protéines G (Okamoto, Takuwa et al. 2000). En effet il est établi que S1P2 et S1P3 sont tous deux couplés aux protéines Gi, Gq et G12/13 (Brinkmann 2007), pourtant leur effet sur la migration est opposé. Au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires, par exemple, S1P3 est davantage couplé à Gi et Gq qu'à G12/13 et induit l'activation de Rac et la migration cellulaire alors que S1P2 préférentiellement couplé à G12/13 active Rho à l'origine d'une régulation négative de Rac et de la migration (Sugimoto, Takuwa et al. 2003). Au niveau des cellules gliales, la signalisation de S1P2 en aval des protéines G est différents puisque dans ces cellules, S1P2 induit l'activation de Rac mais limite la migration cellulaire via l'activation de Rho/ROCK à l'origine de la formation de fibres de stress et de l'arrondissement des cellules (Lepley, Paik et al. 2005). S1P2 bloque également le chimiotactisme des lymphocytes B et T alors que S1P1 active leur recrutement depuis les organes lymphoïdes vers la circulation générale (Michaud, Im et al. 2010).

L'effet migratoire de la S1P semble dépendre également des doses utilisées in vitro. A des concentrations de l'ordre de 100 nM et jusqu'à 1  $\mu$ M, la S1P augmente le chimiotactisme des HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) et des BAEC (bovine aortic endothelial cells) alors qu'il est beaucoup moins prononcé pour des concentrations au-delà de 10  $\mu$ M (Wang, Van Brocklyn et al. 1999). Cet effet dual de la S1P sur ces deux types cellulaires est également retrouvé sur la prolifération et la tubulogénèse avec une maxima pour des concentrations micromolaires (pic vers 10  $\mu$ M), et semble passer par S1P1 et Gi (Wang, Van Brocklyn et al. 1999). L'importance de cet effet biphasique dépend aussi du type cellulaire. Sur des cellules endothéliales de cœur de fœtus bovin (FBHEs) une concentration de quelques nanomolaires de S1P induit une migration et une tubulogénèse 2 fois plus importante que dans le contrôle alors que quelques micromolaires induisent un effet 14 à 20 fois supérieur au contrôle (Panetti, Nowlen et al. 2000).

Enfin l'activation de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales par S1P via S1P1 et S1P3 intervient dans le processus de cicatrisation après lésion de l'endothélium par un stress mécanique (Lee, Goetzl et al. 2000).

### **5.5.4. Sphingolipides et angiogenèse :**

L'angiogenèse est un processus complexe impliquant le remaniement du cytosquelette, la migration, et la prolifération des cellules vasculaires ainsi que la stabilisation de la barrière endothéliale.



S1P active l'angiogenèse (migration et tubulogénèse) *in vitro* sur des cellules endothéliales et *in vivo* dans des plugs de Matrigel chez la souris, via la phosphorylation et l'activation de eNOS à l'origine d'une synthèse de NO (Rikitake, Hirata et al. 2002). S1P est impliquée dans le chimiotactisme des cellules endothéliales via S1P1 et S1P3, conduisant à l'activation de Rac et de Rho à l'origine d'une internalisation des intégrines des adhésions focales. De plus la migration des cellules endothéliales serait sous la dépendance de la phosphorylation de S1P1 par Akt, étape nécessaire à l'activation de Rac et à l'angiogenèse (Lee, Thangada et al. 2001). L'induction de l'angiogenèse par la S1P agit en synergie avec la voie du VEGFR. En effet, le VEGFR2 peut induire l'activation de SK1 et la génération consécutive de S1P (Spiegel and Milstien 2003) ainsi que l'expression de S1P1, et les récepteurs de S1P peuvent transactiver le VEGFR2, à l'origine de l'activation d'Akt et de la phosphorylation d'eNOS (Tanimoto, Jin et al. 2002; Spiegel and Milstien 2003). La S1P est impliquée dans l'angiogenèse post-ischémique par l'activation de eNOS dans les cellules endothéliales (Qi, Okamoto et al. 2010).

La S1P via son récepteur S1P1 est nécessaire pour la stabilisation des vaisseaux naissants durant le développement embryonnaire et au cours de l'angiogenèse tumorale (Chae, Paik et al. 2004). En effet S1P participe à la régulation du recouvrement de l'endothélium par les cellules musculaires lisses vasculaires au cours de l'embryogenèse, en coopération avec S1P2 et S1P3. Des souris triple KO pour ces trois récepteurs présentent beaucoup plus d'anomalies du système vasculaire et une plus forte létalité *in utero* que des simples KO S1P<sup>-/-</sup> (Kono, Mi et al. 2004). S1P1 et S1P3 sont impliqués dans la survie des cellules endothéliales via PI3K et eNOS, (Morales-Ruiz, Lee et al. 2001) ainsi que dans l'assemblage des jonctions adhérentes et de la cohésion endothéliale via l'activation de Rac par S1P1 et l'activation de Rho par S1P3 (Lee, Thangada et al. 1999; Young and Van Brocklyn 2006). S1P2 bloque le remodelage vasculaire et la réparation tissulaire, par blocage du chimiotactisme et de la migration des cellules endothéliales sénescents où il augmente progressivement (Skoura and Hla 2009). Il est à l'origine de la fragilité vasculaire accrue avec l'âge accompagnée d'une mauvaise capacité de cicatrisation (Adada, Canals et al. 2013). Mais S1P2 pourrait également participer à l'angiogenèse inflammatoire. En effet sous l'effet d'un stress hypoxique on observe une neovascularisation par bourgeonnement en avant de la rétine en association avec une induction de COX-2 et une inhibition de eNOS dans les cellules endothéliales de la rétine. La diminution de l'angiogenèse de la rétine des souris S1P2 KO est associée à une diminution de l'inflammation (Skoura, Sanchez et al. 2007). De manière intéressante, dans des conditions normoxiques, la S1P induit une stabilisation et une augmentation de l'expression de HIF-1 $\alpha$  *via* S1P2 dans les CE et les CML semblable à celle induite par l'hypoxie. Le complexe HIF-1 $\alpha$ /HIF-1 $\beta$  ainsi formé devient fonctionnel et transloque dans le noyau où il se fixe sur des zones HRE qui sont des éléments de réponse à l'hypoxie. La S1P augmente ainsi l'expression des gènes régulés par HIF tels que VEGF, GLUT-1, PAI-I, en dehors de toute hypoxie (Michaud, Robitaille et al. 2009). Dans les cellules endothéliales tumorales au contraire, S1P2 inhibe l'angiogenèse (Du, Takuwa et al. 2010).

S1P2 est également impliqué dans l'assemblage des fibres de stress et la disruption des VE-cadhérines au niveau des jonctions adhérentes à l'origine d'une perméabilité endothéliale accrue. S1P2 semble en fait impliqué dans le développement et le maintien du système vasculaire selon le contexte physiopathologique (Skoura and Hla 2009).



### **5.5.5. Sphingolipides et vasomotricité :**

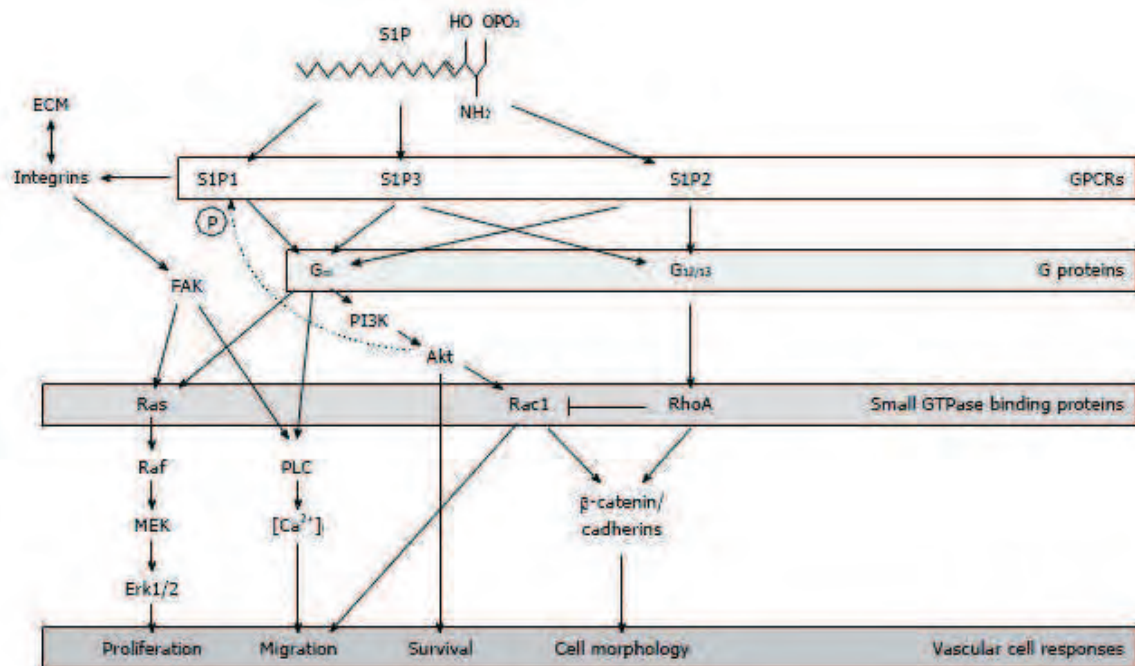
La vasomotricité correspond aux mécanismes de contraction et de relaxation des CML vasculaires qui sont sous le contrôle du système nerveux autonome, d'hormones et d'autres protéines et métabolites. L'état de contraction des CML dépend de la concentration en calcium cytoplasmique. L'ouverture de canaux calciques, qui peuvent dépendre du voltage ou de la fixation de ligands, entraîne une hausse de la concentration en calcium cytoplasmique (depuis le sarcoplasme ou le milieu extracellulaire).

D'un point de vue moléculaire, la contraction des CML dépend de la chaîne légère de la myosine MLC (myosine light chain). Pour qu'il y ait contraction, la MLC doit être phosphorylée. Cette phosphorylation est nécessaire à l'interaction actine/myosine et donc à la contraction. Cette phosphorylation est régulée par une kinase (MLCK) et une phosphatase (MLCP). Cette dernière déphosphoryle la chaîne légère de la myosine ce qui aboutit à un arrêt de la contraction. Il existe deux voies principales conduisant à la contraction des CML : une voie qui active la MLCK et une autre qui inhibe la MLCP. La première voie fait intervenir l'activation de la phospholipase C (PLC) avec production d'inositol triphosphate (I3P) et augmentation de la concentration de calcium dans le cytoplasme qui se lie à la calmoduline pour former des complexes qui activent la MLCK et la contraction. La voie d'inhibition de la MLCP est indépendante du calcium. Elle implique la famille des GTPases Rho qui induisent la phosphorylation de la protéine ciblant la phosphatase de la myosine (MYPT) ce qui entraîne l'inhibition de la MLCP et favorise la contraction. Généralement, les vasoconstricteurs induisent une augmentation du calcium cytoplasmique et les vasodilatateurs induisent une augmentation du NO et d'AMPc en intracellulaire.

La S1P est impliquée dans la modulation et la régulation fine du tonus vasculaire. D'une manière générale, elle induit une vasoconstriction au niveau des CML et une vasodilatation ainsi qu'une augmentation de la perméabilité au niveau de l'endothélium (Lucke and Levkau 2010). Au niveau des CML c'est S1P3 qui semblerait impliqué et induirait une contraction cellulaire par la mobilisation du calcium, la calmoduline et la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine, alors que S1P2 « augmenterait la sensibilité » cellulaire au calcium en activant la voie Rho kinase qui phosphoryle et inhibe la MLCP (Daum, Grabski et al. 2009). Au niveau de l'endothélium la S1P induit une phosphorylation et activation de eNOS via PI3K/Akt et la génération de NO induisant une vasodilatation, mais induit également une dissociation des VE-cadhérines au niveau des jonctions adhérentes via S1P2, et augmente ainsi la perméabilité vasculaire. A l'inverse, S1P1 et S1P3 renforcent les jonctions adhérentes et participent à l'intégrité de la barrière endothéliale (Lucke and Levkau 2010). Pour ce qui est du tonus vasculaire, l'effet de la S1P dépend ici aussi de l'expression différentielle de ses récepteurs. Les artères mésentériques de rates âgées qui expriment peu S1P1, sont beaucoup plus sensibles à la vasoconstriction induite par S1P que les artères mésentériques de rates jeunes où l'expression de S1P1 est importante (les œstrogènes induisant l'expression de S1P1) (Hemmings, Xu et al. 2004). En effet l'activation de eNOS et la génération du NO vasodilatateur, semble passer par S1P et S1P3 induisant l'activation de PI3K/Akt/eNOS (Rodriguez, Gonzalez-Diez et al. 2009). D'autres travaux ont montré que la S1P induit une vasoconstriction des artères cérébrales beaucoup plus marquée qu'au niveau de l'aorte. L'étude du pattern d'expression des récepteurs de la S1P au niveau des CML de ces deux types d'artère montre qu'au niveau des artères cérébrales, les CML expriment quatre à cinq fois plus de S1P2 et de S1P3 qu'au niveau de l'aorte, le niveau d'expression de S1P1 étant le même. Cette expression différentielle des récepteurs est à

l'origine d'un important influx de calcium du sarcoplasme vers le cytosol des CML au niveau des artères cérébrales par rapport au CML aortiques, à l'origine d'une vasoconstriction plus marquée (Coussin, Scott et al. 2002).

La S1P transportée par les HDL exerce un effet vasculoprotecteur, d'une part en induisant la synthèse de NO par les cellules endothéliales, via S1P1, S1P3 et le scavenger SRB1, et d'autre part en induisant la synthèse de PGI2 antithrombotique par les cellules endothéliales et les CML, via S1P2 et S1P3 et l'induction de COX-2 (Rodriguez, Gonzalez-Diez et al. 2009).



**Figure 52. Signalisation des récepteurs de la S1P au niveau des cellules endothéliales.** Par l'intermédiaire de ses récepteurs S1P1, S1P2 et S1P3, la S1P est impliquée dans la prolifération, la migration et la survie cellulaire ainsi que dans les réarrangements du cytosquelette nécessaires à la tubulogénèse, aux phénomènes d'angiogénèse et de vasculogénèse. FAK: Focal adhesion kinase; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase; GPCRs: G-protein-coupled receptors; PLC: phospholipase C; ECM: Extracellular matrix; MEK: Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase. (D'après Argraves, Wilkerson et al. 2010)

Tous ces phénomènes de prolifération, migration, contraction cellulaire et tubulogénèse sont étroitement imbriqués dans l'angiogénèse *in vivo*. Ce travail de thèse est focalisé sur l'étude de l'implication de la voie nSMase2/SK1/S1P dans la signalisation angiogénique des LDL oxydées sur les cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*.

## **OBJECTIFS DE L'ETUDE**



L'angiogénèse est un processus physiologique nécessaire au développement du système vasculaire et à son maintien, mais est également impliqué dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

L'athérosclérose est une pathologie lente et progressive aboutissant à la formation de plaques d'athérome composées de dépôts lipidiques riches en cholestérol et en lipides oxydés enveloppés dans une chape fibreuse. Il est actuellement bien établi que les LDL oxydées jouent un rôle majeur dans l'athérogenèse. De faibles concentrations induisent une migration, une prolifération cellulaire et une signalisation pro-inflammatoire, alors que de fortes concentrations sont toxiques et induisent une apoptose des cellules vasculaires.

Le développement des vasa vasorum en regard de l'épaississement intimal des plaques d'athérosclérose peut être consécutif à différents phénomènes communément retrouvés au sein de la plaque comme l'hypoxie, l'ischémie et le stress oxydant capables de stimuler l'expression de divers facteurs angiogéniques via l'activation de HIF (Hypoxia Inductible transcription Factor).

De nombreux facteurs angiogéniques, notamment le VEGF (vascular endothelial growth factor), ou le PDGF (platelet-derived growth factor), ainsi que des médiateurs lipidiques comme la sphingosine-1-phosphate, les phospholipides oxydés et les LDL oxydées stimulent la migration, la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogénèse.

Le rôle des LDL oxydées dans l'angiogénèse est controversé. A faible dose les LDL oxydées semblent être pro-angiogéniques *in vitro*, alors qu'elles peuvent être anti-angiogéniques à plus forte concentration en inhibant la prolifération endothéliale et la différenciation des progéniteurs endothéliaux.

L'angiogénèse *in vitro*, induite par de faibles doses de LDL oxydées sur des cellules endothéliales de coronaires humaines, semble passer par la génération d'un stress oxydant à l'origine de l'induction du VEGF, facteur de croissance angiogénique. De plus, il a été précédemment montré dans l'équipe, que les LDL oxydées activent de la voie des sphingolipides dans des cellules musculaires lisses en cultures, avec en réponse une activation du signal mitogène dans ces cellules.

Le mécanisme angiogénique des LDLox est encore mal compris, et l'activation de la voie des sphingolipides avec la génération consécutive de sphingosine-1-phosphate (S1P), un second messenger de cette voie, bien connu pour ses propriétés angiogéniques, n'a encore jamais été rapporté dans l'angiogénèse induite par les LDLox.

Les objectifs de ce travail de thèse se divisent en deux parties :

1. Etude du rôle de la voie de signalisation sphingosine-1-phosphate (S1P), sphingosine kinase (SK1) et récepteurs de S1P (S1PR) dans l'effet angiogénique des LDL oxydées.
2. Etude des mécanismes impliqués dans l'activation des sphingolipides nSMase2/SK1 dans l'angiogénèse induite par les LDL oxydées (stress oxydant et p38MAPK, métalloprotéases, connexines).





## **MATERIEL ET METHODES**



## **1. Produits et réactifs**

L'anticorps monoclonal anti-S1P bloquant LT1002 (Sphingomab) et l'anticorps isotype contrôle LT1017 proviennent de LPATH (San Diego, USA). Les agonistes/antagonistes des récepteurs de S1P, KRP-203 et FTY720 proviennent de Cayman. La diméthylsphingosine (DMS), la sphingosine-1-phosphate, le GW4869, le SB203580, la carbenoxolone et l'acide glycyrrhétinique viennent de Sigma-Aldrich. Le peptide Gap 26 et le Gap 26 Scrambled viennent de Severn Biotech Ltd. Le SU1498 vient de Santa Cruz Biotechnology. L'anticorps monoclonal anti-CD36 [FA6-152] bloquant et l'anticorps isotype contrôle [ICIGG1] proviennent de Abcam. L'anticorps monoclonal anti-LOX-1 bloquant et l'anticorps isotype contrôle proviennent de RD Systems.

## **2. Préparation des LDL et détermination de leur contenu en lipides oxydés**

Les LDL sont isolées à partir de pools de sérums humains, préparées par ultracentrifugation, et dialysées dans une solution aqueuse à pH 7.3 contenant 150mM de NaCl et 0.1 mM d'EDTA, puis stérilisées par filtration (filtres Millipore de 0.2  $\mu$ m) et stockées à 4°C jusqu'à utilisation. La pureté des LDL a été testée par électrophorèse sur Hydragel et la concentration en apoB est déterminée par immunonéphélométrie.

Les LDL sont faiblement oxydées par irradiation sous UV-C comme suit. Un volume de 3 ml de LDL à 2 mg apoB/ml diluées dans du PBS, est irradié pendant 1h30 dans un bécher de façon à avoir une épaisseur irradiée de 5 mm, à une distance de 10 cm de la source d'UV (HNS 30W OFR Osram UV-C tube,  $\lambda_{max}$  254 nm, 0.5 mW/cm<sup>2</sup>). (Negre-Salvayre, Paillous et al. 1992; Escargueil-Blanc, Salvayre et al. 2001)

Cette méthode produit des LDL faiblement oxydées qui contiennent 63-97 nmol d'hydroperoxyde/mg d'apoB, 5.6-8.3 nmol TBARS/mg d'apoB et 8-11 nmol de 4-HNE/mg d'apoB (déterminé par kit Elisa HNE-His d'OxiSelect™-Cell Biolabs Inc., Euromedex, Souffelweyersheim, France). Les LDL sont ensuite stérilisées par filtration et immédiatement utilisées.

Les lipoprotéines murines ont été préparées par ultracentrifugation à partir de plasma de souris hypercholestérolémiques apoE<sup>-/-</sup> (contenant majoritairement des VLDL). Les lipoprotéines purifiées ont été dialysées et oxydées comme les LDL humaines, avec toutefois une concentration en protéines totales plus faible que la concentration en apoB des LDL humaines.

La concentration en LPS (lipopolysaccharides) des LDL a été évaluée par l'utilisation du kit de dosage de l'endotoxine ToxinSensor™ Chromogenic LAL de chez Genscript, Piscataway, NJ. La concentration en LPS dans les divers lots de LDL varie entre 0.03 et 0.06 EU/mg d'apoB, que les LDL soient natives ou oxydées.

## **3. Culture cellulaire**

Des cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1) (Dr. Candal, CDC, Atlanta), sont cultivées dans du milieu (MCDB-131 Medium (1X), Gibco-Life technologies) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 40  $\mu$ mol/L de glutamine ainsi que des antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine), en incubateur dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>. 24h avant les expérimentations, les cellules sont privées par remplacement de la totalité

du milieu de culture par un milieu appauvri en sérum (0.1% de SVF), comme indiqué sur les figures. Les conditions de privation ont été déterminées au préalable de façon à éviter l'effet pro-apoptotique d'une absence totale de SVF. De plus ce milieu appauvri en sérum facilite la captation des LDL oxydées et minimise les interférences potentielles avec le SVF sur l'activation de certaines voies de signalisation cellulaire.

#### **4. Migration des HMEC-1**

Les HMEC-1 sontensemencées dans du milieu de culture MCDB-131 appauvri en sérum (0.1% de SVF), sur des plaques de migration de 24 puits contenant des chambres de Boyden (Corning Transwell Polycarbonate Membrane, Sigma), à la concentration de  $2.10^5$  cellules/puits, selon le protocole du fabricant. La migration est stimulée par des LDLox (20 et 50  $\mu\text{g/ml}$ ) sur la nuit avec ou sans l'anticorps monoclonal anti-S1P (10  $\mu\text{g/ml}$ ) ou son isotype contrôle (10  $\mu\text{g/ml}$ ), comme indiqué. Après ce délai, les cellules restées dans la partie supérieure de la chambre de Boyden sont retirées par lavage et les cellules ayant migré à travers la membrane sont colorées dans une solution d'acide borique (0.2 M) contenant 0.1% de cristal violet (Bio Basic Incorporated) et 2% d'éthanol, puis photographiées. La quantification de la migration se fait par comptage des cellules colorées sur les photographies et par mesure de la coloration au spectrophotomètre (570 nm) après dissolution des cellules dans de l'acide acétique (10%).

#### **5. Tubulogenèse *in vitro* sur Matrigel™**

La formation de tubes *in vitro*, à partir des HMEC-1 est évaluée sur Matrigel™ (Basement Membrane Matrix Growth Factor Reduced, Phenol Red Free, 10 ml, BD Biosciences) comme décrit par Dandapat (Dandapat, Hu et al. 2007) et selon les conditions du fabricant. Le Matrigel™ est décongelé toute la nuit dans de la glace, puis réparti sur une plaque 24 puits, à raison de 60 $\mu\text{l}$ /puits de façon à recouvrir le fond des puits. La plaque est ensuite déposée 30 minutes à l'incubateur à 37°C pour permettre au Matrigel™ de polymériser. Les HMEC-1 sontensemencées à la concentration de 30 000 cellules par puits dans du milieu MCDB-131 contenant 0.1% de SVF, et incubées pendant 18 heures avec ou sans LDL oxydées ou natives à 20  $\mu\text{g/ml}$ , et des inhibiteurs lorsque c'est indiqué. Après ce délai, les cellules sont lavées au PBS et colorées avec de la Calcéine-AM bio-reagent (Sigma-Aldrich) à 1  $\mu\text{mol/L}$  pendant 30 minutes puis photographiées sous un microscope à fluorescence (exc.496/em.516). Le nombre de tubes (cellules liées entre elles) est compté et reporté au nombre total de cellules sur l'image. Une valeur moyenne, à partir de 10 photographies, est déterminée pour chaque condition. Les données sont exprimées en pourcentage de tubes formés, dans chaque condition, par rapport à la condition contrôle non stimulée.

#### **6. Angiogenèse *in vivo* sur plugs de Matrigel™ chez des souris C57BL/6**

Les expérimentations animales sont réalisées au Centre de Zootechnie Inserm/UPS du CHU Toulouse Rangueil selon les règles de l'expérimentation animale de l'Inserm et de l'Université. Ce protocole expérimental n° 13/1048/10/17 a été approuvé par le Comité Institutionnel pour les expérimentations animales de l'Inserm/Université Toulouse-3.

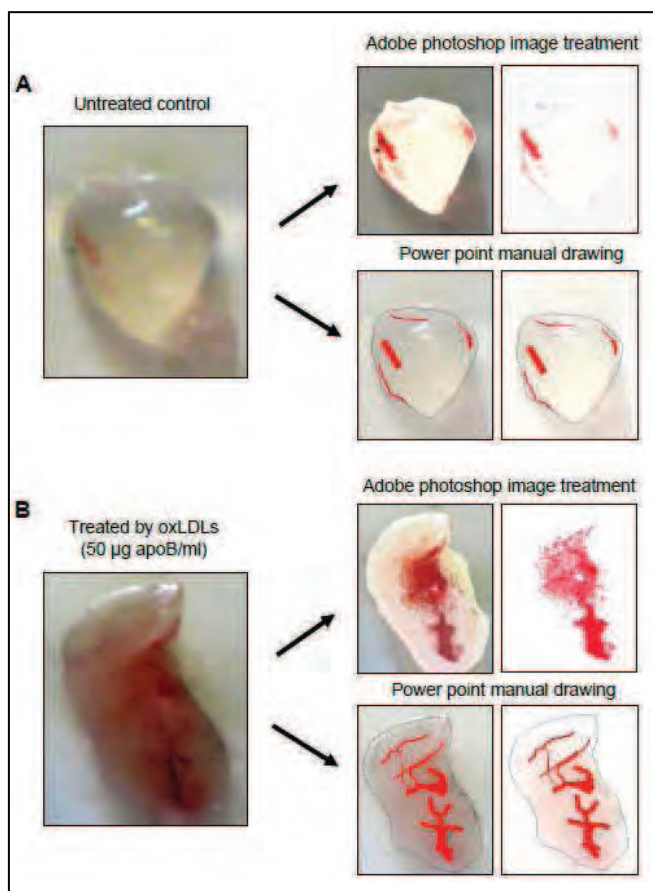
- 'Matrigel plug assay' *in vivo* chez la souris (Passaniti, Taylor et al. 1992). Des souris C57BL/6 mâles de 6 à 8 semaines (Janvier, France), anesthésiées par inhalation d'isoflurane, ont été injectées



en sous cutané au niveau des flancs avec 400 µl de Matrigel™ contenant des LDL oxydées, des LDL natives ou du PBS seul (contrôles). Afin de tester l'implication de la S1P dans l'angiogenèse *in vivo*, certaines ont reçu des injections intrapéritonéales d'anticorps anti-S1P ou de l'anticorps contrôle à la dose de 50 mg/kg de poids tous les 3 jours. A la fin de l'expérience (15 jours après) les souris sont sacrifiées par injection d'un cocktail de kétamine (150 mg/kg de poids) + xylazine (10 mg/kg de poids), suivie d'une dislocation cervicale.

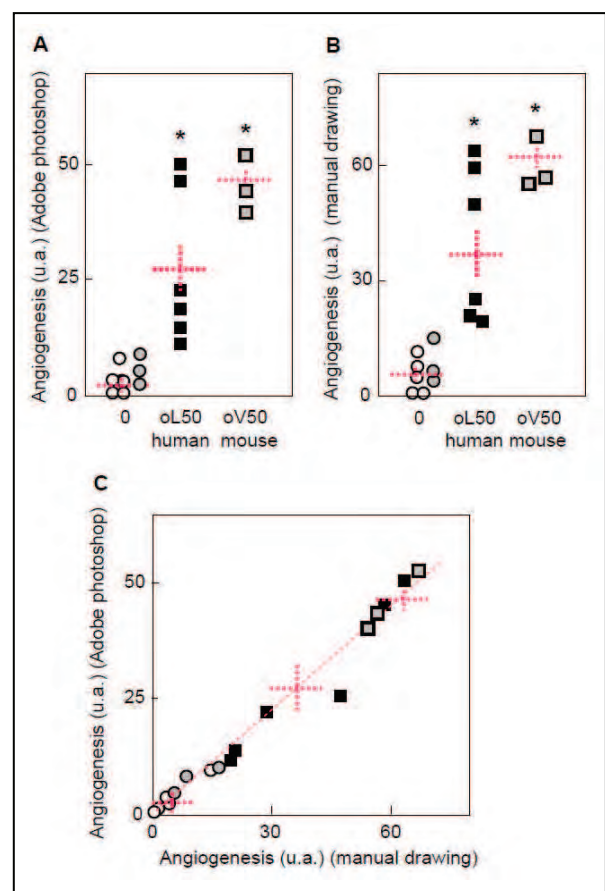
La quantification de l'angiogenèse des plugs a été faite par plusieurs méthodes.

- quantification des microvaisseaux colorés par l'hémoglobine qu'ils contiennent et visibles sur des photos des 'plugs' agrandies 20 fois. La quantification a été faite par deux méthodes utilisant l'analyse d'image de la coloration rouge par le logiciel Adobe Photoshop, i/ quantification de la surface occupée par les vaisseaux colorés en rouge par analyse d'image directement sur la photo par Adobe Photoshop, ii/ quantification par analyse d'image du tracé manuel de vaisseaux sur la photo par power point suivi de l'intégration Adobe Photoshop. Les deux méthodes donnent des résultats très bien corrélés.



**Figure I. Les LDL humaines stimulent l'angiogenèse *in vivo* dans des plugs de Matrigel.**

A,B. Angiogenèse dans des plugs de Matrigel. Des souris C57/BL6 ont reçu des injections sous cutanées de 0.4 ml de Matrigel contenant pour un flanc du PBS, et pour l'autre flanc des LDL oxydées humaines. Les plugs sont retirés après 2 semaines et photographiés. Les photographies sont représentatives de plugs contenant du PBS (control) ou des LDLox (50 µg apoB/ml). L'angiogenèse est quantifiée par analyse de la couleur rouge liée à la présence de l'hémoglobine dans les vaisseaux sur l'image, à l'aide du logiciel Adobe photoshop (images en haut à droite pour A et B), ou par dessin manuel des vaisseaux visualisés suivi d'une analyse d'image (image du bas à droite pour A et B).



**Figure II. Comparaison des deux méthodes de quantification de l'angiogenèse sur les photographies.**

A and B, Quantification de l'angiogenèse dans les plugs de Matrigel, obtenue par analyse de la couleur rouge liée à la présence d'hémoglobine contenue dans les vaisseaux sur l'image, avec Adobe photoshop (A), et par dessin manuel sur les vaisseaux visualisés, quantifiés par analyse d'image (B).

(C) Comparaison des données des deux méthodes.

- Marquage fluorescent des micro-vaisseaux au FITC-Dextran.

100µl de Fluorescéine isothiocyanate-dextran (PM 2 000 000) (Sigma-Aldrich) dilué à 2,5 mg/ml dans du PBS sont injectées dans la veine de la queue les souris, 10 minutes avant leur sacrifice. Les plugs de Matrigel sont retirés et photographiés immédiatement puis observés sous microscope à fluorescence (exc.496/em.516) afin de visualiser la vascularisation du Matrigel.

Par ailleurs, une partie des plugs a été dissoute après incubation dans de la Dispase (5000 unités Caséinolytiques, BD Biosciences) toute la nuit à 37°C. La solution a été ensuite récupérée dans des épandorfs et centrifugée 10 minutes à 13 000 r.p.m. La fluorescence du surnageant qui contient le FITC, a été mesurée au fluorimètre (ex.480nm/em.520nm) (Guedez, Rivera et al. 2003; Chander, Foster et al. 2007).

- Quantification de l'hémoglobine contenue dans le plug.

Une partie du surnageant récupéré après incubation des plugs dans la Dispase et centrifugation, a ensuite été ajoutée à une quantité équivalente de réactif de Drabkin (Sigma) afin de réaliser une quantification colorimétrique de l'hémoglobine au spectrophotomètre à 540 nm, selon le protocole du fabricant. Le contrôle est défini à 100% de fluorescence ou d'hémoglobine, et le pourcentage de changement de fluorescence ou d'hémoglobine par rapport au contrôle est calculé pour chaque échantillon. (Chabot, Jabrane-Ferrat et al. 2011)

## **7. Immunohistochimie et immunofluorescence**

- Immuno-marquage de CD-31 des micro-vaisseaux des 'plugs'

Les plugs non dissouts dans la Dispase sont congelés puis coupés au cryostat en fines sections de 7 µm d'épaisseur immédiatement fixées dans l'acétone. Les coupes sont incubées avec un anticorps monoclonal de rat anti-CD31 murin (BD Pharmingen), puis avec un anticorps fluorescent anti-IgG de rat DyLight 549 Conjugated (Rockland-Tebu-bio). Les images sont observées et photographiées par le logiciel Explora Nova Morpho Expert et quantifiées avec le logiciel Explora Nova Macro Writer par mesure de la surface totale de pixels rouges fluorescents. La surface de pixels est comptée dans différentes zones de la coupe pour chaque condition et une moyenne est déterminée. La condition contrôle pour chaque souris est définie à 100% par comparaison avec le plug controlatéral contenant les LDL natives ou oxydées. De la même manière quand l'animal a reçu l'anticorps bloquant ou un inhibiteur par voie systémique, le plug contenant l'agent inhibiteur seul (et pas de LDL oxydées) est utilisé comme le contrôle par comparaison au plug controlatéral pour chaque animal.

## **8. Dosage de l'activité sphingomyélinase**

Après une stimulation des cellules par des LDLox en présence ou non de divers inhibiteurs, l'activité de la sphingomyélinase neutre de type 2 (nSMase2) est évaluée selon la méthode de Augé (Auge, Escargueil-Blanc et al. 1998)

Les cellules sont lavées dans du PBS à 4°C, puis récupérées dans un tampon contenant 20 mM d'Hepes à pH 7,4, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 mM d'EDTA, 10 mM de βglycérophosphate, 0,1% de Triton X-100, 0,1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,1 mM de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 5 mM de DTT, 750 µM d'ATP, 1 mM de

PMSF, 10  $\mu$ M de leupeptine et 10  $\mu$ M de pepstatine. Pour l'essai enzymatique, 100  $\mu$ L d'homogénat cellulaire soniqué sont mis en présence de 100  $\mu$ L de substrat. La solution de substrat contient la sphingomyéline radiomarquée (100 000 dpm par essai) dans 20 mM d'Hepes pH 7,4, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> et 0,1% Triton X-100. La réaction est arrêtée par 300  $\mu$ L d'H<sub>2</sub>O et 2,5 mL de chloroforme/méthanol 2/1. Après agitation et centrifugation, la radioactivité de la phase supérieure contenant la [methyl-<sup>14</sup>C] choline est mesurée par scintillation. Les comptages sont rapportés à la quantité de protéines après déduction du blanc (100  $\mu$ L de substrat + 100  $\mu$ L de tampon de réaction) et exprimés en pourcentage du témoin.

## **9. Dosage de l'activité sphingosine kinase**

La sphingosine kinase 1 est dosée selon la méthode de Augé (Auge, Nikolova-Karakashian et al. 1999) dérivée de celle de Olivera et Spiegel (Olivera and Spiegel 1993). Après une stimulation des cellules par des LDLox en présence ou non de divers inhibiteurs, les cellules sont lavées, récupérées dans du PBS à 4°C puis centrifugées. Les culots cellulaires sont repris dans un tampon à pH 7,2 contenant 20 mM de Tris, 20% de glycérol, 1 mM de  $\beta$ -mercaptoethanol, 1 mM d'EDTA, 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 15 mM de NaF, 10  $\mu$ g/mL de leupeptine, 10  $\mu$ g/mL d'aprotinine, 1 mM PMSF, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate puis soniquées. 180  $\mu$ L de chaque échantillon contenant 200  $\mu$ g de protéines sont placés avec 10  $\mu$ L de Triton X-100 à 5% contenant 1 mM de Sphingosine et 10  $\mu$ L d'ATP à 20 mM et 200 mM de MgCl<sub>2</sub> ainsi que 1  $\mu$ Ci d'ATP [<sup>33</sup>P] (Perkin-Elmer). Après une incubation de 30 min à 37°C, 20  $\mu$ L HCl 1N sont ajoutés aux 200  $\mu$ L afin de stopper la réaction enzymatique. La S1P radiomarquée (contenue dans la phase inférieure) est extraite avec un mélange de chloroforme/méthanol/HCl 100/200/1 et de Chloroforme/KCl 2N vol/vol puis isolée par chromatographie sur couche mince (solution de migration contenant un mélange butanol/méthanol/acide acétique/eau 80/20/10/20). La révélation s'effectue par autoradiographie puis le dosage de S1P radiomarquée est fait par comptage en scintillation liquide.

## **10. Dosage des protéines**

Le dosage protéique est réalisé à l'aide du réactif de Bradford (Bio-Rad Laboratories GmbH, Marnes-la-Coquette, France). La concentration protéique des échantillons est déterminée à partir d'une gamme de BSA à concentration connue. La quantification se fait par spectrophotométrie à 595 nm.

## **11. Transfection**

Les HMEC-1 sont transfectées avec des siRNA ON-TARGET plus SMART pool dirigés contre SK-1 (L-004172), S1P1 (L-003655), S1P2 (003952), S1P3 (L-005208) provenant de Dharmacon (Waltham, MA), ainsi qu'avec un esiRNA EGFP (EHUEGFP-20UG) utilisé comme siRNA irrelevant provenant Sigma-Aldrich. Ils sont préparés avec le réactif HiPerfect (Qiagen, Courtaboeuf, France) dans le l'OptiMEM (Invitrogen Life Technologies) de façon à être à 100 nM au final. Au bout de 6h, du MCDB supplémenté avec 10% SVF est ajouté. Les siRNA sont incubés pendant 24, 48 ou 72 h pour tester leur efficacité par RT-PCR quantitative.

## **12. RT-PCR quantitative**

Les cellules sont récupérées à l'aide d'un scraper dans 1 mL de milieu de culture puis centrifugées à 4°C. Les culots cellulaires sont mis en contact avec le réactif TRIzol (Life Technologies) pour extraire les ARN. 1 µg d'ARN est utilisé pour réaliser une reverse transcription avec l'aide d'un kit (high-capacity cDNA reverse transcription, Life Technologies). Le Fast SYBR green master mix et le système ABI StepOne+ real time PCR (Life Technologies) sont utilisés pour quantifier les ARNm de SK1, S1P1, S1P2, S1P3, VEGF-A et TBP dans les HMEC-1. Les primers utilisés sont les suivants : VEGF forward TGAACCTTTCTGCTGTCTTGG reverse ACCACTTCGTGATGATTCTG, S1PR1 (EDG-1) forward ACTATATCCTCTTCTGCACCA reverse CTGACCAAGGAGTAGATTCTG, S1PR2 (EDG-5) forward CCATCTTCTCCATCATCCTG reverse AGTAGTGGGCTTTGTAGAGG, S1PR3 (EDG-3) forward CCACTCTTCATCCTCTTCCT reverse CAACACGATGAACCACTGAG, SK1 forward CCCTACTTGGTATATGTGCC reverse CTCGCTAACCATCAATTCCC, TBP forward CCGCCGGCTGTTAACTTC reverse ACGCCAAGAAACAGTGATGCT. Les conditions d'incubation sont 95°C pendant 20 s, suivi de 40 cycles de 3 s à 95°C, annealing/extension pendant 30 s à 60°C. Chaque échantillon est fait en duplicate et les données sont analysées à l'aide du logiciel StepOne+ v2.2.2. L'expression des ARNm d'intérêt est normalisée par rapport à celle de l'ARNm de TBP avec la méthode  $2\Delta\Delta CT$ .

## **13. Dosage de la sphingosine-1-phosphate**

Le dosage de la sphingosine-1-phosphate dans les HMEC-1 a été réalisé avec un kit Elisa S1P (Echelon Bioscience, Salt Lake City, UT), selon le protocole du fabricant. Les cellules sont stimulées pendant 2h30 avec des concentrations angiogéniques de LDL oxydées, puis lavées et récupérées dans du PBS à 4°C, et lysées par sonication dans un tampon de lyse contenant 20 mM de PIPES, 150 mM de NaCl, 1 mM de EGTA, 1% de Triton X100, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1% de SDS, 1 mM d'orthovanadate, 15 mM de NaF, 10 µg/ml de leupeptin, 10 µg/ml d'aprotinin, 1 mM de PMSF. L'homogénat cellulaire (500 µg de protéines) est dilué (v/v) dans du plasma délipidé, incubé avec un anticorps monoclonal anti-S1P, et le mélange est utilisé pour le dosage de la S1P avec le kit Elisa qui utilise de la S1P standard (méthode compétitive).

## **14. Dosage du VEGF**

Le dosage du VEGF dans le milieu de culture des HMEC-1 a été réalisé avec un kit Elisa VEGF humain (Signosis). Les cellules sont stimulées par des LDL oxydées à 20 et 50 µg/ml pendant 18h (même conditions que pour obtenir une tubulogénèse sur Matrigel), puis le surnageant est récupéré et concentré dans des tubes concentrateurs (Viva Spin 2, membrane 10 000 MW CO CTA, de Sartorius Biolab Products) et utilisés pour dosage du VEGF selon le protocole du fabricant.

## **15. Western blot**

Les cellules sont lavées dans du PBS à 4°C puis récupérées dans un tampon de phosphorylation contenant 1 mM de NaVO<sub>4</sub>, 2 µg/ml de leupeptine, 1 mM de PMSF, 10 µg/ml d'Aprotinine dilués dans du PBS. Après centrifugation douce, le culot cellulaire est repris dans un tampon d'extraction

protéique à pH 7,4 contenant 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% glycérol, 0.5% de DOC, 1% Triton X-100, 1 mM de NaVO<sub>4</sub>, 10 mM de β-glycerophosphate, 5 mM de NaF, 2 µg/mL de leupeptine, 2 µg/mL de pepstatine, 1 mM de PMSF et 10 µg/mL d'aprotinine durant 30 min à 4°C. Après centrifugation, un dosage protéique est réalisé et 50 µg de protéine de chaque échantillon sont repris dans un tampon de dénaturation contenant 62,5 mM de Tris-HCl à pH 6.8, 2% de SDS, 10% de glycérol, 0,04% de bleu de Bromophénol et 4% de β-mercaptoéthanol) puis chauffés 5 min à 95°C. Les échantillons sont déposés sur un gel à 10% de polyacrylamide. Après migration entre 15 et 30 mA par gel pendant 90 min, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose pendant 2h à 220 mA. La membrane est saturée pendant 2h avec une solution de PBS contenant 5% de BSA ou de lait. L'anticorps primaire, dilué généralement au 1/1000 est incubé toute la nuit à 4°C avec la membrane. Après 6 lavages de 10 min, l'anticorps secondaire couplé à HRP est dilué au 1/5000 et incubé avec la membrane pendant 1h à température ambiante. Après 6 lavages de 10 min, la révélation s'effectue par chimioluminescence avec de l'ECL (Amersham, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : anticorps monoclonal Phospho-p38MAPK (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling), anticorps monoclonal anti-VEGF (Santa Cruz), anticorps anti-phospho-connexine 43 (Ser368) et l'anticorps anti-connexine 43 (C-terminus cytosolic) (Millipore), anticorps anti- β-actine (Sigma-Aldrich). Les anticorps secondaires utilisés sont des anticorps dirigés contre des Ig de souris ou de lapin couplés à HRP (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Allemagne).

## **16. Evaluation de la toxicité**

### **16.1. MTT**

La toxicité des LDLox est testée afin de déterminer les concentrations anti-angiogéniques non encore toxiques de ces lipoprotéines. Ce test est réalisé après 48 h d'incubation avec les LDLox à différentes concentrations. Durant les 30 dernières min, du MTT (bromure de 3- [4, 5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium) (Sigma) est ajouté dans le milieu de culture à une concentration finale de 0,5 mg/mL. Le MTT (jaune et soluble) va être réduit en formazan (bleu et insoluble) par les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules vivantes. Le milieu est ensuite éliminé et les cristaux sont dissous dans 800 µL de DMSO. La lecture se fait par spectrophotométrie à 560 nm (Denizot and Lang 1986).

### **16.2. Syto13/IP**

Le test de Syto13/IP est basé sur la différence de perméabilité des membranes cellulaires à deux sondes fluorescentes s'intercalant dans l'ADN. Le Syto13, une sonde de couleur verte traversant spontanément les membranes cellulaires et l'iodure de propidium, de couleur rouge et non perméant, ne rentrant dans les cellules que si la membrane est perforée. La morphologie nucléaire (noyaux fluorescents) permet également de discriminer les cellules vivantes de celles en apoptose, nécrose post-apoptotique ou nécrose primaire (Sanson, Ingueneau et al. 2008).

La toxicité des LDLox est recherchée pour différentes concentrations. Ce test est réalisé après 48 h d'incubation avec les LDLox à 20, 50, 100 et 200 µg/ml. Les cellules sont colorées par incubation avec les sondes intercalantes pendant 15 minutes, le Syto13 (0.6 mM, permeant green-colored



intercalating probe, Invitrogen) et l'iodure de propidium (PI, à 15 mM, a non permeant red intercalating probe, Sigma), puis observées en microscopie à fluorescence (microscope fluorescent inversé Fluovert FU, Leitz). Les cellules vivantes, apoptotiques et nécrotiques sont caractérisées sur la base de leur morphologie nucléaire. Les cellules normales vivantes ont un noyau vert fluorescent et rond. Les cellules apoptotiques présentent un noyau vert/jaune pycnotique ou fragmenté, témoignant de la condensation apoptotique de la chromatine. La couleur verte indique que la membrane plasmique ainsi que la membrane nucléaire ne sont pas perméabilisées. A l'inverse les cellules en nécrose post-apoptotique présentent les mêmes caractéristiques nucléaires (noyau condensé et fragmenté) mais sont colorées en rouge suite à la pénétration de l'iodure de propidium dans le noyau consécutivement à la perméabilisation des fragments de membrane lors de la formation des corps apoptotiques. Les cellules en nécrose primaire présentent des noyaux colorés en rouge mais une chromatine lâche.

### **16.3. TUNEL**

Le TUNEL est une méthode utilisée pour détecter les fragmentations d'ADN retrouvées dans les cellules en apoptose. Cette analyse est réalisée avec le kit ApopTag<sup>®</sup> Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit, de Chemicon/Millipore France. Les cassures dans l'ADN des cellules apoptotiques sont mises en évidence par une désoxynucléotidyl transférase terminale, ou TdT, qui ajoute du dUTP couplé avec de la digoxigénine, à l'extrémité des fragments d'ADN. Un anticorps anti-digoxigénine couplé à une peroxydase génère un marquage localisé au niveau du noyau des cellules apoptotiques.

Les cellules sontensemencées sur des plaques 6 puits (Falcon<sup>®</sup>), stimulées avec les LDLox à 50 et 200 µg/ml pendant 48 h, puis lavées 3 fois au PBS et fixées dans une solution de paraformaldéhyde 3%. Les peroxidases endogènes sont inactivées par du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 2%) et la procédure du TUNEL est réalisée selon le protocole du fournisseur.

### **17. Dosage intracellulaire de ROS**

Le dosage intracellulaire d'espèce réactives de l'oxygène (ERO) est déterminé grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente carboxy- H<sub>2</sub>DCFDA diacetoxy-méthyl-ester (H<sub>2</sub>DCFDA-AM) (Molecular Probes), selon un protocole précédemment décrit par notre équipe (Negre-Salvayre, Auge et al. 2002).

### **18. Statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne +/- SEM. L'estimation de la significativité statistique est réalisée avec le test de Student (pour la comparaison de deux groupes) ou avec le test ANOVA one-way (étude de l'effet d'un facteur sur plusieurs groupes), à l'aide du logiciel SigmaStat 3.5, et du logiciel Systat. Les résultats pour lesquels  $p < 0,05$  sont considérés comme statistiquement significatifs.



## **RESULTATS EXPERIMENTAUX**



## **1. La voie de signalisation sphingosine-1-phosphate (S1P), sphingosine kinase-1 (SphK1) et récepteurs de S1P (S1PR) est impliquée dans l'effet angiogénique des LDL oxydées.**

### **1.1. Rôle de la sphingosine-1-phosphate (S1P) et de la sphingosine kinase-1 (SphK1) dans l'effet angiogénique des LDL oxydées.**

La S1P participe aux processus physiologique et pathologique de l'angiogenèse, à la survie de l'endothélium et stimule la migration et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que le recrutement des leucocytes. Elle peut aussi réguler le tonus vasculaire (Lee, Thangada et al. 1999; Hla 2003; Spiegel and Milstien 2003; Daum, Grabski et al. 2009; Lucke and Levkau 2010). L'activité biologique de la S1P est médiée par une famille de récepteurs spécifiques qui appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, les récepteurs S1P1 à S1P5. Au niveau des cellules de la paroi vasculaire, seuls les récepteurs S1P1, S1P2 et S1P3 sont exprimés et médient l'effet angiogénique de S1P (Hla 2003; Means and Brown 2009; Lucke and Levkau 2010).

Les LDLox jouent un rôle majeur dans l'athérogenèse et pourraient être impliquées dans le développement des vasa vasorum en regard de l'hyperplasie intimale des plaques, favorisant le développement des plaques et les complications comme les hémorragies intra-plaque et la rupture. A faible dose, les LDLox induisent la formation de « tubes » capillaires *in vitro*, et cet effet angiogénique, est médié par les mécanismes impliquant le stress oxydant, notamment le récepteur LOX-1 (Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1), p38 MAPK (Dandapat, Hu et al. 2007), et la voie PI3k/Akt (Yu, Wong et al. 2011). De plus il a été précédemment montré dans l'équipe, que les LDL oxydées activent la sphingosine kinase-1 (SK1) et la génération de S1P dans des cellules musculaires lisses en cultures, avec en réponse une activation du signal mitogène dans ces cellules (Auge, Nikolova-Karakashian et al. 1999; Auge, Maupas-Schwalm et al. 2004).

Le mécanisme angiogénique des LDLox est encore partiellement compris, et l'implication de la sphingosine-1-phosphate (S1P), un second messenger de la voie des sphingolipides, bien connu pour ses propriétés angiogéniques, n'a encore jamais été rapporté dans l'angiogenèse induite par les LDLox.

L'objectif de cette première partie a été de mettre en évidence le lien entre l'effet angiogénique de faibles doses de LDL oxydées et la génération de S1P à la fois *in vitro* sur des cellules endothéliales microvasculaires humaines HMEC-1, et *in vivo* dans des plugs de Matrigel™ chez des souris C57BL/6, à l'aide d'un anticorps anti-S1P bloquant qui prévient efficacement l'angiogenèse induite par les LDL oxydées à la fois *in vitro* et *in vivo*. Dans le modèle des cellules HMEC-1, S1P est générée par SK1 comme le montre l'activation de SK1 par les LDL oxydées et l'inhibition concomitante de SK1 et de la tubulogenèse par des inhibiteurs de SK1. Enfin, l'efficacité des antioxydants dans la prévention de cette angiogenèse suggère que le stress oxydant est impliqué dans les mécanismes d'activation de la SK1.

**Article soumis à BJP**

**Oxidized LDL-induced angiogenesis involves sphingosine-1-phosphate. Prevention by anti-S1P antibody.**

Caroline Camaré<sup>1,2</sup>, Magali Trayssac<sup>1,2</sup>, Barbara Garmy-Susini<sup>1,3</sup>, Elodie Mucher<sup>1,2</sup>, Roger Sabbadini<sup>4</sup>, Robert Salvayre<sup>1,2</sup>, Anne Negre-Salvayre<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Inserm UMR-1048, Toulouse, France

<sup>2</sup> University of Toulouse, France

<sup>3</sup> Inserm UMR-1037, Toulouse, France

<sup>4</sup> Lpath, San Diego, CA

**Running title:** Anti-S1P mAb inhibits oxLDL-induced angiogenesis

**Corresponding author:** Anne Negre-Salvayre

**Mailing Address :** INSERM-UMR1048

BP84225 - 31432 Toulouse Cedex 4 - France.

**Tel.** (33) 561-32-31-48 - **Fax** (33) 561-32-29-53

**e-mail:** [anne.negre-salvayre@inserm.fr](mailto:anne.negre-salvayre@inserm.fr)

**Number of words:** 4924

**Abstract**

*Background and purpose:* Neovascularization occurring in atherosclerotic lesions may promote plaque expansion, intraplaque haemorrhage and rupture. Oxidized LDL (oxLDL) are atherogenic, but their angiogenic vs anti-angiogenic effect is controversial. The angiogenic mechanism evoked by oxLDL is partly understood, but the role of sphingosine-1-phosphate (S1P), a well-known angiogenic sphingolipid mediator has never been reported. We aimed at investigating the role of S1P in oxLDL-induced angiogenesis and the efficacy of an anti-S1P monoclonal antibody to prevent this effect.

*Experimental approach:* Angiogenesis was assessed by capillary tube formation by Human Microvascular Endothelial Cells (HMEC-1) on Matrigel and by the Matrigel plug assay in mice.

*Key results:* Human oxLDL exhibited a biphasic effect, low concentrations being angiogenic, higher concentrations being cytotoxic. OxLDL-induced angiogenic response was blocked by the sphingosine kinase (SphK) inhibitor dimethylsphingosine, by siRNA-induced silencing of SphK1 and by anti-S1P monoclonal antibody. Moreover, inhibition of oxLDL uptake and subsequent redox signaling, by anti-CD36 and anti-LOX-1 receptor antibodies and by N-acetylcysteine, respectively, blocked SphK1 activation and tube formation. *In vivo* angiogenesis was induced by low concentration of human oxLDL or murine oxVLDL in the Matrigel plug assay in C57BL/6 mice. This *in vivo* oxLDL-induced angiogenesis was prevented by intraperitoneal injection of the anti-S1P antibody.

*Conclusion and Implications:* These data emphasize the role of S1P in angiogenesis induced by oxLDL both in HMEC-1 cultured on Matrigel and *in vivo* in the Matrigel plug model in mice, and the efficacy of the anti-S1P antibody in blocking the angiogenic effect of oxLDL.

**Keywords:** Oxidized LDL, angiogenesis, neovascularization, sphingosine-1-phosphate

## Introduction

Angiogenesis is a physiological process required for embryonic vascular development, which is also involved in wound healing and pathophysiological processes of diseases such as diabetic retinopathy, cancer, and atherosclerosis (Carmeliet and Jain 2011). In the normal arterial wall, the *vasa vasorum* constitute a microvascular network in the adventitia. While no capillaries are found in the intima and the media of normal arteries, neovascularization is seen in the intima of human atherosclerotic lesions (Kolodgie *et al*, 2003; Moreno *et al*, 2006). These neocapillaries are fragile and prone to intraplaque haemorrhage, and could promote plaque destabilization and rupture, and lead finally to athero-thrombotic events (Khurana *et al*, 2005; Moreno *et al*, 2006; Michel *et al*, 2011). Hypoxia, ischemia and oxidative stress, which are common events in atherosclerosis, play a key-role in angiogenesis by activating hypoxia-inducible transcription factors that induce the expression of angiogenic factors (Ushio-Fukai and Alexander 2004). Many factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), ephrin, angiopoietin, and lipid mediators, including sphingosine-1-phosphate (S1P), lysophosphatidic acid or prostaglandins, stimulate endothelial cell migration, proliferation and angiogenesis (Carmeliet and Jain 2011; Shibuya 2008; Spiegel and Milstien 2003).

Sphingolipid mediators, such as ceramide (Cer) and S1P, are bioactive second messengers with opposing biological properties. For instance, ceramide is proapoptotic, while S1P is involved in survival and cell proliferation (Hannun and Obeid, 2008).

Ceramide, generated by *de novo* biosynthesis or by sphingomyelin hydrolysis by sphingomyelinases, is degraded by ceramidases into sphingosine, which is phosphorylated into S1P by sphingosine kinases 1 and 2 (SphK1, SphK2) (Hannun and Obeid, 2008). S1P is involved in embryonic development, and participates in physiological and pathological vascular biology by regulating endothelial integrity, migration and proliferation, angiogenesis, vascular tone, and leukocyte recruitment (Spiegel and Milstien 2003; Hla, 2003; Daum *et al*. 2009; Pitson, 2011). S1P, which acts as an extracellular auto/paracrine mediator, through G-protein-coupled receptors S1P1-S1P5 (Hla, 2003) and as an intracellular mediator (Spiegel and Milstien 2003), is considered a promising therapeutic target in various diseases, such as cancer, cardiovascular diseases and pathologic angiogenesis, inflammatory and immune diseases (Pyne and Pyne 2011).

Oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) are thought to play a role in atherogenesis (Witztum and Steinberg, 1991; Tsimikas and Miller, 2011). Moderate oxLDL concentration triggers cell migration, proliferation and inflammatory signaling, whereas higher concentration is toxic and apoptotic (Witztum and Steinberg, 1991; Salvayre *et al*, 2002). OxLDL and oxidized phospholipids have been shown to be angiogenic (Bochkov *et al*, 2006; Dandapat *et al*, 2007; Yu *et al*. 2011), but also anti-angiogenic by inhibiting endothelial cell growth and endothelial progenitor cell differentiation (Murugesan *et al*, 1993; Chen *et al*, 2000). The angiogenic effect of low oxLDL concentration is mediated by LOX-1 receptor, oxidative stress, p38MAPK (Dandapat *et al*, 2007) and by the PI3 kinase/Akt pathway (Yu *et al*. 2011). As we previously reported that activation of SphK by oxLDL and resulting S1P generation is implicated in the mitogenic response of smooth muscle cells (SMCs) to oxLDL (Auge *et al*. 1999), this led us to investigate whether the

SphK/S1P pathway plays a role in oxLDL-induced angiogenesis. We report that oxLDL-induced capillary tube formation by HMEC-1 and *in vivo* oxLDL-induced angiogenesis in the murine Matrigel plug model, require extracellular S1P and that these events are effectively prevented *in vitro* and *in vivo*, by the anti-S1P mAb and by SphK1 inhibitors.

## Methods

### ***Lipoprotein preparation and lipid oxidation content determination.***

LDL were prepared from human pooled sera by ultracentrifugation, dialyzed, sterilized and mildly oxidized by UV-C irradiation, as reported (Escargueil-Blanc *et al*, 2001). OxLDL contained 63-97 nmol lipid hydroperoxide/mg apoB, 5.6-8.3 nmol TBARS/mg apoB, and 8-11 nmol 4-HNE/mg apoB (OxiSelect™ HNE-His-adduct Elisa kit, Cell Biolabs-Euromedex). ApoB was determined by immunonephelometry. Murine VLDL were prepared by ultracentrifugation from plasma of hypercholesteromic apoE<sup>-/-</sup> mice (Plump *et al*. 1992) and were dialyzed and oxidized as human LDL. LPS concentration, evaluated using the ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (Genscript, Piscataway, NJ), was in the range 0.03-0.06 EU/mg apoB, both in native and oxidized LDL.

### ***Cell culture.***

Human Microvascular Endothelial Cell-1 (HMEC-1) (Dr. Candal, CDC, Atlanta) (Ades *et al*, 1992) were grown in MCDB-131 containing fetal calf serum (FCS, 10%), glutamine (40 µmol/L) and antibiotics (100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin). Cells were starved for 24h in serum-poor medium (0.1% FCS), which prevents deprivation-induced apoptosis, without inducing angiogenesis and without competition with oxLDL.

### ***Capillary tube formation.***

For capillary tube formation, HMEC-1 were seeded (30,000 cells/well) on 24-well plates coated with Matrigel® and incubated with or without native or oxLDL, and inhibitors. Cells were then incubated with Calcein-AM (1 µM for 30 minutes), and observed by fluorescence microscopy (exc.496/em.516 respectively) and photographed. The number of capillary tubes (linked cells) was counted and reported to the total cell number.

### ***Cell Migration***

Cell migration assay was performed using a Boyden chamber (Corning-Life Sciences). HMEC-1 (2x10<sup>5</sup> cells/well) in serum-poor (0.1% FCS) MCDB-131 medium were placed in the Transwell upper chamber and oxLDL and angiogenic inhibitors were placed in the lower chamber, below the cell-permeable membrane. After 12h incubation, migrated HMEC-1 were stained with crystal violet and photographed. Quantification was performed by counting migratory cells on images and measurement of crystal violet coloration by spectrophotometry (OD at 570 nm) after cell dissolution in acetic acid.

### ***Enzyme assays.***

SphK1 activity was determined under the previously used conditions (Auge *et al*, 1999) derived from Olivera and Spiegel (1993). Briefly, cells lysed in ice-cold lysis buffer and after incubation, the <sup>33</sup>P-labeled-S1P was extracted, isolated by TLC and counted by liquid



scintillation. (Supporting information Methods). Protein concentration was determined using the Bradford reagent (Biorad).

#### ***Sphingosine-1-phosphate determination.***

S1P was determined in HMEC-1 using the S1P ELISA kit (Echelon Bioscience, Salt Lake City, UT). Cells were homogenized by sonication in lysis buffer containing 20 mM PIPES, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1% Triton X100, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% SDS, 1 mM orthovanadate, 15 mM NaF, 10 µg/ml leupeptin, 10 µg/ml aprotinin, 1 mM PMSF. Cell homogenate (500 µg protein) was diluted (v/v) with delipidated plasma, and the mixture was quantified with the ELISA kit, using S1P standard.

#### ***siRNA transfection***

HMEC-1 were transfected with human SphK1 (L-004172) or control (L-005361) ON-TARGETplus SMARTpool siRNA (100 nM final concentration) (Dharmacon, Waltham, MA) using OptiMEM (Invitrogen Life Technologies) and HiPerFect reagent according to the manufacturer's recommendations (Qiagen).

#### ***Quantitative RT-PCR analysis***

Total RNA extracted from harvested cells was used for Real-Time Quantitative PCR analysis to evaluate the expression of VEGF mRNAs in basal conditions and upon treatment of HMEC-1 with oxLDL or thapsigargin, as described (Oskolkova *et al*, 2008).

#### ***Evaluation of the cytotoxicity - MTT assay, Syto13/PI live-dead assay.***

The whole cytotoxicity was evaluated by the MTT assay (Sanson *et al*, 2008). The Syto13/PI live-dead assay is based on i/ the difference of permeability of cell membrane for two fluorescent DNA intercalating probes, Syto13 (0.6 µM), a permeant green-colored intercalating probe, entering all the cells, and propidium iodide (PI, 15 µM), a non-permeant red intercalating probe, entering permeabilized cells, ii/ the nuclear morphology (Sanson *et al*, 2008) .

#### ***Intracellular ROS evaluation.***

Intracellular reactive oxygen species (ROS) were determined using the fluorescent probe carboxy-H<sub>2</sub>DCFDA diacetoxymethyl-ester (H<sub>2</sub>DCFDA-AM) (Molecular Probes), under the previously described conditions (Negre-Salvayre *et al*. 2002).

#### ***Matrigel plug angiogenesis assays***

The Matrigel plug angiogenesis assay in mice was used to investigate the pro-angiogenic effect of oxLDLs *in vivo* and the effect of inhibitors (Passaniti *et al*, 1982). C57BL/6 mice (4-10 animals/group) were injected subcutaneously into the two flanks with 400 µl matrigel (BD) containing native LDL or oxLDLs, under anaesthesia by isoflurane inhaled. When indicated, mice were intraperitoneously injected with the anti-S1P or irrelevant mAbs (both at 50 mg/kg body weight, every 3 days). After 2 weeks, the animals were injected in vein tail with 100 µl FITC-Dextran (MW=2,000,000 from Sigma, 25 mg/ml in PBS), 10 min before mice sacrifice (intraperitoneal injection of 150 mg/kg ketamin and 10 mg/kg xylazine and cervical dislocation). The matrigel plugs were removed, photographed and

observed on fluorescence microscopy (exc.496/em.516, respectively). Angiogenesis was evaluated by image analysis (Adobe Photoshop software).

Experimental animal protocols were approved by the University and INSERM Institutional Committee for animal experiments (Protocol n° 13-1048-1017).

### ***Immunohistochemistry and immunofluorescence***

Fixed frozen cryo-sections (7 µm thick) of matrigel plugs were used for immunohistochemistry, either incubated with a rat anti-mouse CD31 monoclonal antibody (BD Pharmingen) and a fluorescent anti-rat IgG antibody DyLight-549 Conjugated (Rockland-Tebu-Bio) and stained with DAPI. Images were captured by Explora-Nova-Morpho-Expert software, and immunostaining was quantified with Explora-Nova-Macro-Writer software.

### ***Statistical analyses.***

Estimates of statistical significance were performed by *t*-test or analysis of variance (SigmaStat 3.5, Systat software). When test for normality and equal variance (Kolmogorov-Smirnov) passed, differences between means values were evaluated by unpaired *t* test (two groups) or by one-way ANOVA (several experimental groups) followed by multiple comparisons by the Holm-Sidak test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

### ***Chemicals.***

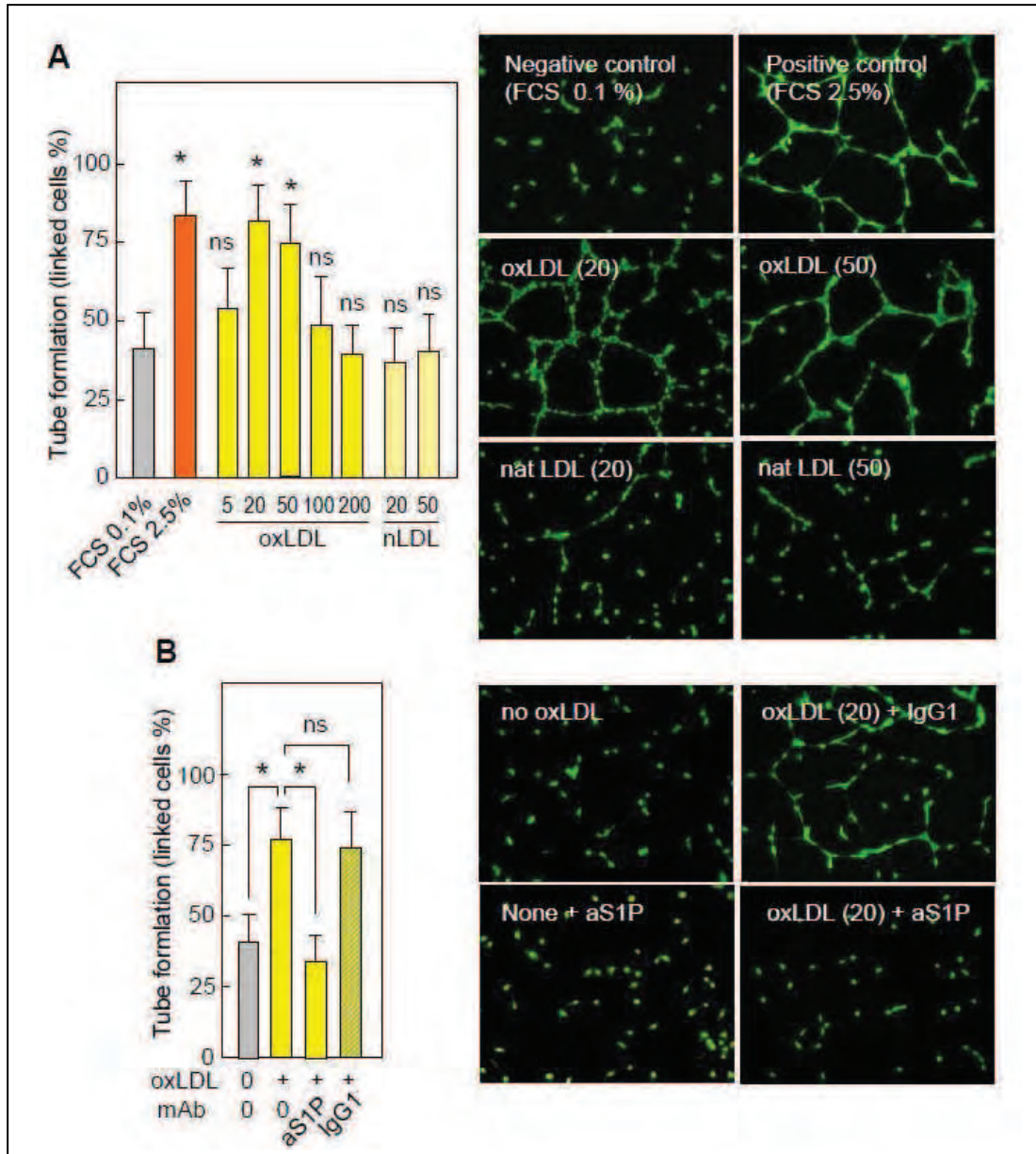
Matrigel was from BD Biosciences (Le-Pont-de-Claix, FR). Corning Transwell Polycarbonate Membrane 24-wells, calcein-AM and Fluorescein isothiocyanate-dextran (average MW 2,000,000), dimethylsphingosine (DMS), S1P, SU1498, propidium iodide, MTT, Crystal violet, Drabkin's Reagent were from Sigma-Aldrich. The rat anti-mouse CD31 mAb and Diaspase (5,000 Caseinolytic Units) were from BD Pharmingen. The fluorescent anti-rat IgG Ab DyLight549-Conjugated was from Rockland-Tebu-Bio. [<sup>33</sup>P]ATP was from Perkin-Elmer. Syto-13 green fluorescent and the ROS-sensitive probe H<sub>2</sub>DCFDA-acetoxymethylester were from Invitrogen. The anti-CD36-blocking antibody was from Abcam and the anti-LOX-1 antibody from RD Systems. The Human VEGF ELISA Kit was from Signosis. The anti-S1P monoclonal antibody (LT1002, Sphingomab®) and the isotype-matched control IgG1 (LT1017) were from Lpath (San Diego).

## **Results**

### ***Low oxLDL concentration elicits capillary tube formation and migration of HMEC-1. Inhibition by the anti-S1P mAb.***

We utilised HMEC-1, because of their microvascular origin, immortalization and stability over time, in contrast to primary endothelial cells (e.g. HUVEC), which come from multiple donors and exhibit limited life-span and, sometimes, phenotypic changes with the time of culture. In the HMEC-1 model system, oxLDL exhibited a dual (biphasic) effect, like in HCAEC (Dandapat *et al*, 2007), oxLDL being angiogenic at low concentration (10-50 µg apoB/ml), but not angiogenic at higher concentration (100 µg apoB/ml and above) (Fig.1) and even toxic at higher oxLDL concentration (Supporting information Fig.S1), like in other cell types (Salvyre *et al*, 2002). Differences in the optimal angiogenic concentration

results from differences in LDL oxidation levels, since we used mildly oxidized LDL whereas Dandapat *et al* (2007) utilized highly oxidized LDL. Moreover, the dual concentration-dependent effect of oxLDL may explain the apparently contradictory effect (angiogenic vs anti-angiogenic) of oxLDL (Murugesan *et al*, 1993; Chen *et al*, 2000; Yu *et al*, 2011).



**Figure 1. HMEC-1 capillary tube formation is stimulated by low oxLDL concentration and is inhibited by anti-S1P mAb.**

A. HMEC-1, seeded at 30,000 cells/well on Matrigel in 24 multiwell plates, were grown for 18 h at 37°C, in 500 µl MCDB-131 containing either 0.1% FCS (negative control) or 2.5 % FCS (positive control) and oxLDL or native LDL. Capillary tubes were stained by calcein (1 µM, 30 min), photographed (Nikon Coolpix 995 camera) under fluorescence microscope.

B. Effect of anti-S1P mAb Sphingomab (aS1P, 10 µg/ml) or inactive isotype-matched IgGκ1 mAb (IgG1, 10 µg/ml) on capillary tube formation induced by oxLDL (20 µg/ml).

In A and B, right panels, representative pictures of the experiments. Tube formation was expressed as % of linked to total cells. Mean ± SD of 4 separate experiments, \* p<0.05; ns, not significant.

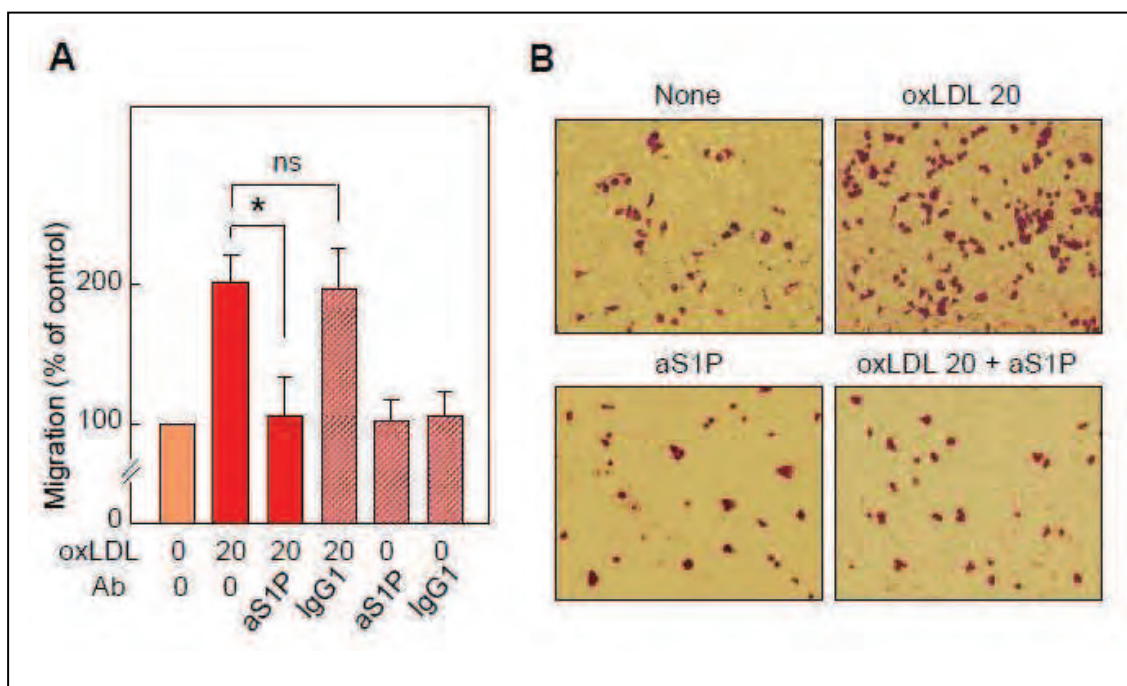
Several signalling pathways, such as ROS, p38MAPK, ERK1/2 and VEGF, mediate the angiogenic effect of oxLDL (Dandapat *et al*, 2007), but the role of S1P, a bioactive and

potentially angiogenic sphingolipid mediator (Spiegel and Milstien, 2003), has never been investigated in oxLDL-induced angiogenesis. HMEC-1 tube formation elicited by oxLDL was strongly inhibited by the anti-S1P mAb (Sphingomab®), whereas the non-specific isotype-matched IgG1κ mAb had no effect (Fig.1B). Under these conditions, the anti-S1P mAb was not toxic and did not potentiate the toxicity of angiogenic oxLDL concentrations (Supporting information Fig.S2).

As endothelial cell migration is required for angiogenesis, we investigated whether oxLDL also induced HMEC-1 migration through a S1P-dependent pathway. As expected, in the Boyden's chamber assay, oxLDL (20 µg/ml) stimulated HMEC-1 migration, which was efficiently inhibited by the anti-S1P mAb (Fig.2).

Interestingly, the addition of exogenous S1P elicited capillary tube formation by HMEC-1 (Fig.3A), which was completely inhibited by the anti-S1P mAb (Fig.3B,C).

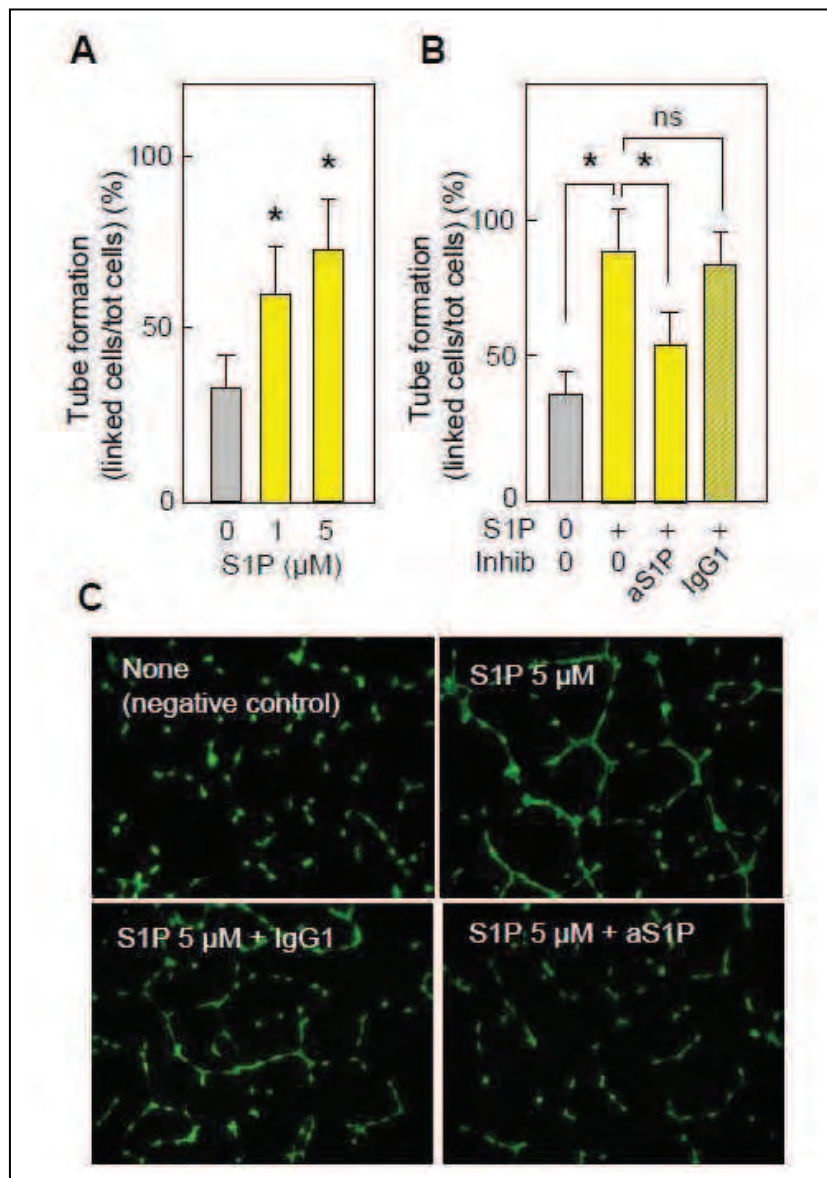
Altogether, these data suggest that extracellular S1P is required for the angiogenic effect of oxLDL, which can be effectively inhibited by the anti-S1P mAb.



**Figure 2. Migration of HMEC-1 induced by oxLDL and inhibition by anti-S1P mAb.**

A. Cell migration in Boyden chamber. HMEC-1 were seeded in the upper chamber of Transwell inserts (8 µm pore size Polycarbonate Membrane). OxLDL (20 µg/ml), anti-S1P mAb (aS1P, 10 µg/ml) or inactive IgG1 (10 µg/ml) were added to the lower chamber, and after migration for 12 h at 37°C, cells were fixed and stained with 0.5% crystal violet. Migratory cells were counted on microphotographies of Transwell inserts (data are expressed as % of the unstimulated control). Mean ± SD of 4 experiments, \* p < 0.05; ns, not significant. B. Representative microphotographies of Transwell inserts stained by crystal violet.

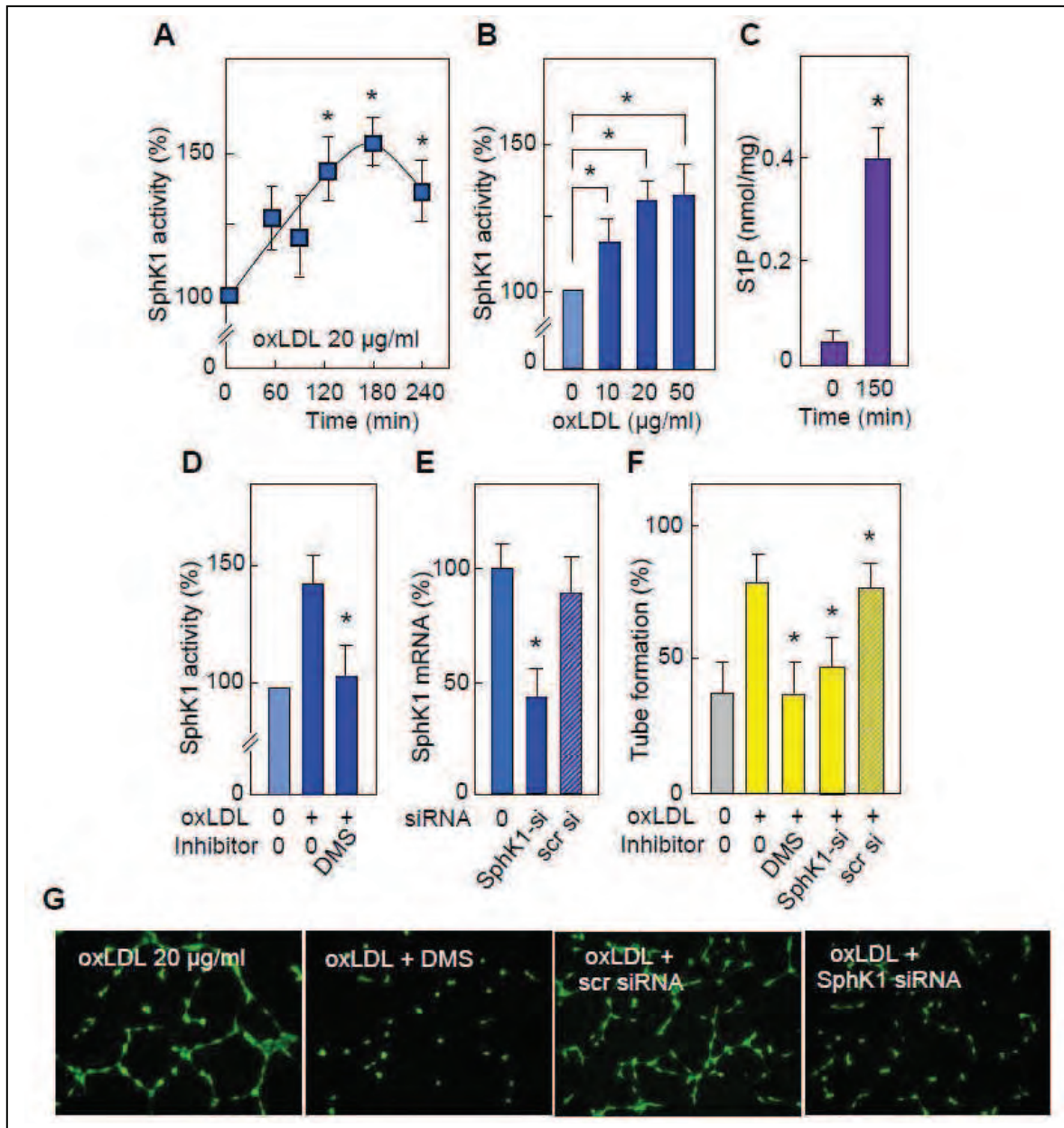




**Figure 3. Exogenous S1P stimulates capillary tube formation by HMEC-1 - Inhibition by anti-S1P mAb.** A,B. HMEC-1 were seeded on Matrigel in the presence or absence of exogenous S1P and anti-S1P mAb or irrelevant IgG1 mAb, and capillary tube formation was evaluated. In A, effect of increasing S1P concentration on capillary tube formation. In B, effect of anti-S1P or irrelevant mAbs on capillary tube formation by S1P (5 μM). Mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments, \*  $p < 0.05$ , ns, not significant. In C, representative pictures of the experiments.

### ***Sphingosine kinase-1/S1P is required for capillary tube formation elicited by oxLDL***

In our HMEC-1 system, LDL-associated S1P cannot explain the angiogenic effect of oxLDL, since native LDL are not angiogenic, under the used conditions, and since oxLDL contain lower level of S1P than native LDL (Kimura *at al*, 2001). Thus we investigated whether oxLDL triggered cellular S1P generation through SphK activation (Spiegel and Milstien, 2003). In HMEC-1 activated by oxLDL, SphK1 was activated in a time- and dose-dependent manner and S1P was concomitantly produced (Fig.4A-C). When SphK was inhibited by DMS, a classical SphK inhibitor, or was down-regulated by specific SphK1-siRNA, the HMEC-1 tube formation by oxLDL was blocked (Fig.4D-G), thus suggesting that SphK1 is required for oxLDL-induced angiogenesis.



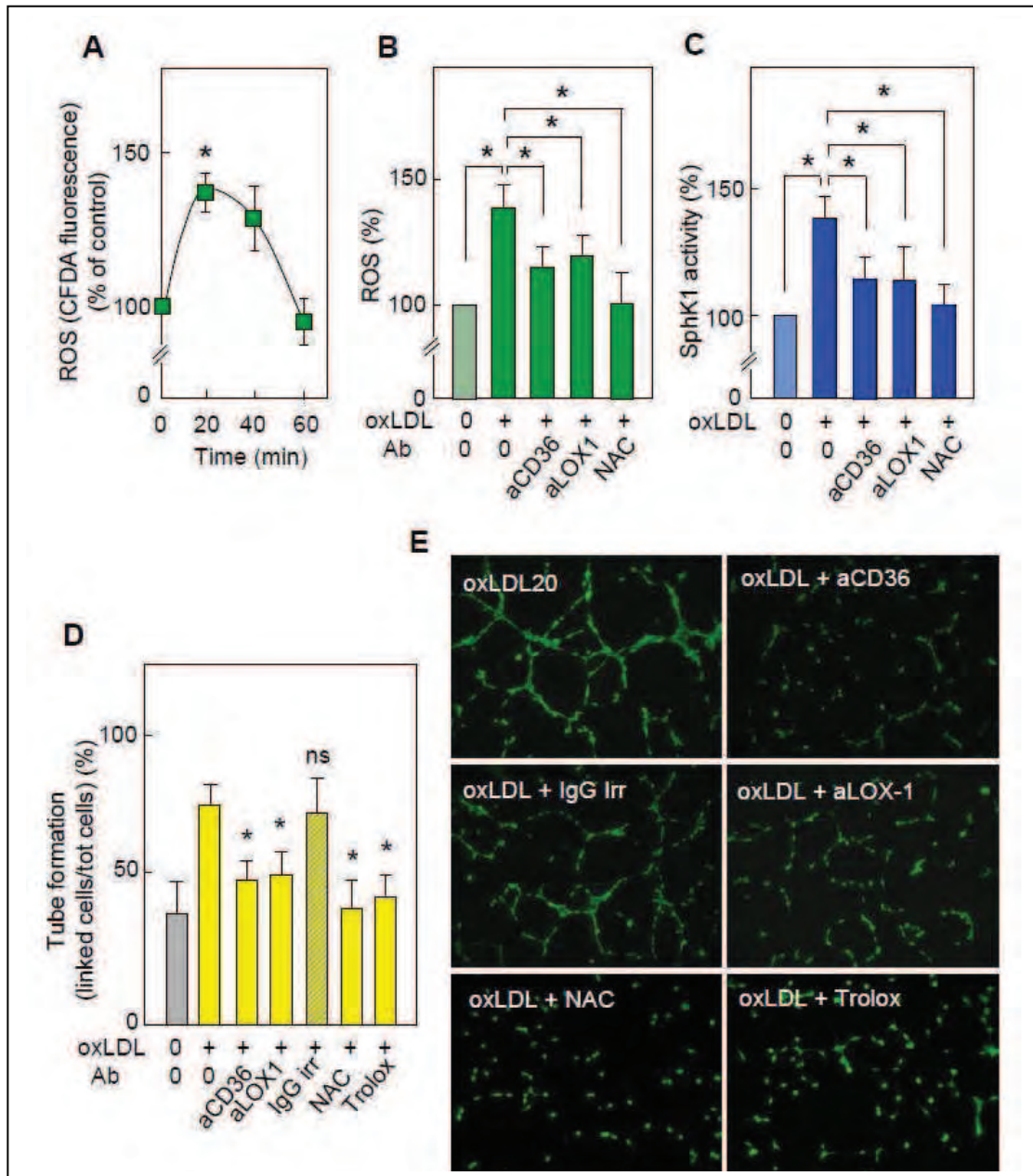
**Figure 4. Activation of the SphK1/S1P pathway by oxLDL and inhibition of oxLDL-induced formation of capillary tubes by DMS and SphK1-siRNA.**

A-B. OxLDL-induced SphK1 activation (expressed as percent of the unstimulated control). In A, time-course of SphK1 activation by oxLDL (20 μg/ml). In B, dose-response of oxLDL on SphK1 activation measured after 150 min incubation. In C, S1P content in HMEC-1 stimulated by oxLDL (20 μg/ml) for 150 min. D-E. Effect of DMS and siRNA specific to SphK1 or scrambled on SphK1 activation by oxLDL. Cells were preincubated with the SphK inhibitor DMS (1 μmol/l, 30 min) or SphK1 siRNA for 24h, then oxLDL (20 μg apoB/ml) were added for 150 min. Then cells were harvested for SphK1 determination (D) or for qPCR evaluation of SphK1 mRNA. F-G. Effect of DMS and SphK1-siRNA (preincubated with cells as in Fig.4D,E) on HMEC-1 tube formation induced by oxLDL (20 μg/ml), as in Fig.1. In G, representative pictures of the experiments. In A-F, mean ± SEM of 3 to 4 separate experiments, \* p < 0.05; ns, not significant.

As HMEC-1 express CD36 (Ades *et al*, 1992) and LOX-1 (Dandapat *et al*, 2007), which may participate in the uptake of oxLDL by endothelial cells (Adachi and Tsujimoto, 2006), and promote ROS formation and angiogenesis (Dandapat *et al*, 2007; Silverstein and Febbraio, 2009), we investigated whether these receptors play a role in oxLDL-induced SphK1-mediated angiogenesis in the HMEC-1 model. Angiogenic concentration of oxLDL induced a transient rise of H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence reflecting an increase of intracellular ROS (Fig.5A). Anti-CD36 and anti-LOX-1 blocking antibodies (but not irrelevant



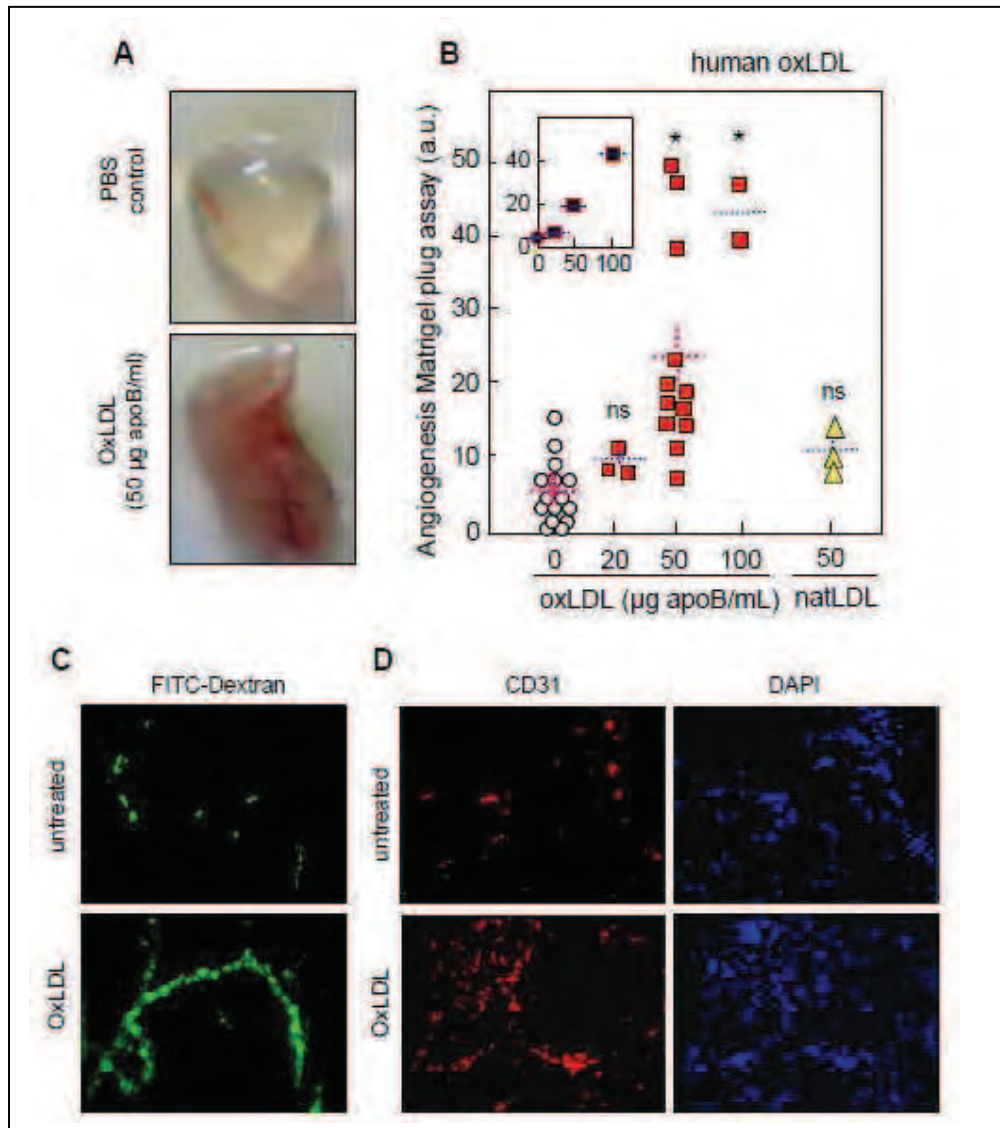
antibodies) inhibited the uptake of oxLDL by 37% and 30% respectively, and reduced ROS generation (Fig.5A,B). Likewise, anti-CD36 and anti-LOX-1 antibodies inhibited SphK1 activation and tube formation elicited by oxLDL (Fig.5C-E). This suggests a role for CD36 and LOX-1 in the uptake of oxLDL and in subsequent ROS generation, in agreement with previous reports (Li *et al*, 2010; Dandapat *et al*, 2007).



**Figure 5. Role of CD36 and LOX-1 in ROS generation, SphK1 activation and capillary tube formation induced by oxLDL.** A. Time course of intracellular ROS triggered by oxLDL (20  $\mu$ g/ml) in HMEC-1 preloaded with H<sub>2</sub>DCFDA-AM. At the indicated time, cells were washed lysed and the fluorescence was measured (ex.495/em.525 nm). B. Intracellular ROS in HMEC-1 pre-incubated with anti-CD36 (2.5  $\mu$ g/ml) or anti-LOX-1 (5  $\mu$ g/ml) Ab for 2h or with N-acetylcysteine (NAC, 1 mmol/l for 1h), then incubated with oxLDL (20  $\mu$ g/ml) for 20 min. Then, cells were washed, lysed and the fluorescence was measured. C. SphK1 activity in extracts from cells pre-incubated with anti-CD36 or anti-LOX-1 Ab or with NAC as in Fig.5B, and incubated with oxLDL (20  $\mu$ g/ml) for 150 min. Then cells were harvested and SK1 activity was determined, as in Fig.4. D. Effect of anti-CD36 (2.5  $\mu$ g/ml) or anti-LOX-1 (5  $\mu$ g/ml) Ab or with NAC (1 mM) and trolox (10  $\mu$ M), on HMEC-1 tube formation induced by oxLDL (20  $\mu$ g/ml), as in Fig.1. Mean  $\pm$  SEM of 3 to 4 separate experiments, \*  $p < 0.05$ ; ns, not significant. In E, representative pictures of the experiments of Fig.5D.

As ROS trigger may trigger SphK1 activation, which is inhibited by N-acetylcysteine (NAC) (You *et al*, 2007, Ader *et al*, 2008), we used NAC, which inhibited both oxLDL-induced SphK1 activation and tube formation by HMEC-1 (Fig.5C-E). Altogether, these data support the hypothesis that the uptake of oxLDL through CD36 and LOX-1 is coupled with the generation of ROS that activate the SphK1/S1P pathway and angiogenesis in HMEC-1.

***OxLDL induce angiogenesis in vivo in the Matrigel plug assay. Inhibition by anti-S1P mAb.***



**Figure 6. Human oxLDL stimulate angiogenesis in the murine Matrigel plug model.**

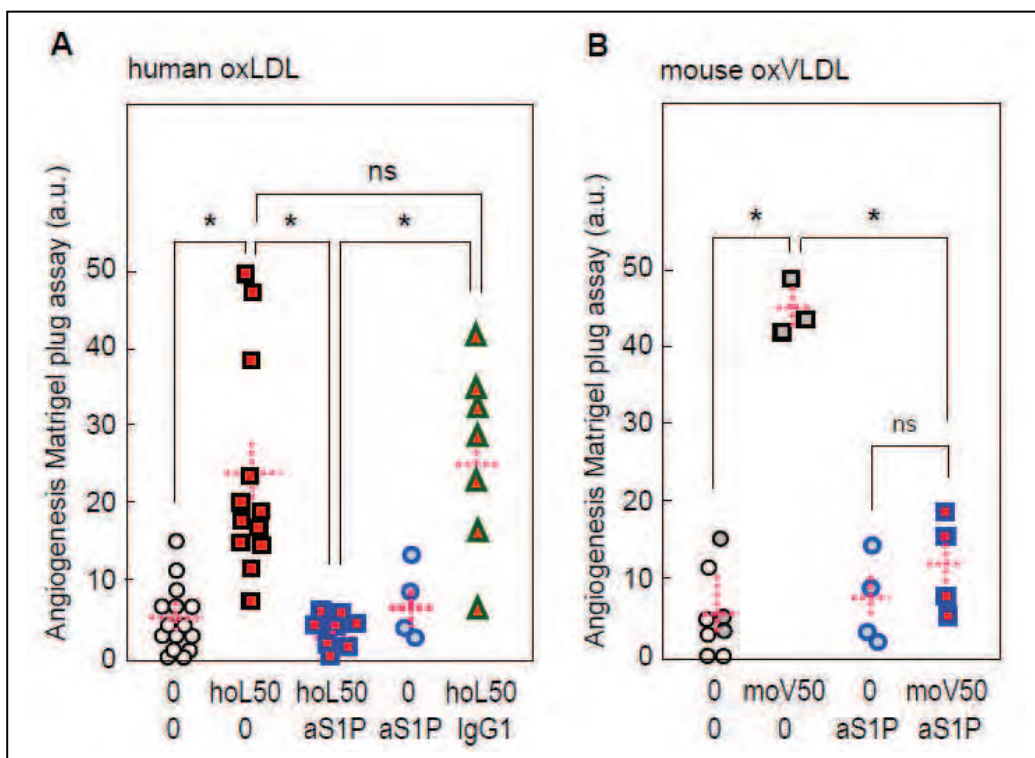
A,B. C57/BL6 mice were injected subcutaneously with 0.4 ml Matrigel containing human native LDL (natLDL) or oxLDL. Plugs were removed after 2 weeks and photographed. A, representative macrophotographies of plugs. Angiogenesis was evaluated by image analysis, as indicated in Supporting information Fig.S3 and S4. B. Quantitative evaluation of angiogenesis in plugs containing PBS (circles), oxLDL (squares) or natLDL (triangles). Statistical analysis by one-way Anova and Holm-Sidak test (SigmaStat 3.5 software), each group being compared to PBS (0) group. Mean  $\pm$  SEM are indicated by the dotted lines. ns, not statistically significant; \*  $p < 0.05$ . C, mice were intravenously injected with FITC dextran, 10 min before killing. The plugs were removed, photographed and used for CD31 immunohistochemistry and DAPI staining. From left to right, representative microphotographies of neovascularisation visualized by FITC-dextran staining, plug sections labeled by anti-CD31 antibody and counterstaining by DAPI.

The angiogenic effect of oxLDL *in vivo*, and the role of S1P were evaluated by the mouse Matrigel plug assay (Passaniti *et al*, 1992). Matrigel plugs, containing oxLDL or native LDL, or vehicle were subcutaneously injected into mouse flanks.

After 2 weeks, capillary neoformation in the plugs was analyzed. Red blood-colored neo-capillaries in Matrigel plugs (Fig.6A,B) was quantified by two morphometric methods (Supporting information Figs.S3,S4) and was also visualized on plug sections by fluorescence microscopy and by immunostaining of the endothelial cells with anti-CD31 antibody (Fig.6C,D). Negative control plugs appeared pale and gray transparent and contained only few blood-colored capillaries, whereas oxLDL-containing Matrigel plugs were more intensely red-colored.

Human oxLDL induced a dose-dependent angiogenic response (0-100  $\mu\text{g apoB/mL}$ ), whereas native LDL (50  $\mu\text{g apoB/mL}$ ) were only slightly angiogenic (Fig.6B). Finally, murine oxidized VLDL were angiogenic like human oxLDL, thus suggesting that the angiogenic effect of oxLDL results from the oxidation process and not from an immune response of C57BL/6 mice against human oxLDL antigens.

The anti-S1P mAb blocked angiogenesis elicited by human oxLDL or murine oxVLDL (both used at 50  $\mu\text{g/ml}$ ) in the plug assay (Fig.7A,B), while the non-specific isotype-matched IgG $\kappa$ 1 had no effect. This suggests that oxLDL-induced angiogenesis in the Matrigel plug model requires extracellular S1P, and is effectively blocked by anti-S1P mAb.



**Figure 7. Effect of anti-S1P mAb on oxLDL-induced angiogenesis in murine Matrigel plug**

Mice were injected with Matrigel containing 50  $\mu\text{g apoB/ml}$  human oxLDL (hoL50) (A) or murine oxVLDL (moV50). (B). Mice were intraperitoneously injected every 3 days with the anti-S1P mAb (50mg/kg body weight) or the inactive isotype IgG1 (50mg/kg body weight) for 2 weeks before removing the plugs and quantification of angiogenesis. Each point represents the angiogenesis score in one plug. Mean  $\pm$  SEM are indicated by the dotted line. Statistical by one way Anova followed and comparison with the PBS control by Holm-Sidak test (SigmaStat software) \*  $p < 0.05$ ; ns, not statistically significant.



## Discussion

The reported data indicate, for the first time, that oxLDL-induced angiogenesis requires SphK1/S1P signalling both *in vitro* in a HMEC-1 tube formation model, and *in vivo* in the murine Matrigel plug model, and is effectively prevented by SphK1 inhibitors and by an anti-S1P mAb Sphingomab<sup>®</sup> that neutralizes extracellular S1P.

Since sphingolipid mediators are generated upon stimulation of vascular cells by oxLDL (Auge *et al*, 2000) and since S1P is a known angiogenic mediator (Lee *et al*, 1999), we hypothesized that S1P may contribute to oxLDL-induced angiogenesis. The crucial role of extracellular S1P is supported in our model, by the inhibition of oxLDL-induced HMEC-1 migration and tube formation by the anti-S1P mAb, which reduces specifically the bioavailability of extracellular S1P (Sabbadini, 2011). Interestingly, at low oxLDL concentration, the anti-S1P mAb did not increase the oxLDL toxicity. Moreover, this antibody, administered to C57BL/6 mice implanted with oxLDL-containing Matrigel plugs, prevented also the angiogenic effect of oxLDL *in vivo*. This is consistent with the efficacy of Sphingomab<sup>®</sup>, and its humanized form Sonepcizumab<sup>®</sup>, to block VEGF-induced angiogenesis in the murine Matrigel plug, retinal neovascularization and tumor angiogenesis in animal models in which S1P exerts cell-protective, tumorigenic and angiogenic effects (Visentin *et al*, 2006; Sabbadini, 2011).

Extracellular S1P can be secreted by endothelial cells or/and provided by blood (platelets and HDL) (Spiegel and Milstien, 2003). In our experiments, HMEC-1 were starved in serum-poor medium containing only low level of S1P that could account for the basal tube formation, but not for the angiogenic effect of oxLDL. Similarly, the S1P content in LDL cannot explain the oxLDL-induced angiogenesis, since native LDL are not angiogenic and since oxidation reduces the level of LDL-associated S1P (Kimura *et al*, 2001). Thus, it is more likely that S1P is biosynthesized and secreted by HMEC-1, since i/ oxLDL trigger a time- and dose-dependent activation of SphK1 associated with a concomitant S1P generation, ii/ the inhibition of SphK1 by DMS or by SphK1-specific siRNA blocked the oxLDL-induced HMEC-1 tube formation. According to the classical 'inside-out' signaling, S1P generated by cells can be exported by S1P transporters, such as SPNS2 and ABC transporter family (Takabe *et al*, 2008; Nishi *et al*, 2013). Finally, in our HMEC-1 model, the SphK1/S1P pathway activated by oxLDL is apparently the main source of extracellular S1P, which mediates oxLDL-induced angiogenesis and is blocked by anti-S1P mAb.

Another issue is the relationship between ROS and SphK1 activation. In HMEC-1, the uptake of oxLDL is associated to ROS generation through LOX-1 and CD36. OxLDL have been shown to generate ROS through a LOX1-dependent activation of NADPH oxidase (Dandapat *et al*, 2007) and the interaction of oxidized lipids or oxLDL with CD36 may trigger a cellular oxidative stress (Sukhanov *et al*, 2006; Li *et al*, 2010). In HMEC-1, NAC prevented both the oxLDL-induced ROS rise and SphK1 activation, thus suggesting that ROS mediate SphK1 activation, in agreement with the ROS-induced activation of SphK1 by hyperglycemia (You *et al*, 2007) and by hypoxia (Ader *et al*, 2008), and with our recent report on the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced signalling cascade leading to SphK1 activation (Cinq-Frais *et al*, 2013).

Interestingly, antioxidants such as NAC and trolox (a hydrophilic analog of tocopherol), inhibited also the HMEC-1 angiogenesis triggered by oxLDL, thus supporting the

hypothesis that the interaction of oxLDL with CD36 or LOX-1 elicits ROS generation, which mediates SphK1 activation and S1P generation required for this angiogenic response.

In our HMEC-1 model, the angiogenic effect is apparently independent of VEGF, since oxLDL triggered neither VEGF mRNA induction (Supporting information Fig.S5A) nor increase of the low basal level of VEGF (determined by the Human VEGF ELISA Kit of Signosis) (data not shown). This discrepancy with the data of Dandapat *et al*, (2007) may result from differences in the endothelial cell type (HMEC-1 vs HCAEC) and LDL oxidation (mild UV-induced LDL oxidation vs copper-induced LDL oxidation). However, as a cross-talk between the VEGF and S1P signaling pathways has been reported (Tanimoto *et al*, 2002; Spiegel and Milstien 2003), we investigated whether VEGFR2 was implicated in oxLDL-induced angiogenesis. Interestingly, the VEGFR2 inhibitor SU-1498 inhibited in part the angiogenic effect of oxLDL (Supporting information Fig.S5B) and of exogenously added S1P, thus suggesting that VEGFR2 is involved in the angiogenic effect of S1P, possibly *via* a transactivation of VEGFR2 by S1P (Tanimoto *et al*, 2002) or *via* the formation of a complex comprising S1PR and VEGFR2, and other growth factor receptors (Bergelin *et al*, 2010, Pyne and Pyne, 2010). This suggests that oxLDL may activate various angiogenic interconnected signalling pathways, e.g. the SphK1/S1P and VEGFR2 pathways (even in the absence of secretion of VEGF). Of course, it is not excluded that VEGF may play a role *in vivo*, in the mouse Matrigel plug model. This is not conflicting with the inhibitory effect of anti-S1P mAb, since the angiogenic signalling of VEGF2 is partly mediated by S1P (Spiegel and Milstien, 2003).

In atherosclerotic plaques, the level of LDL oxidation is probably not uniform and the local oxLDL concentration varies during the evolution of the plaque. Indeed, LDL oxidation is a progressive process depending on lipid composition, residence time, rate of metabolic clearance of lipoproteins and intensity and duration of oxidative stress (Stocker and Keaney, 2004; Levitan *et al*, 2010). Dandapat's report (2007) and our results suggest that low concentration of oxLDL may trigger angiogenesis or reinforce the effect of other angiogenic factors. In contrast, at high levels of oxLDL (possibly found in the lipid-rich central core), the apoptotic effect may prevail and elicit the disruption of these fragile neo-capillaries and intraplaque haemorrhage. In this scenario, neovascularization could participate in plaque instability and rupture, leading finally to atherothrombosis (Kolodgie *et al*, 2003; Moreno *et al*, 2006; Michel *et al*, 2011). Interestingly, under the used experimental conditions, with SphK1 inhibitors and anti-S1P mAb utilized to block the oxLDL-induced angiogenic effect, no toxic effect was observed, possibly because oxLDL concentration used here is largely below the toxic threshold dose. In the context of the treatment of advanced atherosclerotic plaques by angioplasty and stent, the local administration of drugs targeting S1P (e.g. SphK1 inhibitors, anti-S1P mAb) could be useful not only to prevent intimal hyperplasia (McDonald *et al*, 2010), but also to counter the angiogenic effect of oxLDL in advanced atherosclerotic plaques.

## Acknowledgments

The authors wish to thank C Bernis, MH Grazide, and P. Clerc for their excellent technical assistance, and Lpath for giving the anti-S1P mAb. This work was supported by INSERM, University Toulouse-3 and Agence Nationale pour la Recherche (ANR-12-BSV1-0016-01 'Carina'). M. Trayssac was granted by "Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche" (PhD fellowship) and by "Société Française de Transplantation".

## Author Contribution

- Caroline Camaré carried out the *in vitro* and *in vivo* experiments, drafted the manuscript
- Magali Trayssac carried out *in vitro* experiments (migration, siRNA studies)
- Barbara Garmy-Susini helped at the setting up of angiogenesis *in vivo* (matrigel plugs)
- Elodie Mucher carried out Q-PCR and siRNA studies
- Roger Sabbadini gave the anti S1P mAb and fruitfully contributed to the discussion
- Robert Salvayre designed the experiments, interpreted the data and wrote the manuscript
- Anne Negre-Salvayre designed the experiments, interpreted the data and wrote the manuscript

## References

- Adachi H, Tsujimoto M. (2006) Endothelial scavenger receptors. *Prog Lipid Res* 45:379-404.
- Ades EW, Candal FJ, Swerlick RA, George VG, Summers S, Bosse DC, Lawley TJ. (1992) HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* 99:683-690.
- Ader I, Brizuela L, Bouquerel P, Malavaud B, Cuvillier O. (2008) Sphingosine kinase 1: a new modulator of hypoxia inducible factor 1alpha during hypoxia in human cancer cells. *Cancer Res* 68:8635-8642.
- Augé N, Nikolova-Karakashian M, Carpentier S, Parthasarathy S, Nègre-Salvayre A, Salvayre R *et al.* Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized LDL in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase. *J Biol Chem* 1999; 274:21533-21538.
- Bergelin N, Löf C, Balthasar S, Kalhori V, Törnquist K. (2010) S1P1 and VEGFR-2 form a signaling complex with extracellularly regulated kinase 1/2 and protein kinase C-alpha regulating ML-1 thyroid carcinoma cell migration. *Endocrinology* 151:2994-3005.
- Bochkov VN, Philippova M, Oskolkova O, Kadl A, Furnkranz A, Karabeg E, *et al.* (2006) Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via autocrine mechanisms, implicating a novel role for lipid oxidation in the evolution of atherosclerotic lesions. *Circ Res* 99:900-908.
- Carmeliet P, Jain RK. (2011) Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 473:298-307.
- Chen CH, Jiang W, Via DP, Luo S, Li TR, Lee YT, Henry PD. (2000) Oxidized LDL inhibit endothelial cell proliferation by suppressing basic fibroblast growth factor expression. *Circulation* 101:171-177.
- Cinq-Frais C, Coatrieux C, Grazide MH, Hannun YA, Nègre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N. (2013) A signaling cascade mediated by ceramide, src and PDGFR $\beta$  coordinates the activation of the redox-sensitive neutral sphingomyelinase-2 and sphingosine kinase-1. *Biochim Biophys Acta* 1831:1344-1356



- Dandapat A, Hu C, Sun L, Mehta JL. (2007) Small concentrations of oxLDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:2435-2442.
- Daum G, Grabski A, Reidy MA. (2009) Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:1439-1443.
- Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Vacaresse N, Jürgens G, Darblade B, Arnal JF, *et al.* (2001) Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor beta-receptor pathway. *Circulation* 104:1814-1821.
- Hannun YA, Obeid LM. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:139-150.
- Hla T. (2003) Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol Res* 47:401-407
- Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC. (2005) Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation* 112:1813-1824.
- Kimura T, Sato K, Kuwabara A, Tomura H, Ishiwaru M, Kobayashi I, *et al.* (2001) S1P may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 276:31780-31785.
- Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, *et al.* (2003) Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 349:2316–2325.
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, *et al* (1999) Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate. *Cell* 1999; 99: 301-312
- Levitan I, Volkov S, Subbaiah PV. (2010) Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 13:39-75.
- Li W, Febbraio M, Reddy SP, Yu DY, Yamamoto M, Silverstein RL. (2010) CD36 participates in a signaling pathway that regulates ROS formation in murine VSMCs. *J Clin Invest* 120:3996-4006.
- Lu J, Mitra S, Wang X, Khaidakov M, Mehta JL. (2011) Oxidative stress and lectin-like ox-LDL-receptor LOX-1 in atherogenesis and tumorigenesis. *Antioxid Redox Signal* 15:2301-2333.
- Lucke S, Levkau B. (2010) Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate. *Cell Physiol Biochem* 26:87-96.
- McDonald RA, Pyne S, Pyne NJ, Grant A, Wainwright CL, Wadsworth RM. (2010) The sphingosine kinase inhibitor N,N-dimethylsphingosine inhibits neointimal hyperplasia. *Br J Pharmacol* 159:543-553.
- Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. (2011) Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J* 32:1977-1985.
- Moreno PR, Purushothaman KR, Sirol M, Levy AP, Fuster V. (2006) Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation* 113:2245–2252.
- Murugesan G, Chisolm GM, Fox PL. (1993) Oxidized low density lipoprotein inhibits the migration of aortic endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 120:1011-1019.
- Negre-Salvayre A, Augé N, Duval C, Robbesyn F, Thiers JC, Nazzal D, *et al.* (2002) Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes. *Methods Enzymol.* 352:62-71.

- Nishi T, Kobayashi N, Hisano Y, Kawahara A, Yamaguchi A. (2013) Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters. *Biochim Biophys Acta* pii: S1388-1981(13)00150-9.
- Olivera A, Spiegel S. (1993) Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens. *Nature* 365:557–560.
- Oskolkova OV, Afonyushkin T, Leitner A, von Schlieffen E, Gargalovic PS, Lusic AJ, *et al.* (2008) ATF4-dependent transcription is a key mechanism in VEGF up-regulation by oxidized phospholipids: critical role of oxidized sn-2 residues in activation of unfolded protein response. *Blood* 112:330-339.
- Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, *et al.* (1982) A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin and fibroblast growth factor. *Lab Invest* 67:519-528.
- Pchejetski D, Kunduzova O, Dayon A, Calise D, Seguelas MH, Leducq N, *et al.* (2007) Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circ Res* 100:41-9.
- Pitson SM. (2011) Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends Biochem Sci* 36:97-107.
- Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, *et al.* (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71:343-353.
- Pyne S, Pyne NJ. (2010) Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nature Reviews Cancer* 10, 489-503.
- Pyne S, Pyne NJ. (2011) Translational aspects of sphingosine-1-phosphate biology. *Trends Mol Med.* 17:463-472.
- Sabbadini RA. (2011) Sphingosine-1-phosphate antibodies as potential agents in the treatment of cancer and age-related macular degeneration. *Br J Pharmacol* 162:1225-1238.
- Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A. (2002) Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585:213-221.
- Sanson M, Ingueneau C, Vindis C, Thiers JC, Glock Y, Rousseau H, *et al.* (2008) Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells. *Cell Death Differ* 15:1255-1265.
- Shibuya M. (2008) VEGF-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep* 41:278-286.
- Silverstein RL, Febbraio M. (2009) CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behaviour. *Sci Signal* 26;2(72):re3.
- Spiegel S, Milstien S. (2003) Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:397-407.
- Stocker R, Keaney JF Jr. (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84:1381-1478.
- Sukhanov S, Higashi Y, Shai SY, Itabe H, Ono K, Parthasarathy S, Delafontaine P. (2006) Novel effect of oxidized low-density lipoprotein: cellular ATP depletion via downregulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Circ Res* 99:191-200.
- Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. (2008) "Inside-out" signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 60:181-195.

- Tanimoto T, Jin ZG, Berk BC. (2002) Transactivation of vascular endothelial growth factor receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 277:42997-3001
- Tellier E, Nègre-Salvayre A, Bocquet B, Itohara S, Hannun YA, Salvayre R, Augé N. (2007) Role for furin in TNF alpha-induced activation of the matrix metalloproteinase/sphingolipid mitogenic pathway. *Mol Cell Biol* 27:2997-3007
- Tsimikas S, Miller YI. (2011) Oxidative modification of lipoproteins: mechanisms, role in inflammation and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 17:27-37.
- Ushio-Fukai M, Alexander RW. (2004) Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 264:85-97.
- Visentin B, Vekich JA, Sibbald BJ, Cavalli AL, Moreno KM, Matteo RG *et al.* (2006) Validation of an anti-sphingosine-1-phosphate antibody as a potential therapeutic in reducing growth, invasion, and angiogenesis in multiple tumor lineages. *Cancer Cell* 9:225-238.
- Witztum JL, Steinberg D. (1991) Role of oxidized LDL in atherogenesis. *J Clin Invest* 88:1785–1792.
- You B, Ren A, Yan G, Sun J. (2007) Activation of sphingosine kinase-1 mediates inhibition of vascular smooth muscle cell apoptosis by hyperglycemia. *Diabetes* 56:1445-1453.
- Yu S, Wong SL, Lau CW, Huang Y, Yu CM (2011) Oxidized LDL at low concentration promotes *in vitro* angiogenesis and activates NO synthase through PI3K/Akt/eNOS pathway in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 407:44-48.

**Conflicts of interest**

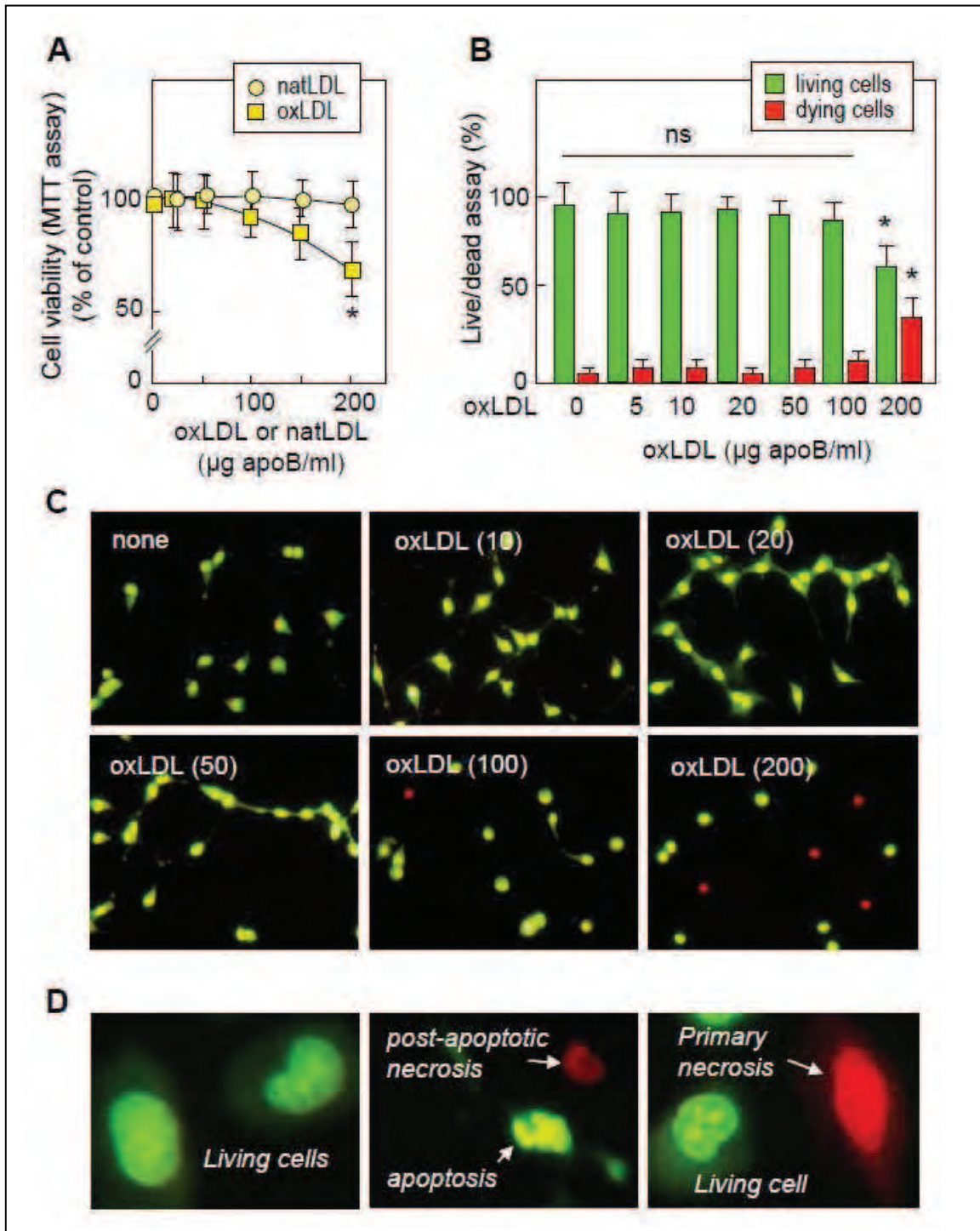
Pr. Roger Sabbadini is the Founder and Vice President of Lpath, Inc. He is an inventor of the anti-S1P antibodies and has stock in Lpath. No other conflict of interest.

**Oxidized LDL-induced angiogenesis involves sphingosine-1-phosphate. Prevention by anti-S1P antibody.**

Caroline Camaré, Magali Trayssac, Barbara Garmy-Susini, Elodie Mucher, Roger Sabbadini, Robert Salvayre, Anne Negre-Salvayre.

**SUPPORTING INFORMATIONS**

**Supporting information - Figure S1**

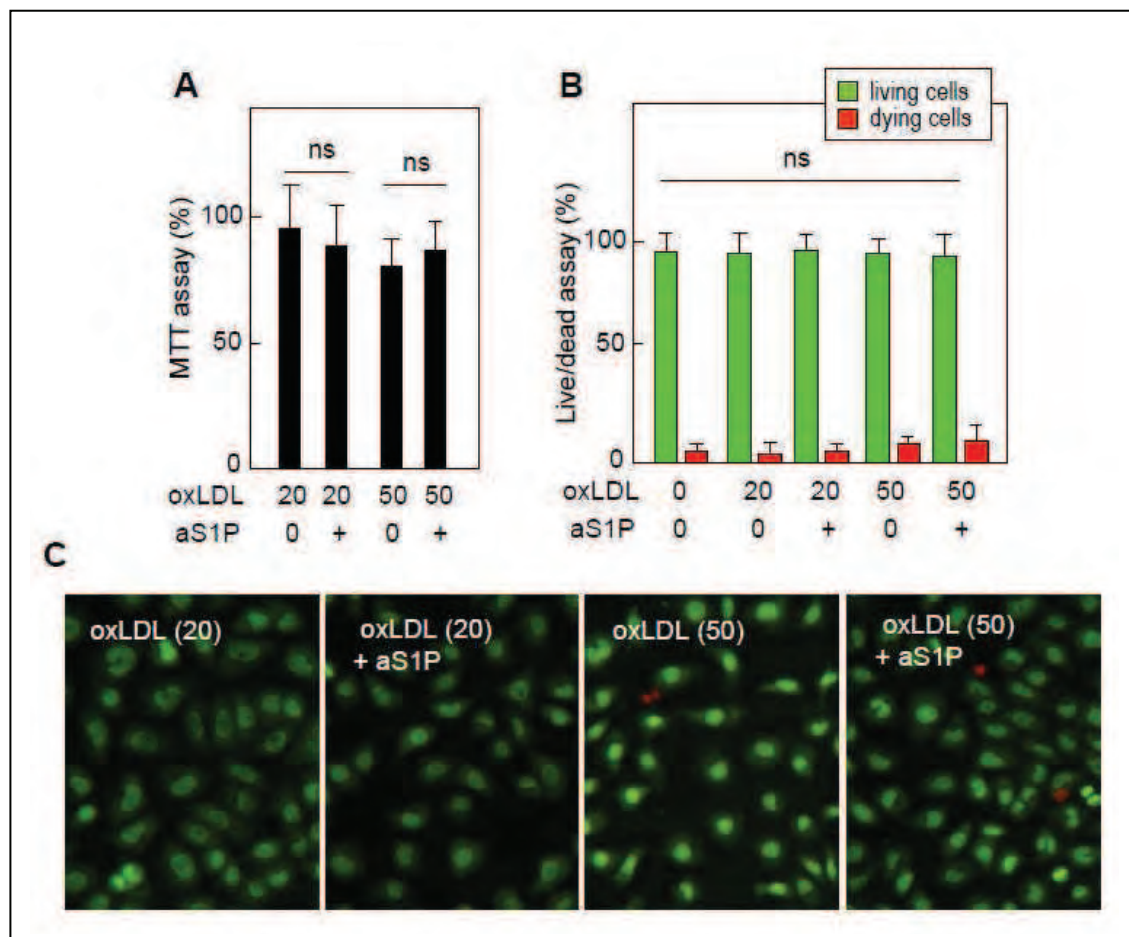




**Figure S1. Toxicity of increasing concentration of oxLDL in HMEC-1 grown on Matrigel.**

HMEC-1 were grown on Matrigel for 24h with increasing concentration of oxLDL or native LDL (natLDL). A. Whole toxicity evaluated by the MTT assay. B-D. Cells were stained by two fluorescent intercalating compounds, the permeant green-colored syto13 and the non permeant red colored propidium iodide (PI), under conditions where the red fluorescence prevails over the green fluorescence when the two fluorescent probes enter the nucleus (i.e. when the plasma membrane is permeabilized). Living and dying cells were counted on the basis of staining and morphological features. In A,B, mean  $\pm$  SEM of 3-5 separate experiments, \*  $p < 0.05$ ; ns, not significant. D. Higher magnification showing the structure of the nucleus. Left panel. Living cells exhibit a loose green colored chromatin (non permeant PI does not enter the normal cell). Middle panel. Primary apoptosis is characterized by condensed pyknotic or fragmented nucleus stained green/yellow by Syto13 (at this stage, apoptotic cells are not permeable to PI), whereas, during post-apoptotic necrosis, the nucleus exhibit a similar apoptotic morphology but is stained red by PI (due to the permeability of the plasma membrane in a late step of apoptosis). Right panel. Primary necrosis is characterized by a rapid permeabilization of the plasma membrane allowing PI to enter the cell and stain red the loose chromatin of the nucleus.

**Supporting information - Figure S2**

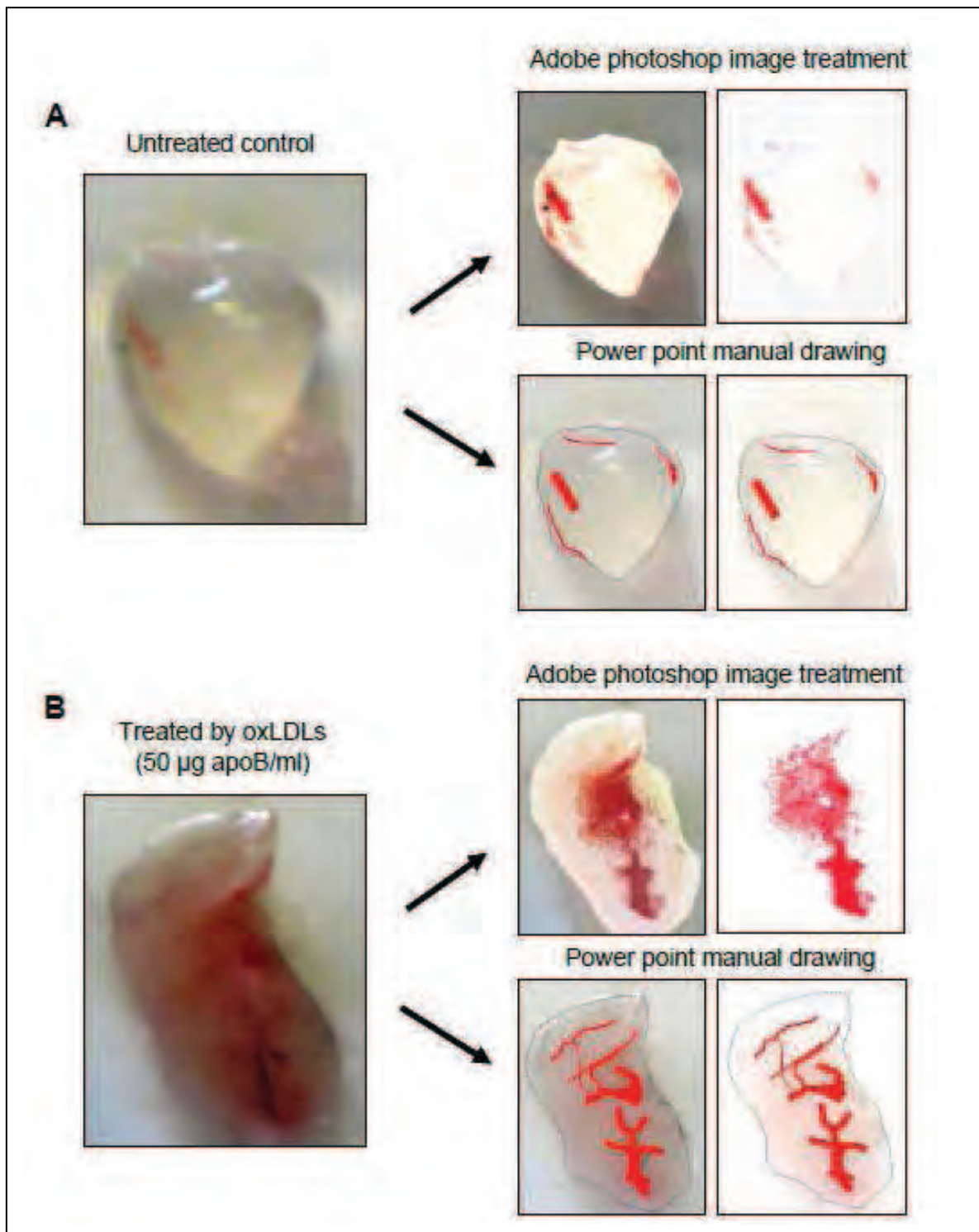


**Figure S2. Anti-S1P mAb is not toxic to HMEC-1 treated with low concentration of oxLDL.**

HMEC-1 were grown in 12 multiwell plates in MCDB-131 containing 10% FCS and starved in serum poor (0.1% FCS) medium for 24h before addition of oxLDL at the indicated concentrations (20 or 50  $\mu$ g apoB/ml) and anti-S1P mAb (aS1P, 10  $\mu$ g/ml). In A, evaluation by the MTT assay of the whole toxicity of oxLDL (20 and 50  $\mu$ g/ml) and aS1P. In B,C, live/dead experiments using syto-13 (green) and PI (red) DNA probes, in HMEC-1 incubated with oxLDL  $\pm$  aS1P, as in A. B: counting of living vs dying cells. C, pictures representative of HMEC-1 viability in the presence of oxLDL (at the indicated concentrations)  $\pm$  aS1P. Mean  $\pm$  SEM of 4 separate experiments, \*  $p < 0.05$ ; ns, not significant.



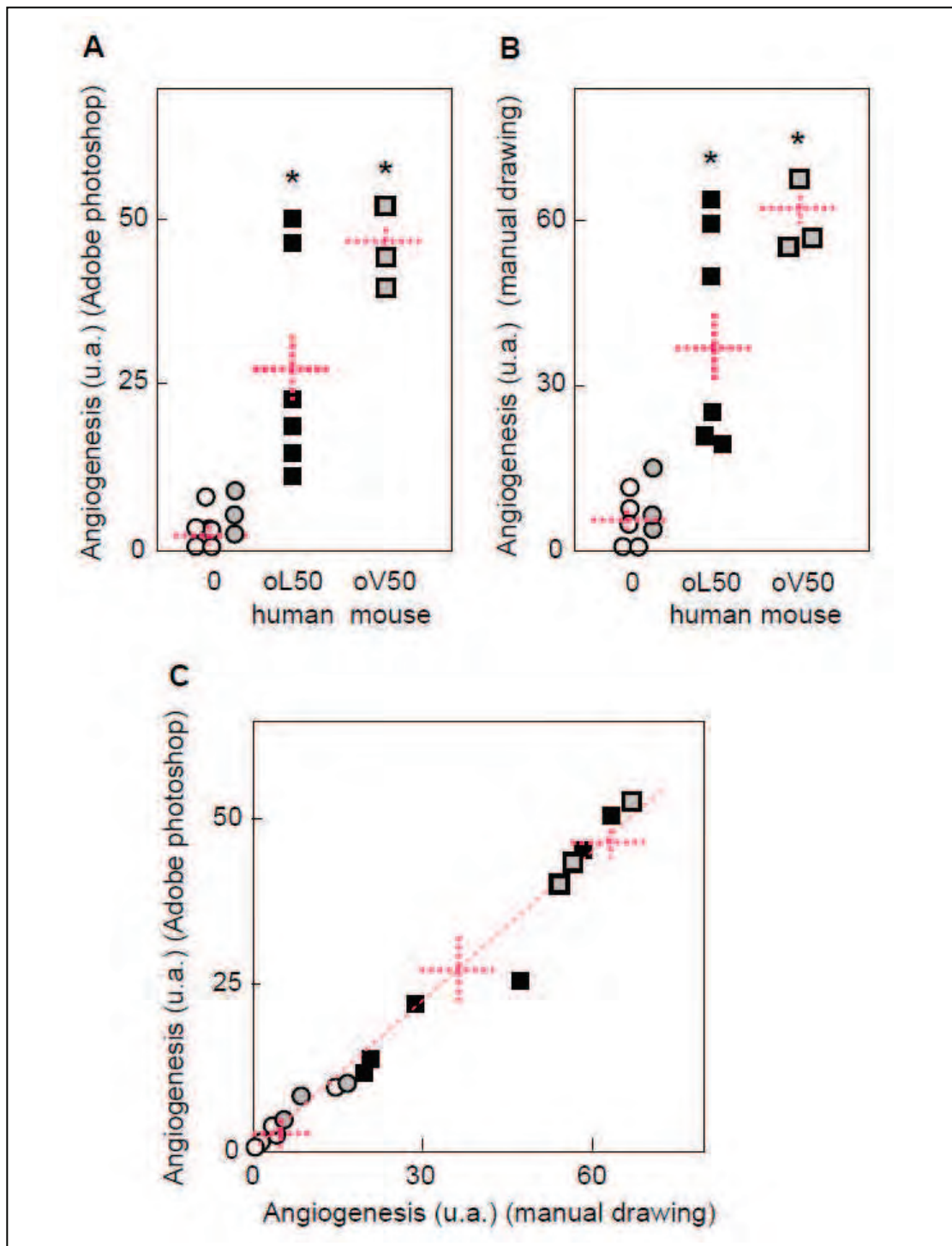
**Supporting information - Figure S3**



**Figure S3. Human oxLDL stimulate angiogenesis in vivo in the Matrigel plug model.**

A,B. Angiogenesis in Matrigel plugs. C57/BL6 mice were injected subcutaneously with 0.4 ml Matrigel containing on one flank PBS and on the other flank human oxLDLs. Plugs were removed after 2 weeks and photographed. Representative macrophotographies of plugs containing PBS (control) or oxLDLs (50 µg apoB/ml). Angiogenesis was quantified by image analysis of the red blood color using Adobe photoshop software (upper right panel in A and B) or by manual drawing followed by image analysis (lower right panels in A and B).

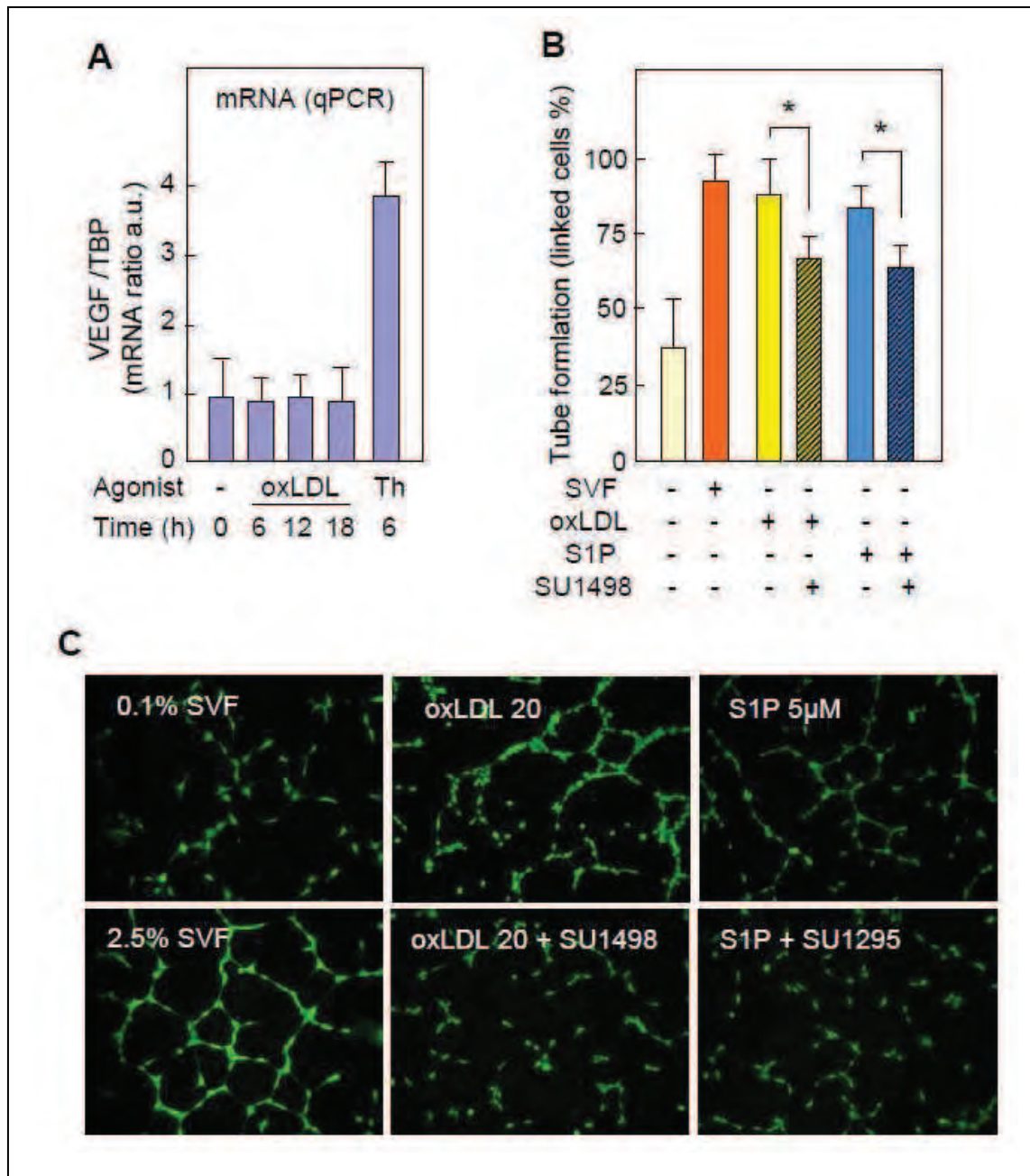
Supporting information - Figure S4



**Figure S4. Comparison of the two methods of quantification of angiogenesis on macrophotographies.**

A and B, Quantification of angiogenesis in Matrigel plugs obtained by image analysis of blood colored vessels using Adobe photoshop software (A) and by manual drawing followed by image analysis (B). In C, comparison of the data by the two methods.

Supporting information - Figure S5



**Figure S5. VEGFR2 is involved in S1P-mediated angiogenesis elicited by oxLDL.**

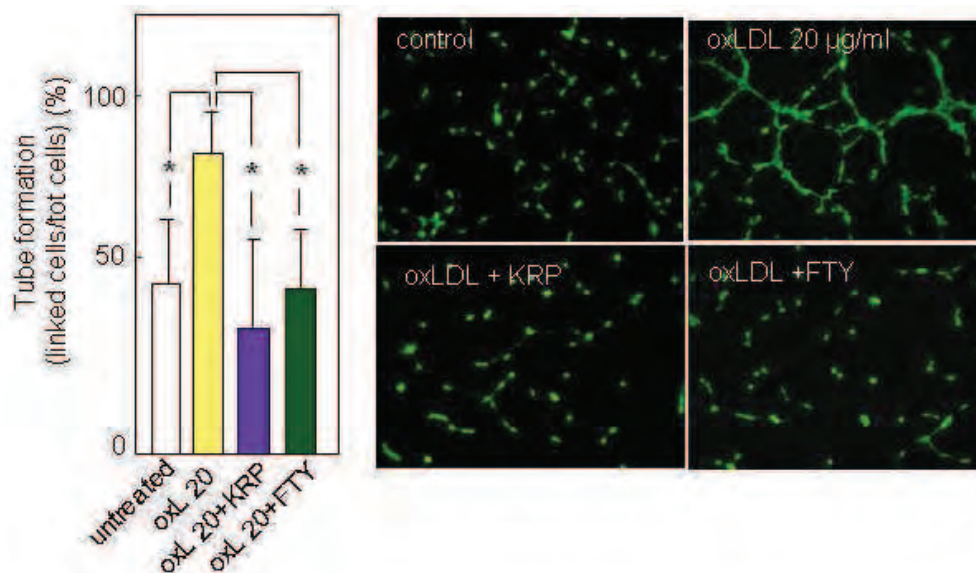
A. Effect of oxLDL on VEGF expression in HMEC-1. Cells were incubated in the presence of oxLDL (20 µg apoB/mL) or thapsigargin (5 µM) at the indicated time. VEGF mRNA level was evaluated by qPCR (normalized to TBP mRNA). B and C, Effect of the VEGFR2 inhibitor SU1498 on angiogenesis induced by oxLDL (20 µg apoB/mL) or by S1P (5 µM). In A and B, mean ± SEM of 3 separate experiments, \* p<0.05; ns, not significant. In C, representative microphotographs of cells stained as in Fig.1.

## 1.2. Rôle des récepteurs de S1P (S1PR) dans l'effet angiogénique des LDL oxydés.

Nous avons montré que les LDL oxydées ont des propriétés angiogéniques *in vitro* sur notre modèle de cellules endothéliales micro-vasculaire (HMEC-1) et *in vivo* dans des plugs de Matrigel chez la souris. Cette signalisation angiogénique est initiée par les récepteurs des LDL oxydées, LOX-1 et CD36 et aboutit à la génération de S1P via la génération de ROS (reactive oxygen species) et l'activation de la SK1. La réponse angiogénique des cellules à la S1P semble en partie liée à une transactivation du VEGFR2, puisqu'elle est bloquée partiellement par le SU1498 qui inhibe l'activité kinase du récepteur. Ces données sont en accord avec la littérature où il est décrit une synergie entre la voie du VEGFR et l'induction de l'angiogenèse par la S1P. En effet lorsque les récepteurs de la S1P sont activés ils peuvent transactiver le VEGFR2, à l'origine de l'activation d'Akt et de la phosphorylation d'eNOS (Tanimoto, Jin et al. 2002; Spiegel and Milstien 2003).

La S1P générée par la cellule peut agir directement sur des cibles spécifiques au niveau du cytosol (Spiegel and Milstien 2003), ou bien être externalisée grâce à des transporteurs d'efflux (Mitra, Oskeritzian et al. 2006) et agir via ses récepteurs membranaires couplés aux protéines G (Rosen and Goetzl 2005; Leclercq and Pitson 2006), et induire notamment une signalisation angiogénique (Wang, Van Brocklyn et al. 1999).

Dans notre modèle de cellules capillaires (HMEC-1), la S1P semble fonctionner de façon auto/paracrine après son externalisation dans le milieu extracellulaire, où elle fixe ses récepteurs pour induire le signal angiogénique. En effet, nous avons montré une inhibition de l'effet angiogénique des LDLox et de la S1P exogène, par l'utilisation d'un anticorps anti-S1P bloquant. Cette signalisation angiogénique est également bloquée par l'utilisation de FTY720 et KRP203, agonistes/antagonistes des récepteurs de la S1P (figure 1.2.1).

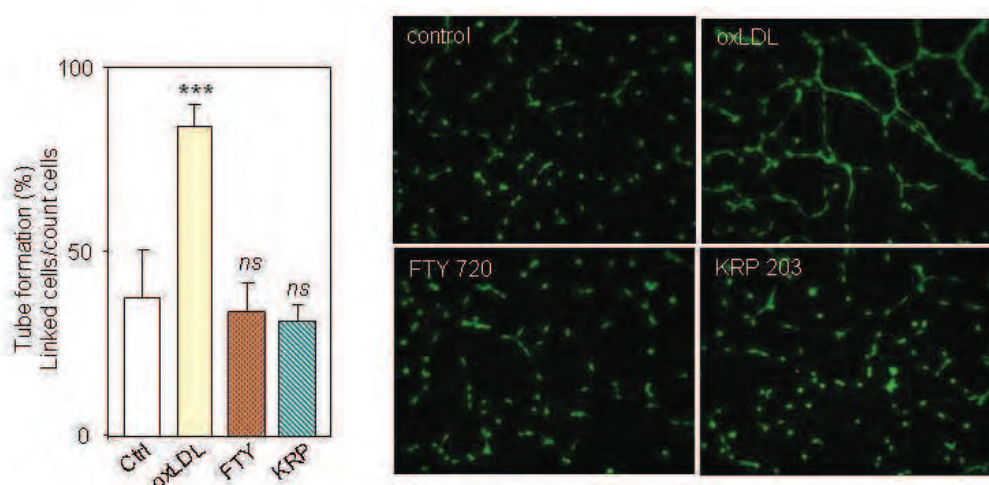


**Fig. 1.2.1. Blocage de l'effet angiogénique des LDL oxydés par l'utilisation d'agonistes/antagonistes des récepteurs de la S1P.** Ces analogues structuraux de la S1P lient les S1PR de façon compétitive et induisent leur internalisation empêchant la fixation de la S1P extracellulaire et la signalisation qui en découle.



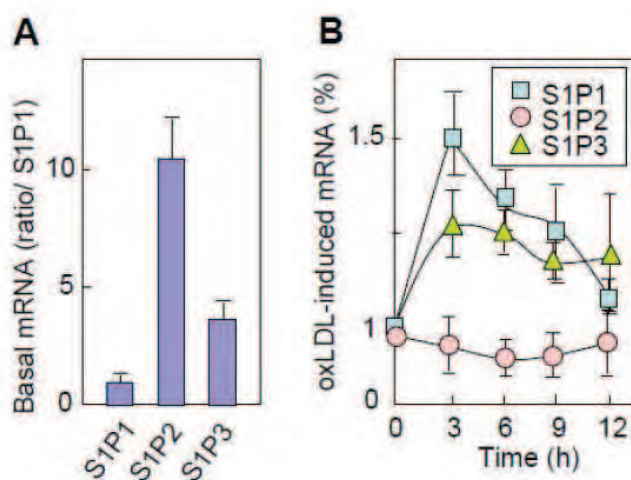
Le FTY720 est un agoniste/antagoniste de tous les S1PR sauf S1P2. Une fois phosphorylé, il se fixe aux récepteurs de la S1P et induit leur internalisation et leur dégradation. Les récepteurs n'étant alors plus disponibles à la membrane, la S1P extracellulaire ne peut s'y fixer et induire de signalisation médiée par ses récepteurs (Matloubian, Lo et al. 2004; Mousseau, Mollard et al. 2012). Le KRP-203 agit de la même manière mais est sélectif de S1P1 (Matloubian, Lo et al. 2004; Huwiler and Pfeilschifter 2008). A coté de cette régulation négative par internalisation et dégradation des récepteurs S1PR, FTY-720 pourrait induire une signalisation persistante en aval de S1P1 après maintien de son internalisation (Mullershausen, Zecri et al. 2009; Healy, Sheridan et al. 2013). Il n'est pas clairement décrit quels sont les mécanismes à l'origine de la dégradation qui suit l'internalisation ni ceux empêchant cette dégradation et à l'origine d'une signalisation persistante des récepteurs internalisés (O'Sullivan and Dev 2013).

Nous avons contrôlé l'effet de ces agonistes/antagonistes utilisés seuls sur la tubulogénèse et n'avons observé aucun effet significatif (figure 1.2.2).



**Fig. 1.2.2. Absence d'effet de KRP-203 et FTY720 sur la tubulogénèse.** Le KRP-203 (1µM) et le FTY720 (2µM) ainsi que les LDLox (20 µg/ml) sont déposés en même temps que les cellules (50 000/puits) sur le Matrigel™. La tubulogénèse est observée après 18 heures d'incubation à 37°C.

Nous nous sommes intéressés à l'expression basale des récepteurs de S1P dans les HMEC-1 ainsi qu'aux possibles modifications de leur expression sous l'effet des LDL oxydées (figure 1.2.3).



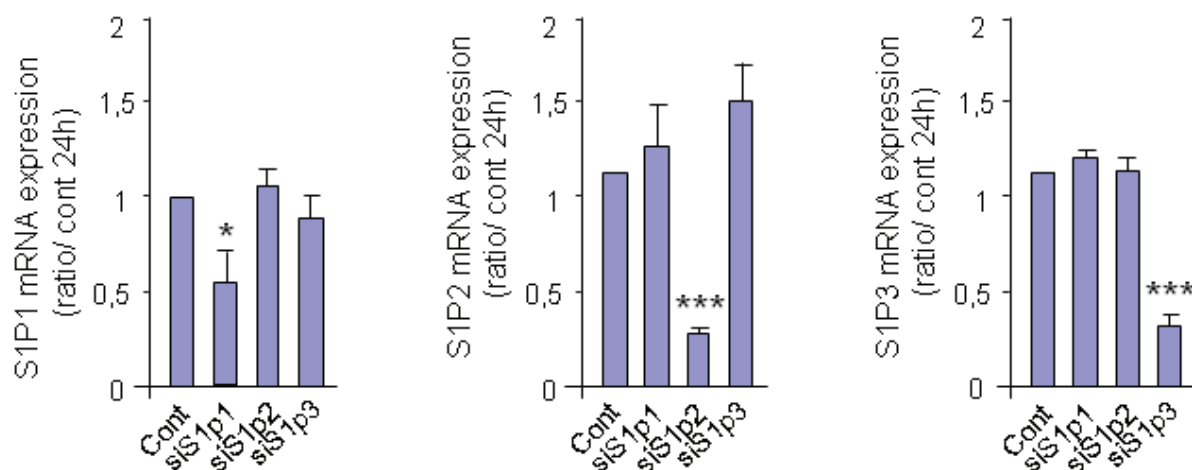
**Fig. 1.2.3. (A) Expression basale et relative des récepteurs S1P1, S1P2 et S1P3 dans les HMEC-1. (B) Modulation de l'expression des récepteurs au cours du temps sous l'effet des LDLox à doses angiogéniques.**



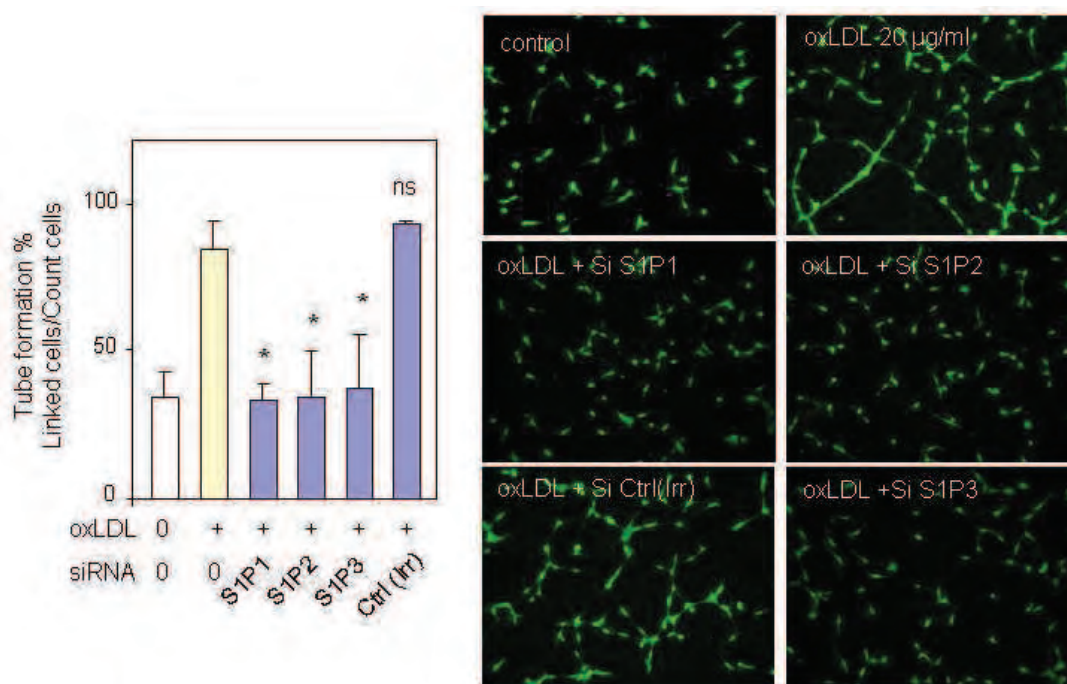
Ces résultats montrent une expression basale de S1P2 beaucoup plus importante que celle de S1P1 et S1P3. Nous observons par contre une augmentation du niveau d'expression de S1P1 et S1P3 dans les 3 heures qui suivent la stimulation des cellules avec des LDLox à dose angiogénique, alors que le niveau d'expression de S1P2 ne varie pas de façon significative, probablement du fait d'une expression basale suffisante pour coopérer avec les deux autres récepteurs dans le processus angiogénique. Ces résultats viennent renforcer notre hypothèse d'une signalisation angiogénique de la S1P *via* ses récepteurs, après son externalisation par la cellule, car l'augmentation d'expression de S1P1 et S1P3 observée est concomitante de l'activation de SK1 et de la génération de S1P par les cellules à l'origine d'une augmentation de la migration et de la tubulogenèse (voir figure 4, Camaré et al. BJP, article soumis).

Il est classiquement décrit que seuls S1P1 et S1P3 sont impliqués dans la prolifération, la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales (Kimura, Watanabe et al. 2000; Yonesu, Nakamura et al. 2010) alors que S1P2 est plutôt anti-migratoire et anti-angiogénique (Kluk and Hla 2002). Bien que S1P2 soit impliqué dans certaines circonstances physiopathologiques, dans les processus d'angiogenèse et de migration ainsi que dans l'établissement et à la maintenance du système cardiovasculaire mature pendant la vie embryonnaire, de façon synergique et/ou complémentaire avec les autres S1PR (Skoura and Hla 2009), son niveau d'expression paraît très important par rapport à celui de S1P1 et de S1P3. De plus FTY720, qui n'inhibe pas S1P2, bloque pourtant efficacement la tubulogenèse induite *in vitro* par les LDLox. Pour tenter d'en savoir plus sur l'implication de chacun de ces trois récepteurs dans le processus angiogénique nous avons utilisé des siRNA spécifiques de S1P1, S1P2 et S1P3, qui bloquent également de façon efficace la signalisation angiogénique des LDLox. (figure 1.2.5).

Les tests d'efficacité des siRNA utilisés, évaluée par qPCR, ont montré une inhibition optimale des messagers des trois récepteurs au bout de 24h d'incubation (figure 1.2.3).



**Fig. 1.2.4. qPCR des mRNA de S1P1, S1P2 et S1P3 dans les HMEC-1 après 24h d'incubation avec leurs siRNA respectifs.** Une inhibition efficace du messager correspondant à chaque siRNA utilisé est observée, ainsi que l'absence d'effet sur les messagers des autres récepteurs.



**Fig. 1.2.5. Blocage de l'effet angiogénique des LDL oxydées par l'utilisation de siRNA des S1PRs.** Les siRNA sont utilisés à la concentration de 100nM et pré-incubés pendant 24h avant l'ensemencement des cellules (50 000/puits) sur Matrigel™ et leur incubation avec les LDLox (20 µg/ml).

Ces résultats suggèrent que la signalisation angiogénique de la S1P dans notre modèle, passe par une coopération des trois récepteurs, S1P1, S1P2 et S1P3. En fait, le niveau d'expression respectif des trois récepteurs ainsi que leur couplage préférentiel avec différentes protéines G et la signalisation qui en découle, dépendent beaucoup du type cellulaire et de l'agent inducteur de l'effet angiogénique. Il a été rapporté que S1P2 pouvait être impliqué dans l'angiogenèse post-ischémique (Skoura, Sanchez et al. 2007) ainsi que dans les phénomènes d'inflammation vasculaire et de congestion (Skoura and Hla 2009) notamment par augmentation de perméabilité vasculaire liée à une désorganisation des jonctions adhérentes de l'endothélium (Adada, Canals et al. 2013). Cette augmentation de la perméabilité vasculaire est un phénomène indissociable de l'angiogenèse *in vivo*, car elle facilite le passage vers l'endothélium de divers facteurs de croissance sécrétés par les cellules péri-vasculaires, comme le VEGF, agissant sur le remodelage vasculaire et l'angiogenèse (Hanahan 1997; Maisonpierre, Suri et al. 1997; Holash, Maisonpierre et al. 1999). Il est donc plausible que dans notre modèle de cellules micro-vasculaires, les trois récepteurs agissent en synergie pour aboutir au processus final d'angiogenèse.

Par contre, notre modèle cellulaire *in vitro* est ici autonome, c'est-à-dire qu'il n'interagit pas avec les cellules péri-vasculaires dans le processus angiogénique, et l'augmentation de la perméabilité vasculaire due à la diminution de la cohésion cellulaire de l'endothélium, médiée par S1P2, n'a ici aucune implication vis-à-vis d'agents angiogéniques synthétisés par d'autres types cellulaires.

Nous avons donc imaginé la possibilité d'une synthèse de facteur de croissance vasculaire par les HMEC-1 elles-mêmes.

Pourtant nous ne retrouvons pas, au niveau de notre modèle cellulaire, de synthèse de VEGF sous l'effet des LDLox, (pas de protéine retrouvée dans les cellules en western blot, ni dans le milieu

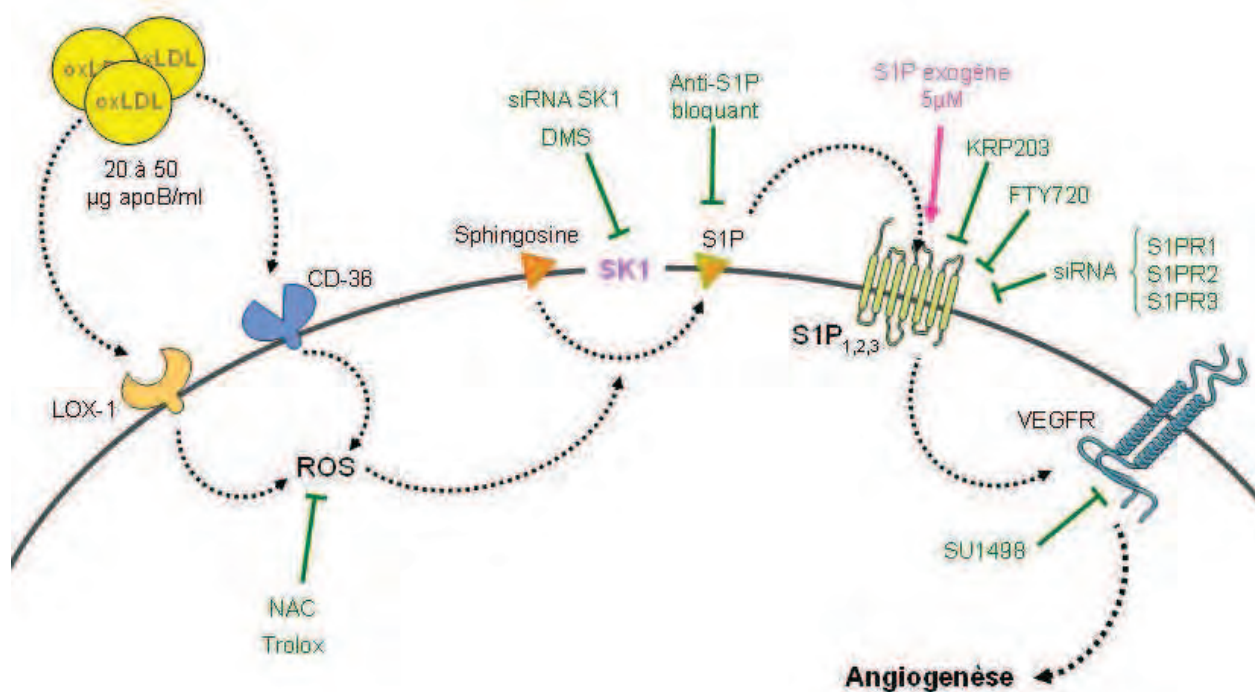
surnageant en immunodétection par Test Elisa et pas de mRNA synthétisé en qPCR sous l'effet des LDLox à dose angiogénique) (voir supplemental figure S5-A, Camaré et al. BJP, article soumis).

La signalisation angiogénique des LDLox dans notre modèle cellulaire ne passe donc pas par une augmentation d'expression du VEGF, mais par la S1P et ses récepteurs qui transactivent en partie le VEGFR2 (voir supplemental figure S5-B et C, Camaré et al. BJP, article soumis).

Nous ne savons pas à l'heure actuelle si cette transactivation du VEGFR par les S1PR se fait par rapprochement physique des deux types de récepteurs (et avec quel S1PR) ou par induction d'une signalisation via les protéines G induisant une activation de kinases en cascade aboutissant à la phosphorylation du domaine cytosolique du VEGFR.

Nous pouvons juste conclure que dans notre modèle, de faibles doses (20 à 50 µg apoB/ml) de LDLox activent deux voies angiogéniques, la voie SK1/S1P et la voie VEGFR.

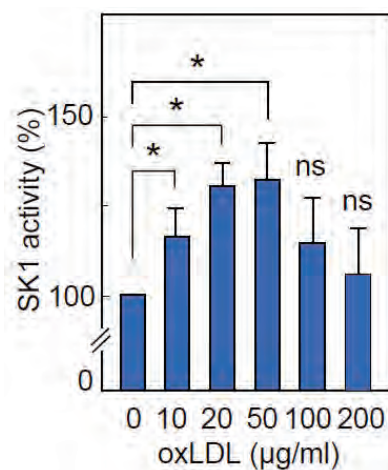
Bien sur il n'est pas écarté que le VEGF lui-même joue un rôle important dans l'angiogénèse observée *in vivo*, dans les plugs de Matrigel. Cette possibilité n'est pas incompatible avec le blocage de l'angiogénèse que nous observons avec l'utilisation de l'anticorps anti-S1P bloquant, puisque la signalisation du VEGFR2 est en partie médiée par la S1P.



**Fig. 1.2.6. Schéma de synthèse de la première partie.** L'effet angiogénique de faibles doses (20 à 50 µg/ml) de LDL oxydés sur les HMEC-1, passe par les récepteurs CD-36 et LOX-1, la génération de ROS, l'activation de la voie SK1/S1P et la transactivation du VEGFR.

## **2. L'activation de la voie des sphingolipides nSMase2/SK1 est nécessaire pour l'angiogenèse induite par les LDL oxydées.**

Dans notre modèle, les LDLox ont un effet dose-dépendant sur la réponse angiogénique des cellules endothéliales, de faibles concentrations (20 à 50 µg apoB/ml) étant angiogéniques, alors que de plus fortes concentrations (100 µg apoB/ml) ne le sont pas, voire sont toxiques (au-delà de 200 µg d'apoB/ml). Cet effet biphasique pourrait être en rapport avec le niveau de stress oxydant généré en fonction des doses de LDLox utilisées. De récents travaux dans notre équipe retrouvent une activation de la SK1 dans des CML vasculaires sous l'effet de faibles doses d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alors que de fortes doses d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> n'activent pas SK1 (Cinq-Frais, Coatrieux et al. 2013). De façon intéressante nous avons également retrouvé dans notre modèle de cellules endothéliales, une activation de SK-1 avec de faibles doses de LDLox et une absence d'activation significative à plus fortes doses (figure 2.a.). Cet effet dual des LDLox sur l'activation de SK-1 montre l'importance du niveau de stress oxydant dans cette signalisation.



**Fig. 2.a. Effet dose des LDLox sur l'activation de la SK1 dans les HMEC-1.** De faibles doses, angiogéniques, activent la SK1 alors que de plus fortes doses, non angiogéniques, n'induisent pas une activation significative de l'enzyme.

Dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons évoqué le rôle des ROS (reactive oxygen species), générées suite à la captation de faibles doses de LDLox par leurs récepteurs CD36 et LOX-1, dans l'activation de SK1, la génération de S1P et l'angiogenèse. De la même manière, Dandapat (Dandapat, Hu et al. 2007) avait observé, sur des HCAEC en culture, un effet angiogénique des LDLox qui passe par le récepteur LOX-1, la NAD(P)H oxydase et la génération de ROS à l'origine d'une activation de p38MAPK comme cible du signal angiogénique des LDLox. Comme nos travaux ont montré que, dans notre modèle cellulaire (HMEC-1), les ROS sont aussi impliqués dans l'activation de la voie de SK1 (chapitre 1.1, Fig.5), ceci nous a amenés à explorer, si p38MAPK est impliquée dans la voie de signalisation aboutissant à l'activation de SK1 dans l'effet angiogénique des LDLox.

De plus, il a été démontré dans notre équipe, que de faibles doses de LDLox activent la voie des sphingolipides dans des CML vasculaires en culture. L'activation de la sphingomyélinase neutre de type 2 (nSMase2) et l'activation consécutive de la sphingosine kinase-1 (SK1) permettent la



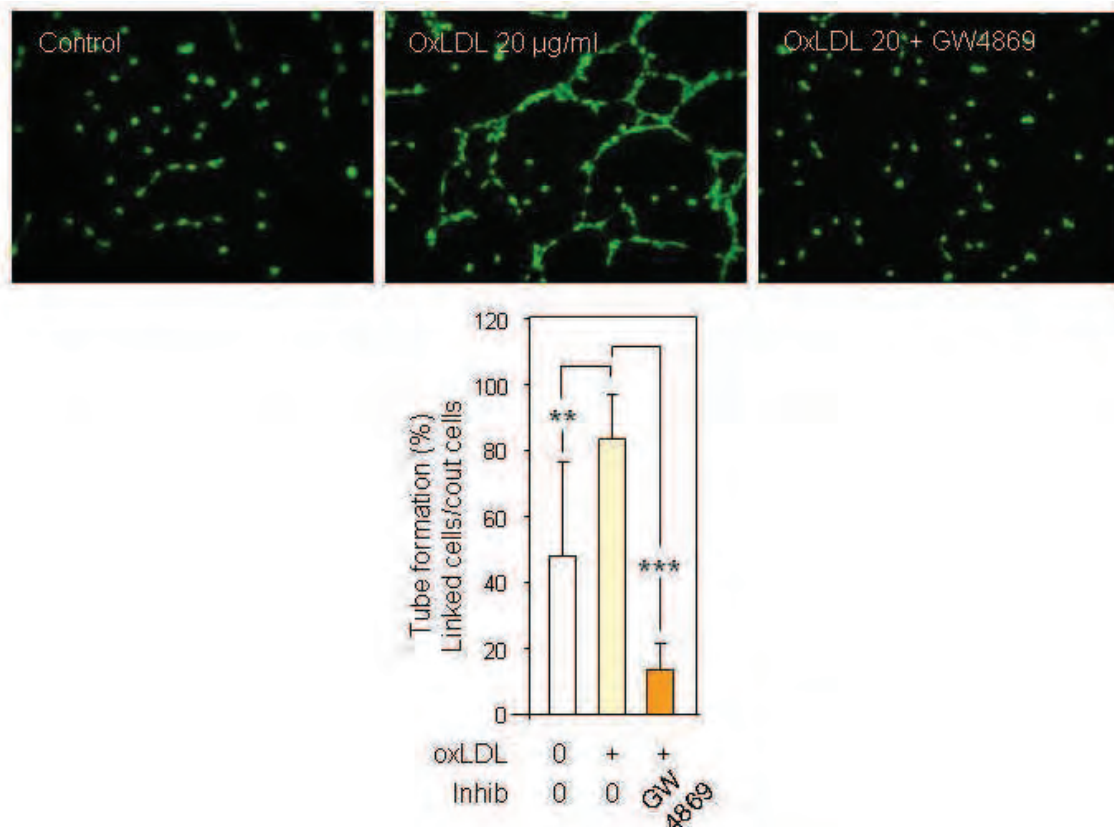
génération de S1P impliquée dans la signalisation mitogène des LDLox sur ces cellules (Auge, Nikolova-Karakashian et al. 1999; Auge, Garcia et al. 2002; Auge, Maupas-Schwalm et al. 2004).

La voie des sphingolipides nSMase2/SK1, qui correspond à l'activation en cascade des sphingomyélinase/céramidase/sphingosine kinase, est impliquée dans diverses signalisations cellulaires. Le céramide généré par la sphingomyélinase, et la S1P générée par la sphingosine kinase, ont des effets biologiques opposés puisque le céramide est antiprolifératif et pro-apoptotique alors que la S1P est impliquée dans la survie, la prolifération et l'angiogenèse, et inhiberait l'apoptose (Spiegel and Milstien 2003; Pavoine and Pecker 2009). Des travaux dans notre équipe ont montré que les LDLox peuvent faire pencher la balance soit vers la prolifération, à faibles doses soit vers l'apoptose des CML, à plus fortes doses (Auge, Andrieu et al. 1996; Escargueil-Blanc, Meilhac et al. 1997; Auge, Maupas-Schwalm et al. 2004).

L'effet prolifératif est fonction d'une balance S1P/céramide en faveur de la S1P induisant la survie cellulaire et la prolifération. Cette balance du rhéostat sphingolipidique S1P/céramide est modulée par l'importance du stress oxydant (Spiegel and Milstien 2003), et les travaux récents de notre équipe ont montré que le stress oxydant active séquentiellement et de façon coordonnée nSMase2 et SK1 via une signalisation impliquant le céramide, src et le PDGFR (Cinq-Frais, Coatrieux et al. 2013).

Nous nous sommes donc intéressés à cette cascade de signalisation en particulier à l'implication de la nSMase2 en amont de la SK-1 dans la signalisation angiogénique de faibles doses de LDLox.

### **2.1. La nSMase2 est impliquée dans la tubulogenèse des cellules endothéliales HMEC-1 induite par les LDL oxydées**



**Fig 2.1.1. GW4869, un inhibiteur pharmacologique de la nSMase2, bloque l'effet angiogénique des LDLox.** Le GW4869 est utilisé à la concentration de 10µM et déposé dans les puits de Matrigel™ en même temps que les LDLox (20 µg/ml) et les cellules (50 000/puits). La tubulogenèse est observée après 18 heures d'incubation à 37°C.

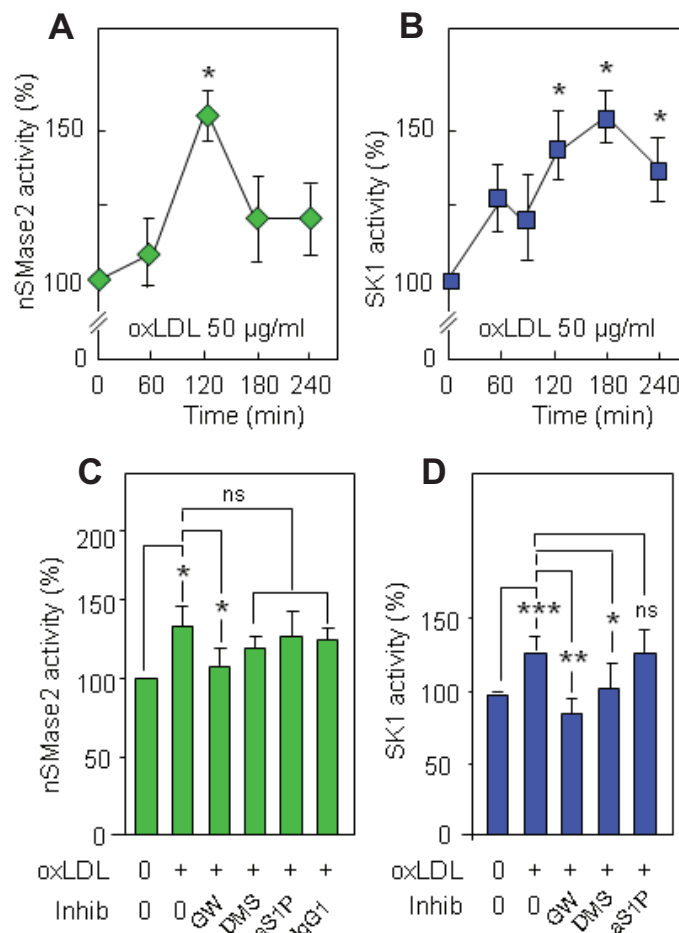


L'implication de la nSMase2 dans cette signalisation angiogénique induite par de faibles doses des LDLox est suggérée par l'effet du GW4869, un inhibiteur pharmacologique de la nSMase2, qui inhibe significativement la tubulogenèse induite par les LDLox. Des expériences de tubulogenèse *in vitro* sur Matrigel™ utilisant un siRNA de nSMase2 sont en cours pour apporter davantage d'arguments en faveur du rôle de cette enzyme dans cette signalisation.

De plus il reste à connaître l'implication de la nSMase2 dans l'activation de SK1 et la génération de S1P pour pouvoir parler de l'implication de la voie des sphingolipides dans la signalisation angiogénique de faibles doses de LDLox.

C'est pourquoi nous avons réalisé deux cinétiques d'activation enzymatique dans notre modèle d'HMEC-1, en l'absence puis en présence de différents inhibiteurs de la voie des sphingolipides.

**2.2. L'activation coordonnée de nSMase2 et SK1 est nécessaire pour l'angiogenèse induite par les LDL oxydés**



**Fig 2.2.1. (A, B) Activation enzymatique de la nSMase2 et de la SK1 sous l'effet de LDLox à doses angiogéniques dans des HMEC-1. (C, D) Activités enzymatiques de nSMase2 et SK1 en présence d'inhibiteurs de la voie des sphingolipides, GW4869, DMS et l'anticorps anti-S1P bloquant.**

L'activation de la nSMase2 précède celle de SK1 avec un pic à 2H alors que la SK1 voit son activité augmenter à partir de 2h mais présente un pic à 3h. De plus les deux activités enzymatiques sont

inhibées en présence du GW (inhibiteur pharmacologique de nSMase2) alors que seule l'activité de SK1 est inhibée par le DMS (inhibiteur pharmacologique de la SK1). (Fig.2.2.1)

Ces résultats sont en faveur d'une implication de la nSMase2 dans l'activation de la SK1 et la génération de S1P consécutivement à la stimulation des cellules par des LDLox à doses angiogéniques.

La voie des sphingolipides nSMase2/SK1 semble donc impliquée dans l'effet angiogénique des LDLox. Enfin, il est à noter que l'anticorps anti-S1P bloquant n'a pas d'effet significatif sur l'une ou l'autre des activités, écartant la possibilité d'un rétrocontrôle sur la voie enzymatique.

Nous avons vu dans la première partie de ces résultats, en accord avec Dandapat (Dandapat, Hu et al. 2007), une implication de stress oxydant dans l'effet angiogénique de faibles doses de LDLox. Nous avons retrouvé que cet effet est médié par l'activation de SK1 et la génération consécutive de S1P au niveau des HMEC-1. Dans les travaux de Dandapat, la phosphorylation et l'activation de p38MAPK est indispensable à la transduction du signal angiogénique de faibles doses de LDLox, initiée par l'activation de NOX-1 et la génération d'un stress oxydant.

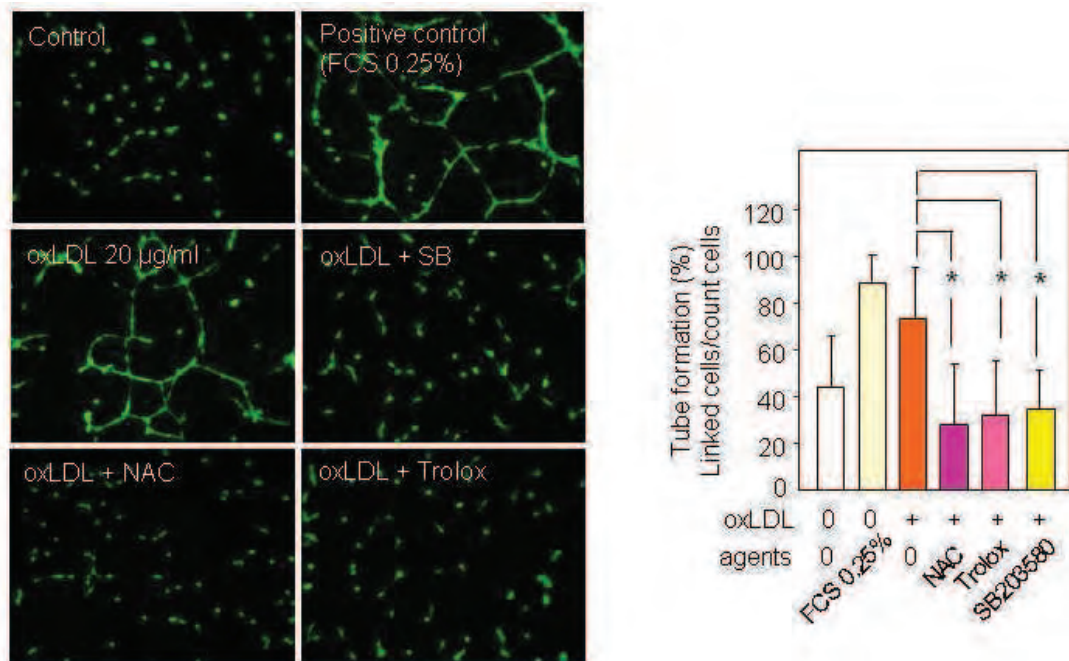
Comme nous venons de le voir, l'activation de SK1, sous l'effet de doses angiogéniques de LDLox, nécessite l'activation de nSMase2 en amont, et compte tenu du fait que la génération de ROS est impliquée dans l'activation de SK1, nous avons recherché l'implication d'un stress oxydant, ainsi que de p38MAPK dans l'activation de nSMase2.

### **2.3. Implication du stress oxydant et de p38MAPK dans l'activation de la voie des sphingolipides et l'angiogenèse induite par les LDL oxydées**

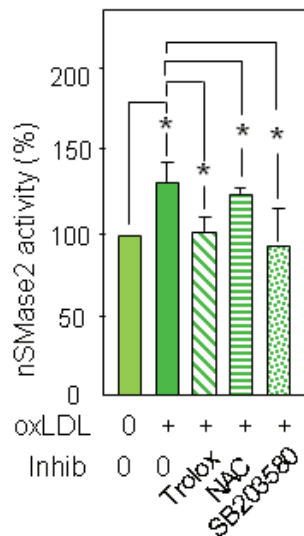
Le stress oxydant joue un rôle important dans l'activation de la nSMase (Levy, Castillo et al. 2006), notamment sous l'effet de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Cinq-Frais, Coatrieux et al. 2013).

Nous avons vu que l'activation de la nSMase2 est dépendante de sa phosphorylation (Filosto, Ashfaq et al. 2012) qui peut survenir en réponse à différents agents signalants. La nSMase2 peut être notamment phosphorylée par p38MAPK sous l'effet du TNF- $\alpha$ , et induire une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, ICAM-1 et VCAM-1 (Clarke, Truong et al. 2007), ainsi qu'une augmentation de la synthèse de eNOS via l'activation de SK1 et la génération de S1P (De Palma, Meacci et al. 2006), permettant d'évoquer l'implication de ces deux protéines (nSMase2 et p38MAPK) dans la migration et l'angiogenèse des cellules endothéliales.

En tenant compte de ces données, nous avons recherché l'effet de deux antioxydants, la NAC (N-acétyl-cystéine) et le trolox ainsi que l'effet du SB203580 (inhibiteur de l'activité de phospho-p38MAPK), sur l'activation à 2h de la nSMase2, et sur la tubulogenèse *in vitro*, induite par des doses angiogéniques des LDLox.

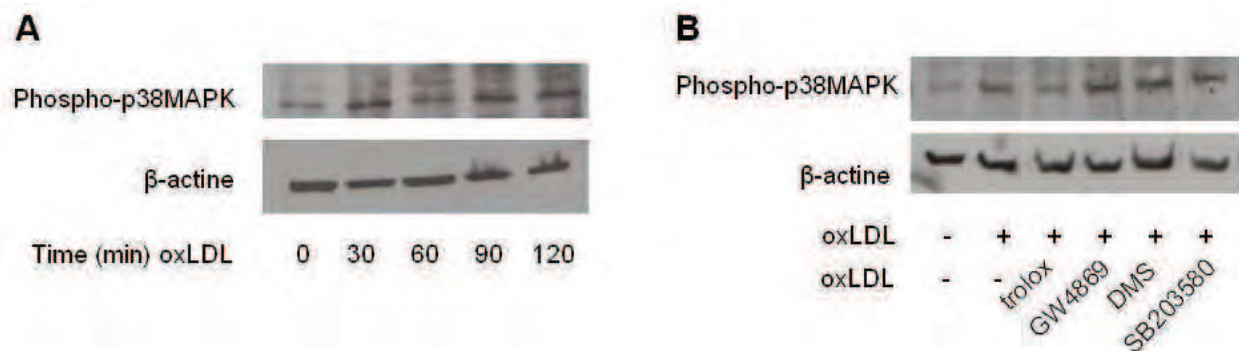


**Fig 2.3.1. Blocage de l'effet angiogénique des LDLox *in vitro*, par des antioxydants NAC et trolox, et par le SB203580, un inhibiteur pharmacologique de l'activité de phospho-p38MAPK.** Le trolox est utilisé à 10µM, la NAC à 1mM, le SB203580 à 10µM et sont déposés sur le Matrigel™ en même temps que les LDLox (20µg/ml) et les cellules (50 000/puits), puis incubés à 37°C pendant 18 heures.



**Fig 2.3.2. Inhibition de l'activation de nSMase2 dépendant des LDLox, en présence des antioxydants NAC et trolox, et en présence de SB203580, un inhibiteur pharmacologique de l'activité de phospho-p38MAPK.** Le trolox est utilisé à 10µM, la NAC à 1mM, le SB203580 à 10µM et sont pré-incubés pendant 30 minutes avant la stimulation des cellules par 50 µg/ml des LDLox pendant 2 heures.

Ces résultats montrent que le stress oxydant et l'activité de p38MAPK sont nécessaires à l'activation de la voie des sphingolipides qui médie la signalisation angiogénique des LDLox sur les HMEC-1. L'activation de p38MAPK étant consécutive à sa phosphorylation, nous nous sommes intéressés à la cinétique de phosphorylation de p38MAPK en western blot sur des extraits cellulaires d'HMEC-1, ainsi qu'aux modulations de cette phosphorylation sous l'effet de divers inhibiteurs.



**Fig 2.3.3. (A) Cinétique de phosphorylation de p38MAPK dans les HMEC-1 sous l'effet de doses angiogéniques de LDLox. (B) Inhibition de la phosphorylation par un antioxydant, le trolox.** Le GW4869 est utilisé à la concentration de 10 $\mu$ M, le SB203580 à 10 $\mu$ M, le DMS à 1 $\mu$ M, et sont pré-incubés pendant 30 minutes avant la stimulation des cellules par 50  $\mu$ g/ml de LDLox. L'anticorps monoclonal Phospho-p38MAPK (Thr180/Tyr182) vient de chez Cell Signaling.

Nous retrouvons une phosphorylation de p38MAPK dès 30 minutes de stimulation des cellules par des doses angiogéniques de LDLox, ce qui correspond à un temps d'activation plus précoce que celui de la nSMase2 (2h) et de la SK1 (2h-3h), ajoutant un argument supplémentaire pour positionner p38MAPK en amont de la voie des sphingolipides, d'autant plus que le DMS n'a pas d'effet sur la phosphorylation de p38MAPK induite par les LDLox (figure 2.3.3.).

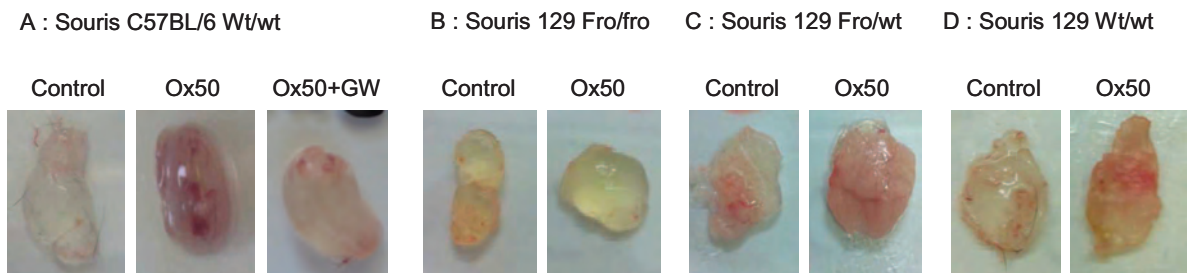
De plus il est intéressant de noter que la phosphorylation de p38MAPK observée à 30 minutes est inhibée par l'utilisation d'un antioxydant, le trolox (figure 2.3.3.), plaçant l'activation de p38MAPK en aval de la génération de ROS par les cellules.

Enfin, comme attendu, le SB203580 qui est un inhibiteur de l'activité kinase de p38MAPK mais qui n'empêche pas sa phosphorylation, n'a pas d'effet sur la phosphorylation de cette protéine induite par les LDLox.

En conclusion de cette partie, nous pouvons dire que nous avons montré que la génération de SIP consécutive à l'activation de la SK1 sous l'effet des LDLox à doses angiogéniques, est étroitement liée à l'activation en amont de la nSMase2 dans des cellules endothéliales *in vitro*. L'utilisation du GW4869, un inhibiteur pharmacologique de la nSMase2 bloque efficacement l'activation de la SK1 et l'angiogénèse, induites par les LDLox *in vitro* sur des HMEC-1. Des expérimentations de tubulogénèse et d'activation enzymatique sous l'effet de doses angiogéniques de LDLox en présence de siRNA de nSMase2 sont actuellement en cours afin de fournir des arguments supplémentaires concernant l'implication de la voie des sphingolipides dans l'angiogénèse induite par les LDLox *in vitro*.

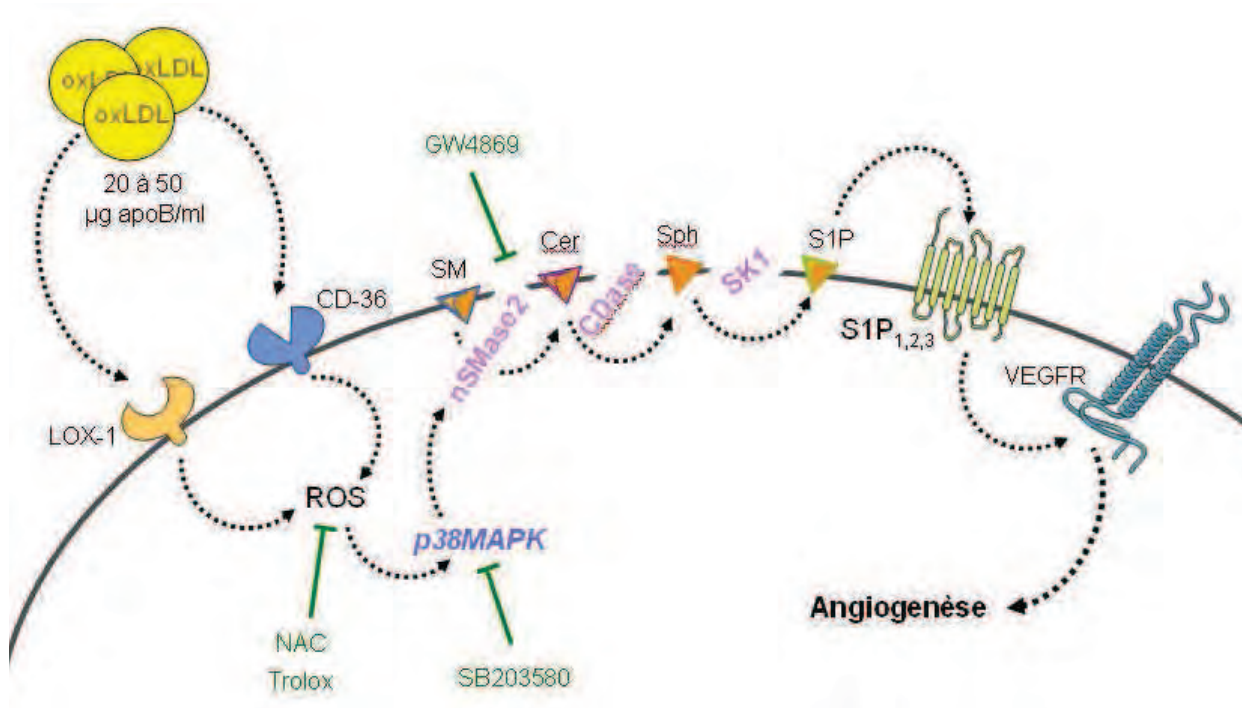
Un travail montrant l'implication de la nSMase2 a également été débuté *in vivo* chez des souris C57BL/6 ayant des « plugs » sous cutanés de Matrigel™ au niveau des flancs, contenant des LDLox à doses angiogéniques ou seulement du PBS (plug contrôle), et recevant des injections régulières de GW par voie systémique à la dose de 1mg/kg de poids corporel, ainsi que chez des souris *Fro (fragilitas ossium)* (ayant un gène *smpd3* codant pour une nSMase2 non fonctionnelle) ayant également des « plugs » de Matrigel™ au niveau des flancs, contenant des doses angiogéniques de LDLox ou seulement du PBS (plug contrôle). Les résultats sont encourageants mais une forte variabilité interindividuelle de l'angiogénèse au niveau des « plugs » chez la souris nous a conduit à utiliser un autre modèle *in vivo*, la membrane chorio-allantoïque d'embryons de poulets (CAM), qui semble pour l'instant plus reproductible et qui permet d'inclure un plus grand nombre d'individus à

chaque expérimentation, alors qu'il est plus difficile d'inclure un très grand nombre de souris *Fro* <sup>-/-</sup> car ces animaux ont un taux de reproduction assez faible.



**Fig 2.3.4. Angiogenèse *in vivo* sur « plugs » de Matrigel™ injectés au niveau des flancs chez la souris.** L'angiogenèse dans les plugs contenant de faibles doses (50 µg apoB/ml) de LDLox est comparée au plug contrôle (PBS seul) pour chaque animal. Les souris sauvages C57/B16 sont injectées en intrapéritonéal tous les 3 jours avec du GW à la dose de 1mg/kg de poids corporel. Les souris *Fro* ne reçoivent aucun traitement après la mise en place des plugs.

Dans les expérimentations *in vitro*, l'utilisation de molécules antioxydantes comme le trolox ou la N-acétylcystéine (NAC) bloquent de façon significative l'activation enzymatique de la nSMase2 et l'angiogenèse qui s'ensuit, soulevant l'importance du stress oxydant dans notre étude. La phosphorylation de p38MAPK survenant plus précocement que l'activation de la nSMase2 et de la SK1, ainsi que le blocage de l'activation de nSMase2 par le SB203580, un inhibiteur de l'activité de phospho-p38MAPK, suggère que l'implication du stress oxydant dans l'activation de la voie des sphingolipides se fait par l'intermédiaire de p38MAPK, déjà décrite comme indispensable pour la transmission du signal angiogénique des LDL oxydées (Dandapat, Hu et al. 2007).



**Fig. 2.3.5. Schéma de synthèse de la deuxième partie.**

L'effet angiogénique de faibles doses (20 à 50 µg/ml) de LDL oxydées sur les HMEC-1, nécessite l'activation de la voie des sphingolipides nSMase2/SK1 *via* la génération de ROS et l'activation de p38MAPK.



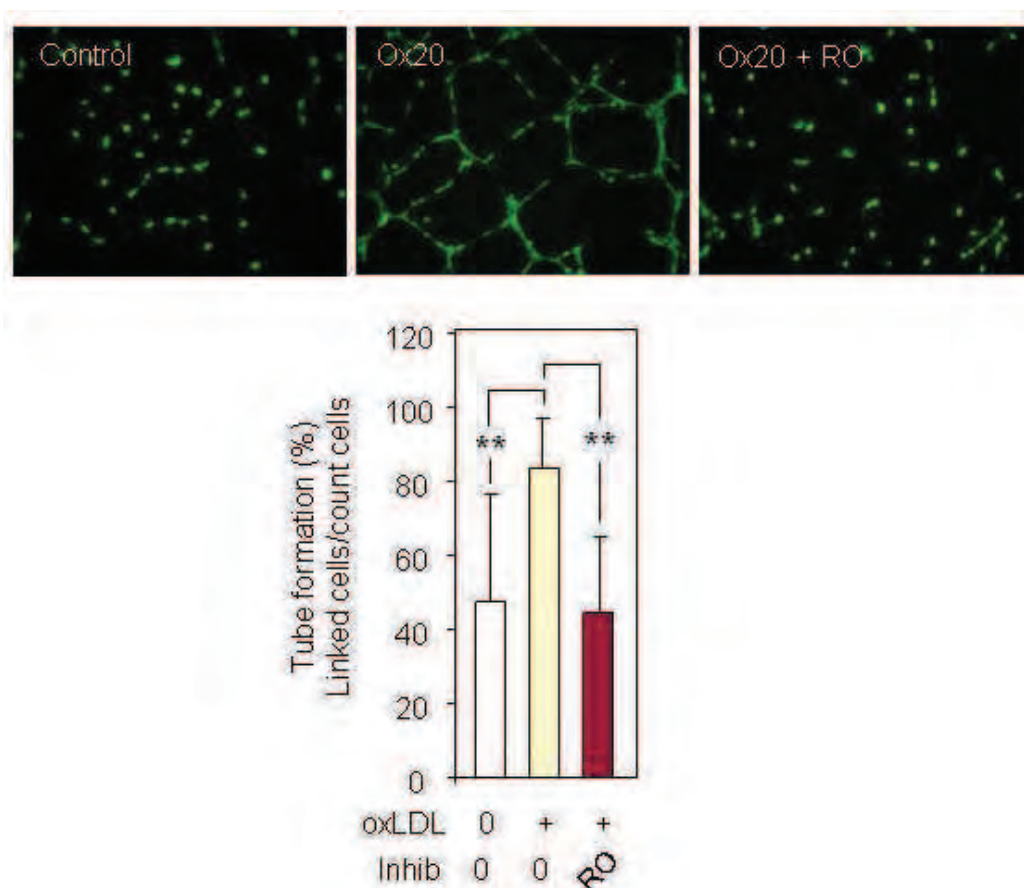
Ce travail nous a donc permis de faire le lien entre le stress oxydant et la génération de S1P à l'origine de l'angiogénèse observée sous l'effet des LDLox à faible dose.

Cependant des questions persistent, notamment sur les mécanismes d'activation de la nSMase2 et sur le lien entre p38MAPK et la nSMase2.

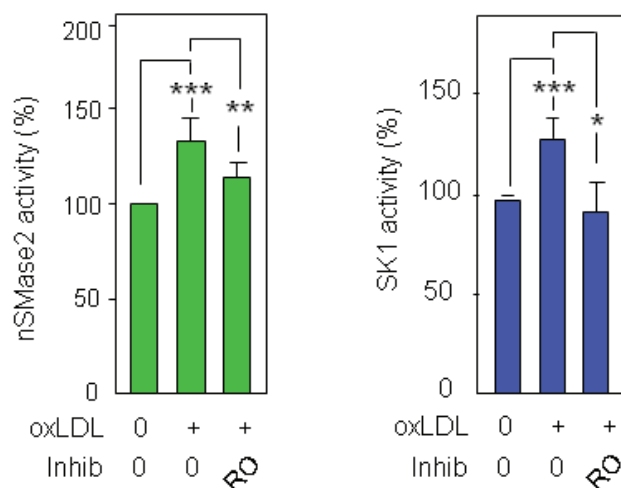
#### **2.4. Des métalloprotéases sont impliquées dans l'activation de la voie des sphingolipides et l'angiogénèse induite par les LDL oxydées**

De précédents travaux dans l'équipe ont montré le rôle des métalloprotéases MT1-MMP et MMP-2 dans l'activation de la voie des sphingolipides impliquée dans la prolifération des CML vasculaires sous l'effet de faibles doses de LDL oxydées (Auge, Maupas-Schwalm et al. 2004). De plus, les métalloprotéases semblent jouer un rôle dans l'activité angiogénique de la S1P sur des cellules souches de moelle osseuse (Annabi, Thibeault et al. 2003).

Nous nous sommes intéressés à ces enzymes comme activateurs potentiels de la voie des sphingolipides dans la signalisation angiogénique des LDLox. Nous avons utilisé le Ro28-2653, un inhibiteur des gélatinases, MMP-2 et MMP-9, et observé son effet sur la tubulogénèse et l'activation enzymatique de la nSMase2 et de la SK1 induites par les LDLox.



**Fig 2.4.1. Inhibition de l'effet angiogénique des LDLox avec Ro28-2653, un inhibiteur des gélatinases.** Le Ro28-2653 est utilisé à la concentration de 20nM et déposé dans les puits de Matrigel™ en même temps que les LDLox (20 µg/ml) et les cellules (50 000/puits). Le temps d'incubation est de 18 heures à 37°C.



**Fig 2.4.2. Effet inhibiteur de Ro28-2653 sur l'activation de la nSMase2 et de la SK1 induite par des doses angiogéniques de LDLox.** Le Ro28-2653 est utilisé à la concentration de 20nM et pré-incubé 30 minutes avant la stimulation des cellules avec 50 µg/ml de LDLox pendant 2h (nSMase2) et 3h (SK1).

L'utilisation du Ro28-2653 à la concentration de 20 nM a permis d'observer une inhibition de la tubulogénèse ainsi qu'une inhibition de l'activation enzymatique de la nSMase2 et de la SK1 par des doses angiogéniques de LDLox, permettant d'envisager un rôle des gélatinases dans l'activation de la voie des sphingolipides impliquée dans la signalisation angiogénique des LDL oxydées.

Ayant à notre disposition un modèle de souris KO pour la MMP-2 (souris Gela) nous avons tenté une expérimentation d'angiogénèse *in vivo* à l'aide de « plugs » de Matrigel™ disposés en sous-cutané au niveau des flancs et contenant soit de faibles doses de LDLox (50 µg/ml) soit du PBS seul pour les « plugs » contrôles. Nous n'avons malheureusement pas pu constater un réel blocage de l'angiogénèse *in vivo* dans les « plugs » contenant les LDLox, de plus les grandes variabilités interindividuelles impliquaient d'inclure un grand nombre d'individus chez des animaux à faible niveau de renouvellement (KO MMP-2). Nous nous tournerons ici aussi vers le modèle de la CAM si les résultats des expérimentations en cours sont concluants.

Nous avons supposé que cette absence d'inhibition de l'angiogénèse chez les souris MMP-2 KO par rapport aux hétérozygotes, pouvait être liée à une surexpression réactionnelle d'une autre gélatinase, comme MMP-9, pour compenser le déficit fonctionnel liée à l'absence de MMP-2. Il serait intéressant de développer un modèle de primocultures de cellules vasculaires à partir de souris Gela KO qui servirait à étudier l'expression génique et protéique des métalloprotéases dans ce contexte. C'est un projet à part entière et une des perspectives de ce travail, d'autant que MT1-MMP, une métalloprotéase membranaire qui active MMP-2, est impliquée dans la migration cellulaire et la tubulogénèse des cellules endothéliales, en collaboration avec la S1P (Langlois, Gingras et al. 2004), qui elle-même régule le niveau d'expression de MT1-MMP (Annabi, Thibeault et al. 2003). Cette transmission du signal angiogénique de la S1P via MT1-MMP semble se faire *via* le récepteurs EGFR au sein d'un complexe membranaire qui regroupe S1P<sub>1,3</sub>/Gi/Scr/MT1-MMP/EGFR/cavéoline-1 à l'intérieur des cavéoles (Labrecque, Nyalendo et al. 2004; Langlois, Nyalendo et al. 2007).

Au vu de l'implication des métalloprotéases dans la transmission du signal angiogénique de la S1P et leur rôle dans l'activation de la voie des sphingolipides, nous nous posons la question de leur situation par rapport à p38MAPK dans cette cascade de signalisation, et de l'existence d'autres

intermédiaires pouvant transmettre l'information entre la génération de ROS/activation de p38MAPK et l'activation de la voie des sphingolipides.

Connaissant le rôle des connexines, et en particulier la connexine-43, dans la migration cellulaire (Leaphart, Dai et al. 2008) et l'angiogenèse (Wang, Su et al. 2013) ainsi que de leur association avec la cavéoline-1 au niveau des rafts lipidiques membranaires (Cascio 2005; Strale, Clarhaut et al. 2012), comme MT1-MMP, nous nous posons la question de l'interaction de ces protéines avec les métalloprotéases, p38MAPK et les médiateurs sphingolipidiques au niveau des rafts lipidiques membranaires. Il est décrit que la connexine-43 est une cible de p38MAPK (Schulz, Gres et al. 2003), à l'origine d'une phosphorylation des connexines et d'une ouverture des jonctions gap (Naitoh, Yano et al. 2009) permettant la transmission de signaux entre les cellules. Mais il est inversement décrit que l'extrémité C-terminale de la connexine-43 augmente la migration cellulaire dépendante de p38MAPK, indépendamment de l'assemblage des connexons (Behrens, J., P. Kameritsch, et al. 2010), témoignant de l'importance de ces molécules dans la signalisation cellulaire.

Les rafts lipidiques sont des microdomaines membranaires riches en sphingolipides et en cholestérol, impliqués dans le trafic et la signalisation de nombreuses protéines.

### **2.5. La connexine-43 (Cx43) est impliquée dans l'activation de la cascade des sphingolipides et l'angiogenèse induite par les LDL oxydées**

Les jonctions communicantes (gap-junctions), sont un assemblage de canaux situés à la membrane plasmique, et qui permettent des échanges cytoplasmiques directs intercellulaires, sans transit dans l'espace extracellulaire (Solan and Lampe 2005). Ces canaux permettent le passage de petites molécules (ions, acides aminés, seconds messagers en particulier  $Ca^{2+}$ ,  $IP_3$ , cAMP etc...). Les jonctions communicantes sont formées, entre autre, de protéines transmembranaires spécifiques, les connexines, dont il existe une vingtaine de membres chez les vertébrés (Solan and Lampe 2005). Les jonctions communicantes sont essentielles dans de nombreux processus physiologiques comme la prolifération cellulaire ou l'angiogenèse (Gartner, Ziegelhoffer et al. 2012; Wang, Su et al. 2013). La principale protéine constitutive des jonctions gap exprimées dans les cellules vasculaires (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) est la connexine-43 (Cx-43). L'activité de la Cx-43 est régulée par sa phosphorylation, pouvant être médiée par plusieurs kinases, comme PI3K/Akt, PKC, MAPK ou src, qui modulent l'assemblage des jonctions gap et leur fonctionnement. Par exemple, la phosphorylation de Cx43 sur tyrosine par src, serait associée à une dissociation des gap-jonctions. De même, la phosphorylation par MAPK ou la PKC sur serine 368, inhibe les communications intercellulaires. A l'inverse, la phosphorylation de Cx43 par Caseine kinase (CK1) sur serine 325, ou par la PKA (sur serine 364), serait nécessaire à l'assemblage des gap-jonctions (Solan and Lampe 2005; Solan and Lampe 2009).

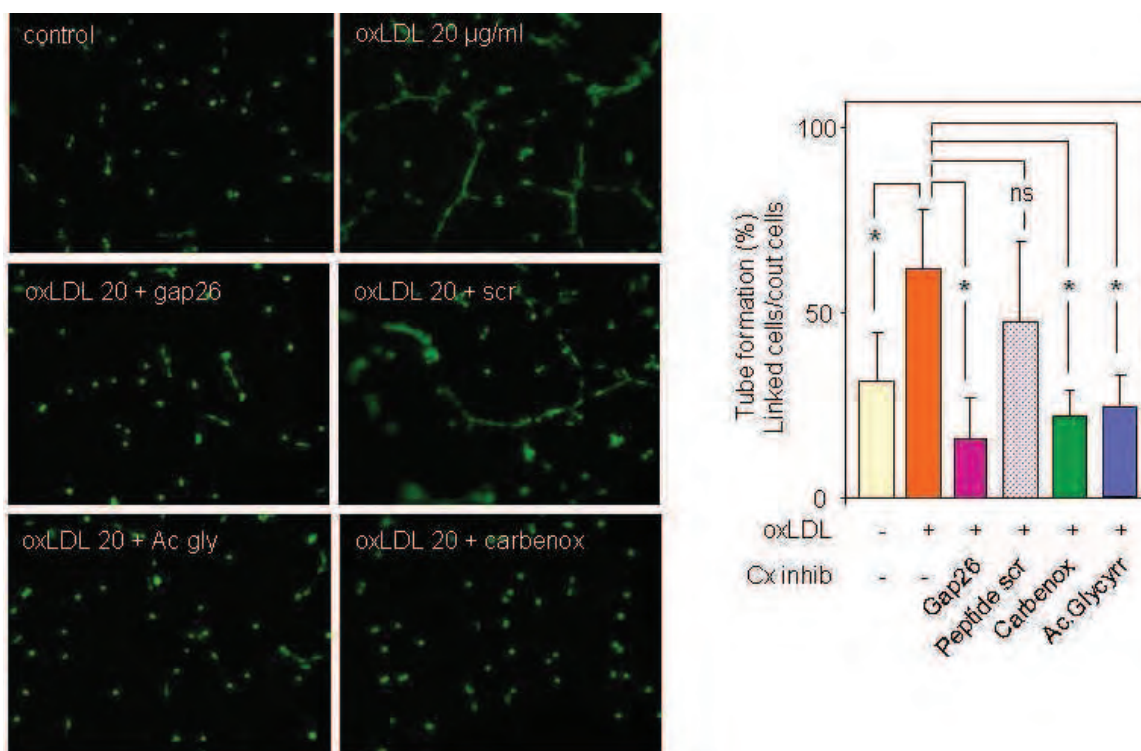
La localisation de la Cx-43 au niveau des rafts lipidiques semble concomitante de sa phosphorylation et de l'assemblage des connexons, indispensables à la communication intercellulaire et à la migration (Leaphart, Dai et al. 2008). Dans certains types de cellules cancéreuses, l'association de la Cx-43 à la cavéoline-1 permet de maintenir la cohésion des jonctions gap et de limiter la dysrégulation de l'adhésion et de la migration cellulaire à l'origine de l'invasion des cellules tumorales (Langlois, Cowan et al. ; Strale, Clarhaut et al. 2012).

La Cx-43 joue un rôle important dans la croissance et la prolifération des cellules endothéliales progénitrices *in vitro* et *in vivo* (Wang, Su et al. 2013), ainsi que dans la migration endothéliale, grâce à l'assemblage des gap junctions et à la propagation d'agents de signalisation entre les cellules adjacentes *in vivo* et *in vitro* sur des cellules confluentes (Feine, Pinkas et al. 2012). La Cx-43 semble également impliquée dans la migration des cellules endothéliales indépendamment de l'assemblage des jonctions communicantes, grâce à sa partie C-terminale cytosolique impliquée dans la phosphorylation et l'activation de p38MAPK pro-migratoire (Behrens, Kameritsch et al. 2010).

Du fait de l'implication des connexines, et en particulier de la connexine-43 dans la physiologie du système cardiovasculaire (Solan and Lampe 2005), ainsi que leur rôle dans le développement de l'athérosclérose (Brisset, Isakson et al. 2009) et l'angiogenèse (Gartner, Ziegelhoffer et al. 2012), nous nous sommes intéressés à ces protéines qui pourraient participer à la transmission du signal angiogénique entre les cellules endothéliales pour propager la signalisation induite par les LDLox.

### **2.5.1. Les connexines sont impliquées dans la signalisation angiogénique des LDL oxydées**

Nous avons testé des inhibiteurs pharmacologiques des connexines, la carbenoxolone et l'acide glycyrrhétinique, ainsi qu'un inhibiteur spécifique de la connexine-43, le peptide gap26, sur l'effet angiogénique des LDLox en Matrigel™ *in vitro*. (figure 2.5.1.)



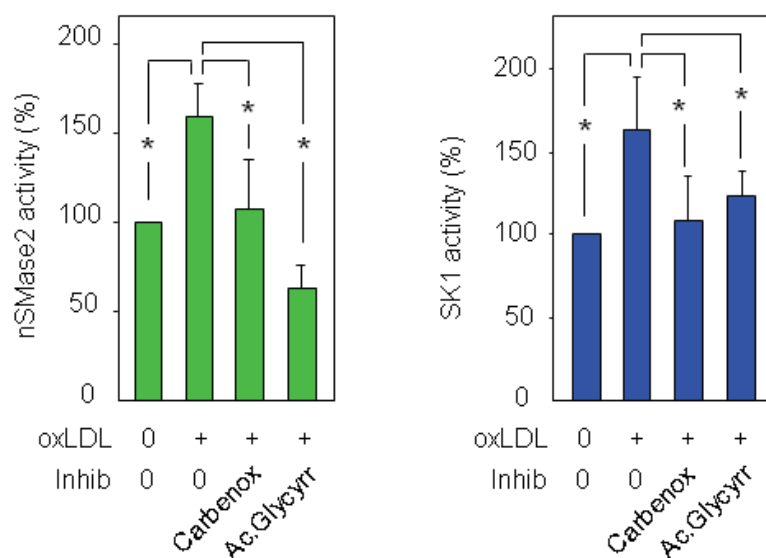
**Fig 2.5.1. Blocage de l'effet angiogénique des LDLox par l'utilisation d'inhibiteurs non sélectifs des connexines, la carbenoxolone et l'acide glycyrrhétinique, ainsi que par un inhibiteur spécifique de la connexine-43, le peptide gap26.** La carbenoxolone est utilisée à la concentration de 10µM, l'acide glycyrrhétinique à 10µM, le peptide gap26 et le peptide scramble à 150µM et sont déposés dans les puits de Matrigel™ avec les LDLox (20µg/ml) et les cellules (50 000/puits), puis incubés pendant 18 heures à 37°C.

Les différents inhibiteurs des connexines utilisés bloquent de façon efficace la tubulogénèse induite par les LDLox (le peptide ‘scramble’ du gap26 n’ayant pas d’effet significatif). Les connexines et la Cx-43 en particulier, semblent donc impliquées dans la médiation de l’effet angiogénique des LDLox.

Nous avons étudié la place de ces connexines par rapport à la cascade de signalisation angiogénique qui implique les récepteurs des LDLox (CD36 et LOX-1), le stress oxydant, p38MAPK et la voie des sphingolipides pour aboutir à la génération de la S1P angiogénique.

### **2.5.2. Les inhibiteurs de connexines inhibent la voie des sphingolipides sous l’effet des LDL oxydées à doses angiogéniques**

Les gap-jonctions sont impliquées dans la transmission intercellulaire de petites molécules et seconds messagers, impliqués dans la prolifération ou l’angiogénèse (Solan and Lampe 2005). Les résultats précédents montrent que les inhibiteurs de connexines bloquent l’angiogénèse induite par les LDL oxydées. Nous avons testé l’effet de ces agents sur l’activation de la voie de sphingolipides et la génération consécutive de S1P angiogénique, et plus précisément la nSMase2 et la SK1 (figure 2.5.2).



**Fig 2.5.2. Effet bloquant d’inhibiteurs des connexines, la carbenoxolone et l’acide glycyrrhétinique, sur l’angiogénèse induite par les LDLox.** La carbenoxolone est utilisée à la concentration de 10µM, l’acide glycyrrhétinique à 10µM, les deux sont pré-incubés 30 minutes avant de stimuler les HMEC-1 avec 50µg/ml de LDLox pendant 2h (nSMase2) ou 3h (SK1).

La carbenoxolone et l’acide glycyrrhétinique bloquent l’activation de la nSMase2 et de SK1 induite par les LDLox (Fig.2.5.2). Ces travaux devraient être confirmés par l’utilisation de Gap 26, peptide spécifique de Cx43, ainsi que par des siRNAs dirigés contre Cx43, afin de valider l’implication de cette connexine. Cependant les résultats observés en présence des inhibiteurs pharmacologiques suggèrent fortement que l’activité des connexines se situe en amont de la voie des sphingolipides, et est nécessaire à l’activation de nSMase2 et SK1, peut-être via la diffusion des ROS qui sont nécessaires à l’activation de cette voie, comme cela a déjà été décrit sur des cellules endothéliales de cœur ou de vaisseaux cérébraux de souris (Feine, Pinkas et al. 2012).



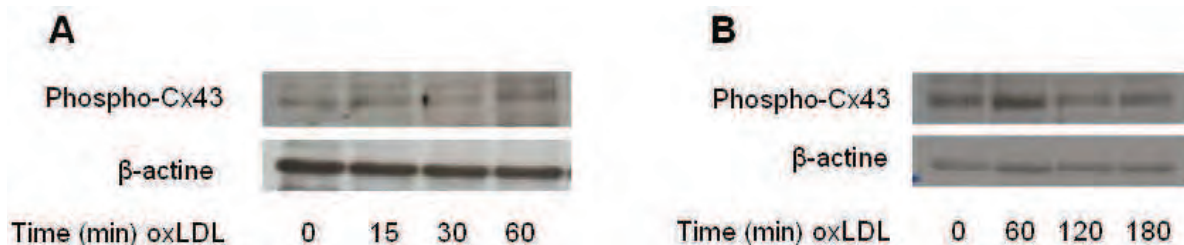
Le fonctionnement des gap-jonctions est assuré par l'assemblage de deux connexons de cellules adjacentes, laissant alors passer des petites molécules de signalisation, comme la S1P ou les ROS.

La phosphorylation des connexines régule l'assemblage ou la dissociation des gap-jonctions. Plusieurs kinases, comme PI3K/Akt, PKA, CK-1, PKC, MAPK et src, sont impliquées dans sa phosphorylation, sur des résidus différents permettant l'activation ou l'inhibition de ces protéines (Solan and Lampe 2005; Solan and Lampe 2009). La connexine-43 peut également être phosphorylée sous l'effet de la S1P via ses récepteurs (Morel, Frias et al. 2012), qui activent PI3K/Akt ou la PKC (Brinkmann 2007; Morel, Frias et al. 2012).

La formation/dissociation des gap-jonctions est corrélée aux différentes étapes du cycle cellulaire, et est régulée par la phosphorylation des connexines par plusieurs kinases, en particulier celles impliquées dans la prolifération cellulaire, telles que MAPK ou PKC (Solan and Lampe 2005).

Dans les étapes précoces de prolifération, la phosphorylation de Cx43 sur serine 368 par MAPK ou par différentes isoformes de la PKC, induit une dissociation des gap-jonctions, qui est nécessaire pour la mitose et les signaux mitogènes.

Dans ce contexte, on devrait observer une dissociation rapide des gap-jonctions, et donc une phosphorylation sur serine 368 de Cx43, sous l'effet des LDL oxydées qui activent les MAPK et la PKC dans les CML humaines et de lapin (Auge, Garcia et al. 2002; Auge, Maupas-Schwalm et al. 2004). Nos résultats préliminaires montrent en effet que les doses angiogéniques de LDL oxydées stimulent une phosphorylation transitoire de Cx43 après 1h de stimulation (figure 2.5.3), suivie d'un retour à une forme non phosphorylée sur ce résidu pour les temps plus longs. On peut faire l'hypothèse que les gap-jonctions sont rapidement dissociées sous l'effet des LDL oxydées, via la phosphorylation de Cx43 sur serine 368, puis se reforment progressivement, participant ainsi à l'activation de la voie des sphingolipides.



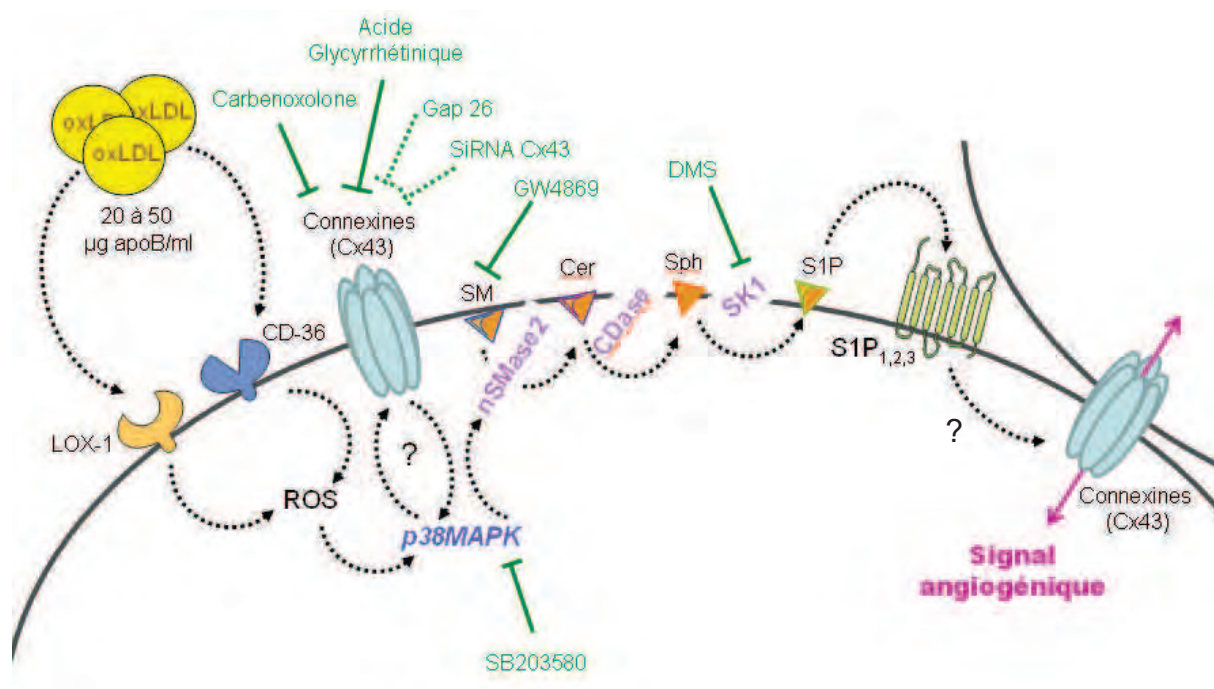
**Fig 2.5.3. (A) Cinétique de phosphorylation de connexine-43 (Cx-43) en WB, temps courts. (B) Cinétique de phosphorylation de connexine-43 (Cx-43) en WB, temps longs.** Les HMEC-1 sont stimulées par 50 µg/ml de LDLox pendant les temps indiqués. L'anticorps anti-phospho-connexine 43 (Ser368) vient de chez Millipore.

Par ailleurs, Cx43 est une cible de p38MAPK qui induit sa phosphorylation et l'assemblage des connexons à l'origine d'une augmentation des échanges entre les cellules, ce qui joue notamment un rôle dans l'étendue des lésions d'ischémie/reperfusion après un infarctus du myocarde (Schulz, Gres et al. 2003; Naitoh, Yano et al. 2009). Par ailleurs le domaine C-terminal de la connexine-43 pourrait potentialiser l'activation de p38MAPK et la migration cellulaire, indépendamment de l'assemblage des jonctions gap (Behrens, Kameritsch et al. 2010). L'activation précoce de p38MAPK par les LDL oxydées et son implication dans leur effet angiogénique, suggère des liens entre p38MAPK et Cx43, qui seront explorés.

La reformation des gap-jonctions sera étudiée par des expériences d'immunofluorescence pour la localisation cellulaire de Cx43 et de dye-transfer, idéalement par microinjection de sondes fluorescentes telles qu'Alexa 488 ou FW 570, ou alors par technique de 'scrape-loading' et diffusion d'une sonde de type 'Lucifer Yellow'. Ces techniques permettront de visualiser d'une part la localisation cellulaire des connexines, au niveau des membranes ou du cytoplasme, et d'autre part, la diffusion des sondes fluorescentes qui devrait être d'autant plus importantes que les gap-jonctions sont ouvertes et activées. L'utilisation des inhibiteurs de la voie des sphingolipides ou de kinases potentiellement impliquées dans la phosphorylation de Cx43 permettra d'établir une séquence d'évènements liés à la dissociation/reformation des jonctions, et leur place par rapport à l'activation de la nSMase2 et SK1.

Il est possible, qu'une fois le contact intercellulaire établi, ces jonctions communicantes servent à la propagation d'éléments de signalisation entre les cellules potentialisant la tubulogénèse *in vitro*, qui semble d'ailleurs s'accélérer une fois les cellules en contact.

Enfin, il serait intéressant de pouvoir établir l'implication des connexines dans l'angiogénèse induite par les LDLox *in vivo*, sur un modèle de membrane chorioallantoïque d'embryon de poulet, ou dans un système de plugs de Matrigel™ chez la souris, à l'aide des différents inhibiteurs utilisés *in vitro*.



**Fig. 2.5.4. Schéma de synthèse sur l'implication des connexines dans la cascade angiogénique induite par les LDLox sur les HMEC-1.**

L'effet angiogénique de faibles doses (20 à 50 µg/ml) de LDL oxydées sur les HMEC-1, implique les connexines, en particulier la connexine-43, dans l'activation de la voie des sphingolipides. La situation de Cx-43 par rapport à p38MAPK dans cette signalisation reste encore à préciser.

En conclusion, de ce travail, nous pouvons dire que l'effet angiogénique des LDLox nécessite la génération de S1P par la SK1, dans les HMEC-1, impliquant la mise en jeu la voie des sphingolipides en amont. Cette cascade est activée *via* la génération initiale de ROS et l'activation de p38MAPK induites par l'interaction des LDLox avec les récepteurs CD-36 et LOX-1.

D'autres éléments semblent impliqués dans cette cascade de signalisation angiogénique des LDLox sur les HMEC-1, notamment les métalloprotéases MMP-2 et/ou MMP-9, et les connexines, en particulier Cx-43. Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires afin de préciser leur position par rapport aux autres éléments mis en jeu dans cette signalisation.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**





Les travaux présentés dans ce mémoire ont permis de mettre en évidence l'existence d'un lien entre l'effet angiogénique des LDL oxydées sur les cellules endothéliales microvasculaires et la voie des sphingolipides dont le métabolite final, la S1P, est déjà bien connu pour ses propriétés angiogéniques.

Des cellules endothéliales (HMEC-1) en culture traitées par de faibles doses (20 à 50 µg/ml) de LDL oxydées génèrent de la S1P qui est à l'origine d'une angiogenèse, à la fois dans un modèle de tubulogenèse *in vitro* de cellules HMEC-1 cultivées sur Matrigel™ et dans un modèle *in vivo* de plugs sous-cutanés de Matrigel™ chez la souris. Cette angiogenèse est efficacement prévenue par l'utilisation d'un anticorps anti-S1P bloquant *Sphingomab*®, à la fois dans le modèle *in vitro* de cellules HMEC-1 et *in vivo* sur les plugs de Matrigel chez la souris.

La génération de S1P dans notre modèle cellulaire, consécutivement à une stimulation par les LDLox, met en jeu la cascade des sphingolipides (nSMase2/CDase/SK1) dont l'activation nécessite la génération intracellulaire de ROS et l'activation de p38MAPK. Cette signalisation débute par l'interaction des LDLox avec leurs récepteurs, CD36 et LOX-1.

D'autres facteurs semblent également impliqués dans cette cascade de signalisation angiogénique induite par de faibles doses de LDLox. Les perspectives de travail concernent l'étude et la compréhension des mécanismes situés en amont de la voie des sphingolipides ainsi que les voies de signalisation activées par la S1P et ses récepteurs.

Nous avons vu dans la première partie de ce travail, que la génération de S1P générée sous l'effet des LDLox, induit une réponse angiogénique dans notre modèle cellulaire, non pas par l'induction de la synthèse du VEGF mais par une probable transactivation du VEGFR induite par S1P. En effet, dans les conditions expérimentales utilisées dans ce modèle, i/ la concentration angiogénique de LDLox n'induit pas de synthèse de VEGF par les cellules HMEC-1 (qPCR du mRNA, Western blot sur extraits cellulaires totaux, Immunodétection en Elisa sur milieux extracellulaires concentrés), alors que les HMEC-1 sont capables de synthétiser du VEGF en réponse à la thapsigargine, un agent de stress du réticulum, ii/ le SU1498 (inhibiteur de l'activité kinase du VEGFR2) inhibe partiellement l'angiogenèse induite par de faibles doses (20 à 50 µg/ml) de LDLox ou par de la S1P exogène (5µM).

Ces résultats nécessitent d'être approfondis tout d'abord par l'étude du statut de phosphorylation du VEGFR dans les mêmes conditions expérimentales que celles permettant la génération de la S1P, mais aussi par l'étude de la signalisation mise en jeu en aval des récepteurs de la S1P.

Comme nous l'avons vu dans la revue générale, chacun de ces récepteurs interagit de façon préférentielle avec une ou plusieurs protéines G. S1P1 interagit avec la protéine Gi (inhibitrice de l'adényl cyclase) et active la prolifération, la migration cellulaire et la tubulogenèse par la mise en jeu de la voie PI3K/Akt, de ERK et de la PLC en aval de Gi (Yonesu, Nakamura et al. 2010). *In vivo* le KO de S1P1 chez la souris est létal (Allende, Yamashita et al. 2003). S1P3 peut activer les protéines Gi, Gq et G<sub>12/13</sub> (Brinkmann 2007), et partage ainsi des fonctions cellulaires avec S1P1 *via* Gi. Il est cependant décrit que son action cellulaire est très liée à l'activation de la PLC et la mobilisation du calcium cellulaire (Murakami, Takasugi et al. 2010) *via* Gq et Gi, à l'origine d'une contraction cellulaire nécessaire à la migration, mais il est aussi à l'origine d'un réarrangement du cytosquelette *via* G<sub>12/13</sub> (Kluk and Hla 2002) impliqué dans l'angiogenèse et la migration. S1P2 est

largement connu pour ses propriétés anti-migratoires, et en ce sens a une action opposée à celle de S1P1. Il est pourtant lui aussi couplé aux protéines Gi, Gq et G<sub>12/13</sub> (Brinkmann 2007), mais son activité semble préférentiellement couplée à G<sub>12/13</sub> à l'origine d'une activation de Rho qui inhibe la migration et la prolifération cellulaire (Kluk and Hla 2002) mais induit également la formation des fibres de stress à l'origine d'une désorganisation des jonctions adhérentes de l'endothélium et d'une augmentation de la perméabilité endothéliale (Adada, Canals et al. 2013), phénomène indispensable à l'angiogenèse *in vivo* puisque cela permet à des agents proangiogènes, synthétisés par les cellules périsvasculaires, d'arriver jusqu'à l'endothélium. Les KO de S1P2 (Skoura and Hla 2009) ou de S1P3 (Kluk and Hla 2002) ne sont pas des mutations létales chez la souris, sûrement en raison d'un recouplage des différents récepteurs avec les différentes protéines G, chaque récepteur pouvant ainsi suppléer aux fonctions de l'autre mais peut être aussi car S1P1 joue un rôle essentiel à l'angiogenèse *in utero* (Liu, Wada et al. 2000; Allende, Yamashita et al. 2003).

Pour connaître les mécanismes mis en jeu dans notre modèle cellulaire, il serait intéressant d'évaluer l'implication différentielle des protéines G, pouvant se coupler aux trois récepteurs étudiés (Gi, Gq, G<sub>12/13</sub>) grâce à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de chacune des protéines G, sur les trois axes de l'angiogenèse qui sont la migration, la prolifération et la tubulogenèse. Cela permettra également d'étudier l'activation des différentes kinases (PKC, ERK, PI3K/Akt) en aval des protéines G pouvant être à l'origine de la transactivation du VEGFR dans notre modèle.

Dans la deuxième partie de ce travail nous avons évoqué des résultats préliminaires suggérant l'implication des métalloprotéases en amont de la voie des sphingolipides dans la signalisation angiogénique des LDLox. De précédents travaux dans notre équipe ont déjà montré l'implication de MT1-MMP et MMP-2 dans l'activation de la voie des sphingolipides impliquée dans la prolifération des CML en réponse à de faibles doses de LDLox (Auge, Maupas-Schwalm et al. 2004), et MMP-2 semble impliquée dans l'angiogenèse (Stetler-Stevenson 1999; Ohno-Matsui, Uetama et al. 2003), comme nombre de métalloprotéases de la matrice extracellulaire puisque l'angiogenèse est un processus invasif qui nécessite la destruction de la matrice pour permettre le bourgeonnement des vaisseaux (Arroyo and Iruela-Arispe 2010).

Nous retrouvons dans notre modèle, une inhibition efficace par le Ro26-2853 (un inhibiteur des gélatinases), de la tubulogenèse *in vitro* ainsi que de l'activation de la nSMase2 et de la SK1 après stimulation des HMEC-1 par de faibles doses de LDLox. Ces résultats sont en faveur d'une implication des gélatinases (MMP-2 et/ou MMP-9) en amont de la voie des sphingolipides dans la tubulogenèse induite par les LDLox. Cependant l'utilisation d'un modèle de souris MMP-2 KO (souris Gela KO) n'a pas permis de montrer un effet bloquant de l'absence de MMP-2 sur l'angiogenèse *in vivo*. Il a été en effet décrit une surexpression compensatoire de MMP-9 chez des souris MMP-2 KO (Esparza, Kruse et al. 2004). Ceci pourrait expliquer l'absence de blocage de l'angiogenèse que nous observons dans les plugs de Matrigel™ contenant les LDLox chez nos souris Gela KO. L'utilisation de souris double KO (MMP-2<sup>-/-</sup> et MMP-9<sup>-/-</sup>) seraient intéressante ici. Mais L'utilisation du Ro26-2853 par voie systémique est envisageable chez nos souris MMP-2 KO afin de bloquer de façon pharmacologique l'activité compensatoire de MMP-9, puisqu'effectivement MMP-2 et MMP-9 semblent avoir une action synergique dans la vascularisation inflammatoire (Lambert, Wielockx et al. 2003). Cependant ce modèle de plugs de Matrigel™ chez la souris présente comme principal inconvénient, une grande variabilité de réponse entre les individus, y compris au niveau des « plugs contrôle » qui peuvent, pour certains, présenter le même niveau de vascularisation que les « plugs LDLox » les moins angiogéniques (voir chapitre

Matériels et Méthodes). De tels chevauchement entre les groupes nécessite d'inclure un très grand nombre d'individus.

Un autre modèle animal est actuellement en cours de développement pour l'étude de l'effet angiogénique des LDLox *in vivo*, le modèle de la CAM (membrane chorioallantoïque d'embryons de poulet), qui permet d'inclure plusieurs dizaines d'individus par condition en une seule expérimentation, et qui semble assez reproductible. Ce modèle présente pour l'instant, deux principaux inconvénients, sa fragilité à l'origine de la perte d'un grand nombre d'individus en cours d'expérimentation, et son niveau d'angiogenèse basale déjà important. Cependant des résultats préliminaires avec des doses croissantes de LDLox sont encourageants. Il semblerait que l'angiogenèse soit optimale entre 20 et 50 µg/ml de LDLox dilués dans du collagène ou du Matrigel™ déposés sur la membrane.

Enfin, certains de nos résultats préliminaires suggèrent une implication des connexines dans l'angiogenèse induite *in vitro* par les LDLox. Nous avons étudié la connexine-43 qui est la plus représentée dans le système vasculaire et décrite pour son implication dans l'angiogenèse. Comme nous l'avons déjà discuté plus haut, nous allons poursuivre l'étude des mécanismes impliquant les connexines dans l'activation de la voie des sphingolipides en réponse à de faibles doses de LDLox par l'utilisation d'outils complémentaires *in vitro* : siRNA Cx-43, élargissement de l'utilisation du peptide gap26 (inhibiteur spécifique de Cx-43), étude de l'effet de l'inhibiteur de phospho-p38MAPK sur la phosphorylation de Cx-43 et de l'effet des inhibiteurs de Cx-43 sur la phosphorylation de p38MAPK pour préciser les mécanismes d'activation de l'une et de l'autre, utilisation de Cx-43 tronquées (dépourvue de la partie N-terminale ou de la partie C-terminale) pour mettre en évidence une éventuelle implication de Cx-43 dans la phosphorylation de p38MAPK, indépendamment de l'assemblage des connexons. L'utilisation d'inhibiteurs des sphingolipides (DMS, GW4869 et anticorps anti-S1P bloquant) seront utiles pour confirmer l'hypothèse d'une position de la Cx-43 en amont de la voie des sphingolipides. Enfin, l'implication des connexines et de la Cx-43 en particulier devra être recherchée dans l'effet angiogénique des LDLox *in vivo*, sur le modèle de la CAM.

Au-delà de l'étude des mécanismes pro-angiogéniques (Dandapat, Hu et al. 2007), de faibles doses de LDLox sur les cellules endothéliales, nous allons nous intéresser à l'effet anti-angiogénique (Murugesan, Chisolm et al. 1993) (Chen, Jiang et al. 2000) de ces lipoprotéines à plus forte concentration. En effet, nous avons vu dans la première partie de ce travail qu'il existe un effet dual des LDLox sur l'angiogenèse, de faibles doses (20 à 50 µg/ml) étant pro-angiogéniques, alors que de plus fortes doses (100 µg/ml) n'ont pas d'effet angiogénique, alors que les doses toxiques (200 µg/ml) ne sont pas encore atteintes.

La bioactivité des LDL oxydées dépend de produits d'oxydation lipidique de nature très diverse, formés lors de leur oxydation. Parmi ces agents, les aldéhydes générés lors de l'oxydation des acides gras polyinsaturés (4-hydroxynonanal, acroléine, malondialdéhyde), peuvent modifier des protéines cellulaires et altérer leur fonction (carbonyl stress), en particulier au cours de l'athérosclérose et du diabète (Uchida, Kanematsu et al. 1998; Vasquez-Garzon, Rouimi et al. 2012). D'autres aldéhydes, dérivés du métabolisme glucidique (glyoxal, méthylglyoxal), ont les mêmes effets (Cantero, Portero-Otin et al. 2007). Le stress carbonyle pourrait avoir des effets inhibiteurs sur l'angiogenèse, *via* la modification de la voie d'activation de la sphingosine kinase, qui implique la nSMase2 et le PDGF-récepteur (qui est une cible connue des dérivés carbonyles) (Escargueil-Blanc, Salvayre et al.

2001; Negre-Salvayre, Vieira et al. 2003; Vindis, Escargueil-Blanc et al. 2006). De récents travaux dans l'équipe sur le stress oxydant montrent l'intervention du PDGFR dans l'effet dual du peroxyde d'hydrogène sur la prolifération des CML vasculaires, de faibles doses induisant l'activation de la cascade nSMase2/Src/PDGFR/SK1 et la prolifération, alors que de plus fortes doses activent la nSMase2 et mais n'activent pas SK1, à l'origine d'une diminution de la prolifération et de la viabilité cellulaire (Cinq-Frais, Coatrieux et al. 2013). Des expérimentations sont en cours pour transposer ces travaux sur notre modèle cellulaire d'angiogénèse.

Des résultats préliminaires montrent un blocage partiel de l'angiogénèse induite par de faibles doses de LDLox en présence d'un inhibiteur du PDGFR (AG1295) ainsi qu'en présence d'un inhibiteur de Src (PP2) sur des HMEC-1. Ceci laisse supposer une interaction du PDGFR avec l'activation de la voie des sphingolipides dans le signal angiogénique (Olivera and Spiegel 1993). Si le rôle du PDGFR dans la cascade de signalisation de la voie nSMase2/SK1 dans le modèle d'angiogénèse des HMEC-1 induite par les LDL oxydées, est le même que dans l'effet mitogène de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur cellules musculaires lisses (Cinq-Frais, Coatrieux et al. 2013), on peut faire l'hypothèse que de fortes concentrations de dérivés carbonyles pourraient inhiber le PDGFR (Vindis, Escargueil-Blanc et al. 2006) et donc bloquer l'activation de SK1 et l'effet angiogénique des LDLox.

L'utilisation d'un inhibiteur du PDGFR sur un dosage des activités enzymatiques de la voie des sphingolipides (nSMase2 et SK1) permettra de situer l'implication du PDGFR dans la signalisation des sphingolipides sur notre modèle de cellules endothéliales. L'administration conjointe de LDLox à dose angiogénique et de dérivés carbonyles (4-hydroxynonanal, ou malondialdéhyde) sur des HMEC-1 ensemencées sur Matrigel™, permettra d'évaluer le niveau de blocage de l'angiogénèse par le stress carbonyle. Le dosage des activités nSMase2 et SK1 ainsi que la phosphorylation du PDGFR dans les mêmes conditions, ainsi qu'en présence de plus fortes concentrations de LDLox (100µg/ml), permettra de mieux définir la position de ces différents effecteurs dans la modulation de l'effet angiogène des LDLox.

Les résultats de ce travail de thèse devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la modulation de l'angiogénèse par les LDLox. Dans les plaques d'athérome, les concentrations de LDLox et leur degré d'oxydation ne sont probablement pas uniformes et varient sûrement au cours de l'évolution de la plaque. L'oxydation des LDL est un processus progressif dépendant de la composition en lipides de la lipoprotéine, de son temps de résidence dans l'intima, du niveau de clairance métabolique des LDL circulantes, de l'intensité et la durée du stress oxydant (Witztum and Steinberg 1991). Comme de faibles doses de LDLox induisent une prolifération et une migration des cellules endothéliales, et des fortes doses ne sont pas angiogéniques voire même pro-apoptotiques pour les très fortes doses, on peut imaginer que l'angiogénèse se développe dans les zones de la plaque contenant de faibles concentrations de LDLox comme la périphérie de la plaque ou les zones d'épaulement, là où la S1P pourrait renforcer ou médier l'effet d'autres agents angiogéniques comme l'hypoxie (Skoura, Sanchez et al. 2007; Michaud, Robitaille et al. 2009), l'inflammation (Soares and Azevedo 2007; Arroyo and Iruela-Arispe 2010), les métalloprotéases, le VEGF (Igarashi, Erwin et al. 2003; Sun, Wei et al. 2010), et participer au processus athérogène comme la réponse inflammatoire locale et le recrutement des monocytes/macrophages (Michaud, Im et al. 2010; Keul, Lucke et al. 2011) au niveau des zones athéroscléreuse. Le développement de microcapillaires est corrélé à la progression de la plaque d'athérome (Kolodgie, Gold et al. 2003; Sluimer and Daemen 2009). Les zones de la plaque contenant de fortes concentrations de LDLox comme le cœur nécrotico-lipidique favorisent par

contre l'apoptose des cellules, ainsi que la fragilisation de ces néo-capillaires immatures à l'origine des hémorragies et des ruptures de plaques (Sluimer and Daemen 2009; Michel, Virmani et al. 2011).

La compréhension de la physiopathologie de l'athérosclérose et plus particulièrement des mécanismes à l'origine du développement de ces microcapillaires au sein de la plaque doit permettre de mieux désigner des cibles thérapeutiques visant à limiter cette néoangiogenèse intimale responsables des hémorragies intraplaques et des ruptures de plaques conduisant aux complications athérotrombogènes (McCarthy, Loftus et al. 1999; Kolodgie, Gold et al. 2003).

La cascade de signalisation présentée dans ce travail comprend de nombreuses cibles potentielles afin de limiter ce développement microcapillaire au sein de la plaque.

Le FTY720, un agoniste inhibiteur des récepteurs de la S1P par induction de leur séquestration (Matloubian, Lo et al. 2004), diminue le développement de l'athérosclérose (Keul, Tolle et al. 2007; Nofer, Bot et al. 2007) et l'angiogenèse tumorale (LaMontagne, Littlewood-Evans et al. 2006), mais nous ne savons pas si il diminue le risque d'hémorragie intraplaque. De plus il est intéressant de noter que l'utilisation de l'anticorps bloquant anti-S1P dans notre modèle cellulaire n'a pas induit une augmentation de toxicité des LDLox sur les cellules dans les expérimentations de tubulogenèse, peut être parce que les concentrations de LDLox utilisées sont largement en dessous du seuil toxique, mais aussi parce que la toxicité des LDLox au niveau des cellules vasculaires de la plaque passe par d'autres voies que celle du rhéostat Cer/S1P (Vieira, Escargueil-Blanc et al. 2000; Vindis, Elbaz et al. 2005; Sanson, Ingueneau et al. 2008; Larroque-Cardoso, Swiader et al. 2013; Muller, Bandemer et al. 2013). Néanmoins, cela nous permet d'imaginer qu'un blocage de la génération de S1P par les cellules vasculaires, ou de ses effets sur la plaque d'athérome, puisse permettre de limiter le développement intimal des vasa vasorum et les complications qui en découlent. Des thérapeutiques localisées, par l'utilisation « stents coâtés », ciblant la S1P (inhibiteurs de la SK1 ou un l'anticorps *Sphingomab*® anti-S1P bloquant) ou ses récepteurs (FTY720 ou KRP-203), pourrait être imaginée. De la même manière un blocage localisé du VEGFR ou des gélatinases (MMP-2 et MMP-9) par des inhibiteurs pharmacologiques, serait intéressant d'autant que cela limiterait également les phénomènes d'érosion de la plaque. Des thérapeutiques systémiques visant à bloquer l'angiogenèse ne paraissent pas judicieuses car l'angiogenèse peut également être bénéfique dans le cadre de l'athérosclérose, notamment dans l'angiogenèse post ischémique et le développement de la circulation collatérale dans l'artériopathie chronique des membres inférieurs.





## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



1. Abela, G. S. and K. Aziz (2005). "Cholesterol crystals cause mechanical damage to biological membranes: a proposed mechanism of plaque rupture and erosion leading to arterial thrombosis." Clin Cardiol **28**(9): 413-20.
2. Abela, G. S. and K. Aziz (2006). "Cholesterol crystals rupture biological membranes and human plaques during acute cardiovascular events--a novel insight into plaque rupture by scanning electron microscopy." Scanning **28**(1): 1-10.
3. Abela, G. S., K. Aziz, et al. (2009). "Effect of cholesterol crystals on plaques and intima in arteries of patients with acute coronary and cerebrovascular syndromes." Am J Cardiol **103**(7): 959-68.
4. Abraham, N. G., Y. Lavrovsky, et al. (1995). "Transfection of the human heme oxygenase gene into rabbit coronary microvessel endothelial cells: protective effect against heme and hemoglobin toxicity." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(15): 6798-802.
5. Adada, M., D. Canals, et al. (2013). "Sphingosine-1-phosphate receptor 2." FEBS J **280**(24): 6354-66.
6. Adair, T. H., W. J. Gay, et al. (1990). "Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis." Am J Physiol **259**(3 Pt 2): R393-404.
7. Alderton, W. K., C. E. Cooper, et al. (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
8. Allende, M. L., T. Sasaki, et al. (2004). "Mice deficient in sphingosine kinase 1 are rendered lymphopenic by FTY720." J Biol Chem **279**(50): 52487-92.
9. Allende, M. L., T. Yamashita, et al. (2003). "G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation." Blood **102**(10): 3665-7.
10. Amin, A. H., Z. Y. Abd Elmageed, et al. (2011). "Mechanisms of myogenic tone of coronary arteriole: Role of down stream signaling of the EGFR tyrosine kinase." Microvasc Res **81**(1): 135-42.
11. Ancellin, N., C. Colmont, et al. (2002). "Extracellular export of sphingosine kinase-1 enzyme. Sphingosine 1-phosphate generation and the induction of angiogenic vascular maturation." J Biol Chem **277**(8): 6667-75.
12. Anderson, T. J. (1999). "Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans." J Am Coll Cardiol **34**(3): 631-8.
13. Annabi, B., S. Thibeault, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells." Exp Hematol **31**(7): 640-9.
14. Arana, L., P. Gangoiti, et al. (2010). "Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease." Lipids Health Dis **9**: 15.
15. Argraves, K. M. and W. S. Argraves (2007). "HDL serves as a S1P signaling platform mediating a multitude of cardiovascular effects." J Lipid Res **48**(11): 2325-33.
16. Argraves, K. M., B. A. Wilkerson, et al. (2010). "Sphingosine-1-phosphate signaling in vasculogenesis and angiogenesis." World J Biol Chem **1**(10): 291-7.
17. Arroyo, A. G. and M. L. Iruela-Arispe (2010). "Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response." Cardiovasc Res **86**(2): 226-35.
18. Aubin, I., C. P. Adams, et al. (2005). "A deletion in the gene encoding sphingomyelin phosphodiesterase 3 (Smpd3) results in osteogenesis and dentinogenesis imperfecta in the mouse." Nat Genet **37**(8): 803-5.
19. Auge, N., N. Andrieu, et al. (1996). "The sphingomyelin-ceramide signaling pathway is involved in oxidized low density lipoprotein-induced cell proliferation." J Biol Chem **271**(32): 19251-5.
20. Auge, N., I. Escargueil-Blanc, et al. (1998). "Potential role for ceramide in mitogen-activated protein kinase activation and proliferation of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low density lipoprotein." J Biol Chem **273**(21): 12893-900.
21. Auge, N., V. Garcia, et al. (2002). "Oxidized LDL-induced smooth muscle cell proliferation involves the EGF receptor/PI-3 kinase/Akt and the sphingolipid signaling pathways." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(12): 1990-5.
22. Auge, N., F. Maupas-Schwalm, et al. (2004). "Role for matrix metalloproteinase-2 in oxidized low-density lipoprotein-induced activation of the sphingomyelin/ceramide pathway and smooth muscle cell proliferation." Circulation **110**(5): 571-8.

23. Auge, N., M. Nikolova-Karakashian, et al. (1999). "Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase." *J Biol Chem* **274**(31): 21533-8.
24. Balla, G., H. S. Jacob, et al. (1991). "Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury." *Arterioscler Thromb* **11**(6): 1700-11.
25. Balligand, J. L., O. Feron, et al. (2009). "eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues." *Physiol Rev* **89**(2): 481-534.
26. Barr, R. K., H. E. Lynn, et al. (2008). "Deactivation of sphingosine kinase 1 by protein phosphatase 2A." *J Biol Chem* **283**(50): 34994-5002.
27. Bartke, N. and Y. A. Hannun (2009). "Bioactive sphingolipids: metabolism and function." *J Lipid Res* **50 Suppl**: S91-6.
28. Bashyam, M. D., A. K. Chaudhary, et al. (2013). "Molecular analyses of novel ASAH1 mutations causing Farber lipogranulomatosis: analyses of exonic splicing enhancer inactivating mutation." *Clin Genet*.
29. Bates, D. O., T. G. Cui, et al. (2002). "VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma." *Cancer Res* **62**(14): 4123-31.
30. Bates, D. O., N. J. Hillman, et al. (2002). "Regulation of microvascular permeability by vascular endothelial growth factors." *J Anat* **200**(6): 581-97.
31. Beaudeau, J. L., J. Peynet, et al. (2006). "[Cellular sources of reactive oxygen and nitrogen species. Roles in signal transcription pathways]." *Ann Pharm Fr* **64**(6): 373-81.
32. Behrens, J., P. Kameritsch, et al. (2010). "The carboxyl tail of Cx43 augments p38 mediated cell migration in a gap junction-independent manner." *Eur J Cell Biol* **89**(11): 828-38.
33. Benest, A. V., K. Kruse, et al. (2013). "Angiopoietin-2 is critical for cytokine-induced vascular leakage." *PLoS One* **8**(8): e70459.
34. Bergers, G. and L. E. Benjamin (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 401-10.
35. Berliner, J. A. and J. W. Heinecke (1996). "The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis." *Free Radic Biol Med* **20**(5): 707-27.
36. Berra, E., A. Ginouves, et al. (2006). "The hypoxia-inducible-factor hydroxylases bring fresh air into hypoxia signalling." *EMBO Rep* **7**(1): 41-5.
37. Bochkov, V. N., M. Philippova, et al. (2006). "Oxidized phospholipids stimulate angiogenesis via autocrine mechanisms, implicating a novel role for lipid oxidation in the evolution of atherosclerotic lesions." *Circ Res* **99**(8): 900-8.
38. Bouhrel, M. A., B. Derudas, et al. (2007). "PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties." *Cell Metab* **6**(2): 137-43.
39. Bourbon, N. A., L. Sandrasegarane, et al. (2002). "Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase Czeta: implications for growth arrest." *J Biol Chem* **277**(5): 3286-92.
40. Boyle, J. J., H. A. Harrington, et al. (2009). "Coronary intraplaque hemorrhage evokes a novel atheroprotective macrophage phenotype." *Am J Pathol* **174**(3): 1097-108.
41. Brinkmann, V. (2007). "Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology." *Pharmacol Ther* **115**(1): 84-105.
42. Brisset, A. C., B. E. Isakson, et al. (2009). "Connexins in vascular physiology and pathology." *Antioxid Redox Signal* **11**(2): 267-82.
43. Brogi, E., G. Schatteman, et al. (1996). "Hypoxia-induced paracrine regulation of vascular endothelial growth factor receptor expression." *J Clin Invest* **97**(2): 469-76.
44. Brown, A. J. and W. Jessup (1999). "Oxysterols and atherosclerosis." *Atherosclerosis* **142**(1): 1-28.
45. Brown, A. J., S. L. Leong, et al. (1997). "7-Hydroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerotic plaque." *J Lipid Res* **38**(9): 1730-45.
46. Brown, D. A. and E. London (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." *J Biol Chem* **275**(23): 17221-4.



47. Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1983). "Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis." *Annu Rev Biochem* **52**: 223-61.
48. Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1983). "Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic." *J Clin Invest* **72**(3): 743-7.
49. Burri, P. H., R. Hlushchuk, et al. (2004). "Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance." *Dev Dyn* **231**(3): 474-88.
50. Calderon, R. O. and G. H. DeVries (1997). "Lipid composition and phospholipid asymmetry of membranes from a Schwann cell line." *J Neurosci Res* **49**(3): 372-80.
51. Cantero, A. V., M. Portero-Otin, et al. (2007). "Methylglyoxal induces advanced glycation end product (AGEs) formation and dysfunction of PDGF receptor-beta: implications for diabetic atherosclerosis." *FASEB J* **21**(12): 3096-106.
52. Carlson, T. R., Y. Feng, et al. (2001). "Direct cell adhesion to the angiopoietins mediated by integrins." *J Biol Chem* **276**(28): 26516-25.
53. Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." *Nat Med* **9**(6): 653-60.
54. Carmeliet, P. and D. Collen (2000). "Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease." *J Pathol* **190**(3): 387-405.
55. Carmeliet, P., F. De Smet, et al. (2009). "Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way." *Nat Rev Clin Oncol* **6**(6): 315-26.
56. Carmeliet, P., Y. Dor, et al. (1998). "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." *Nature* **394**(6692): 485-90.
57. Carmeliet, P. and R. K. Jain (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." *Nature* **473**(7347): 298-307.
58. Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, et al. (1999). "Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis." *Cell* **98**(2): 147-57.
59. Carmeliet, P. and M. Tessier-Lavigne (2005). "Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring." *Nature* **436**(7048): 193-200.
60. Carvalho, M. I., M. J. Guimaraes, et al. (2013). "EGFR and microvessel density in canine malignant mammary tumours." *Res Vet Sci* **95**(3): 1094-9.
61. Cascio, M. (2005). "Connexins and their environment: effects of lipids composition on ion channels." *Biochim Biophys Acta* **1711**(2): 142-53.
62. Castillo, S. S., M. Levy, et al. (2007). "Reactive nitrogen and oxygen species activate different sphingomyelinases to induce apoptosis in airway epithelial cells." *Exp Cell Res* **313**(12): 2680-6.
63. Chabot, S., N. Jabrane-Ferrat, et al. (2011). "A novel antiangiogenic and vascular normalization therapy targeted against human CD160 receptor." *J Exp Med* **208**(5): 973-86.
64. Chadjichristos, C. E., C. M. Matter, et al. (2006). "Reduced connexin43 expression limits neointima formation after balloon distension injury in hypercholesterolemic mice." *Circulation* **113**(24): 2835-43.
65. Chae, S. S., J. H. Paik, et al. (2004). "Requirement for sphingosine 1-phosphate receptor-1 in tumor angiogenesis demonstrated by in vivo RNA interference." *J Clin Invest* **114**(8): 1082-9.
66. Chalfant, C. E., K. Kishikawa, et al. (1999). "Long chain ceramides activate protein phosphatase-1 and protein phosphatase-2A. Activation is stereospecific and regulated by phosphatidic acid." *J Biol Chem* **274**(29): 20313-7.
67. Chan, H. and S. M. Pitson (2013). "Post-translational regulation of sphingosine kinases." *Biochim Biophys Acta* **1831**(1): 147-56.
68. Chander, S. K., P. A. Foster, et al. (2007). "In vivo inhibition of angiogenesis by sulphamoylated derivatives of 2-methoxyoestradiol." *Br J Cancer* **96**(9): 1368-76.
69. Chandler, A. B. and R. A. Hand (1961). "Phagocytized platelets: a source of lipids in human thrombi and atherosclerotic plaques." *Science* **134**(3483): 946-7.
70. Chapman, M. J., M. Guerin, et al. (1998). "Atherogenic, dense low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches." *Eur Heart J* **19 Suppl A**: A24-30.
71. Chavez, J. C., F. Agani, et al. (2000). "Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the brain of rats during chronic hypoxia." *J Appl Physiol* (1985) **89**(5): 1937-42.
72. Chen, C. H., W. Jiang, et al. (2000). "Oxidized low-density lipoproteins inhibit endothelial cell proliferation by suppressing basic fibroblast growth factor expression." *Circulation* **101**(2): 171-7.

73. Chen, Y. C., A. V. Bui, et al. (2013). "A novel mouse model of atherosclerotic plaque instability for drug testing and mechanistic/therapeutic discoveries using gene and microRNA expression profiling." Circ Res **113**(3): 252-65.
74. Chien, S. (2007). "Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(3): H1209-24.
75. Christinger, H. W., G. Fuh, et al. (2004). "The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1." J Biol Chem **279**(11): 10382-8.
76. Cinq-Frais, C., C. Coatrieux, et al. (2013). "A signaling cascade mediated by ceramide, src and PDGFRbeta coordinates the activation of the redox-sensitive neutral sphingomyelinase-2 and sphingosine kinase-1." Biochim Biophys Acta **1831**(8): 1344-56.
77. Clarke, C. J., C. F. Snook, et al. (2006). "The extended family of neutral sphingomyelinases." Biochemistry **45**(38): 11247-56.
78. Clarke, C. J., T. G. Truong, et al. (2007). "Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor alpha-stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2." J Biol Chem **282**(2): 1384-96.
79. Clarke, M. C., N. Figg, et al. (2006). "Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis." Nat Med **12**(9): 1075-80.
80. Cooke, J. P. and D. W. Losordo (2002). "Nitric oxide and angiogenesis." Circulation **105**(18): 2133-5.
81. Corcoran, C. A., Q. He, et al. (2008). "Neutral sphingomyelinase-3 is a DNA damage and nongenotoxic stress-regulated gene that is deregulated in human malignancies." Mol Cancer Res **6**(5): 795-807.
82. Corre, I., M. Guillonnet, et al. (2013). "Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity." Int J Mol Sci **14**(11): 22678-96.
83. Corti, R. and V. Fuster (2011). "Imaging of atherosclerosis: magnetic resonance imaging." Eur Heart J **32**(14): 1709-19b.
84. Coussin, F., R. H. Scott, et al. (2002). "Comparison of sphingosine 1-phosphate-induced intracellular signaling pathways in vascular smooth muscles: differential role in vasoconstriction." Circ Res **91**(2): 151-7.
85. Cuvillier, O. (2012). "[Sphingosine 1-phosphate receptors: from biology to physiopathology]." Med Sci (Paris) **28**(11): 951-7.
86. Cuvillier, O., G. Pirianov, et al. (1996). "Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate." Nature **381**(6585): 800-3.
87. Dandapat, A., C. Hu, et al. (2007). "Small concentrations of oxLDL induce capillary tube formation from endothelial cells via LOX-1-dependent redox-sensitive pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(11): 2435-42.
88. Daum, G., A. Grabski, et al. (2009). "Sphingosine 1-phosphate: a regulator of arterial lesions." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(10): 1439-43.
89. De Palma, C., E. Meacci, et al. (2006). "Endothelial nitric oxide synthase activation by tumor necrosis factor alpha through neutral sphingomyelinase 2, sphingosine kinase 1, and sphingosine 1 phosphate receptors: a novel pathway relevant to the pathophysiology of endothelium." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(1): 99-105.
90. Deanfield, J. E., J. P. Halcox, et al. (2007). "Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance." Circulation **115**(10): 1285-95.
91. Denizot, F. and R. Lang (1986). "Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability." J Immunol Methods **89**(2): 271-7.
92. Dimmeler, S., I. Fleming, et al. (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-5.
93. Dimmeler, S., J. Haendeler, et al. (2002). "Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis." Curr Opin Lipidol **13**(5): 531-6.
94. Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (2000). "Akt takes center stage in angiogenesis signaling." Circ Res **86**(1): 4-5.

95. Ding, G., H. Sonoda, et al. (2007). "Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2." *J Biol Chem* **282**(37): 27493-502.
96. Djonov, V. G., A. B. Galli, et al. (2000). "Intussusceptive arborization contributes to vascular tree formation in the chick chorio-allantoic membrane." *Anat Embryol (Berl)* **202**(5): 347-57.
97. Dreux, A. C., D. J. Lamb, et al. (2006). "The epidermal growth factor receptors and their family of ligands: their putative role in atherogenesis." *Atherosclerosis* **186**(1): 38-53.
98. Du, W., N. Takuwa, et al. (2010). "S1P(2), the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, negatively regulates tumor angiogenesis and tumor growth in vivo in mice." *Cancer Res* **70**(2): 772-81.
99. Duan, R. D. (2006). "Alkaline sphingomyelinase: an old enzyme with novel implications." *Biochim Biophys Acta* **1761**(3): 281-91.
100. Duewell, P., H. Kono, et al. (2010). "NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals." *Nature* **464**(7293): 1357-61.
101. Dulak, J., A. Jozkowicz, et al. (2001). "Vascular endothelial growth factor: angiogenesis, atherogenesis or both?" *J Am Coll Cardiol* **38**(7): 2137-8.
102. Edsall, L. C., O. Cuvillier, et al. (2001). "Sphingosine kinase expression regulates apoptosis and caspase activation in PC12 cells." *J Neurochem* **76**(5): 1573-84.
103. Escargueil-Blanc, I., O. Meilhac, et al. (1997). "Oxidized LDLs induce massive apoptosis of cultured human endothelial cells through a calcium-dependent pathway. Prevention by aurintricarboxylic acid." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(2): 331-9.
104. Escargueil-Blanc, I., R. Salvayre, et al. (2001). "Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor beta-receptor pathway." *Circulation* **104**(15): 1814-21.
105. Esparza, J., M. Kruse, et al. (2004). "MMP-2 null mice exhibit an early onset and severe experimental autoimmune encephalomyelitis due to an increase in MMP-9 expression and activity." *FASEB J* **18**(14): 1682-91.
106. Farhang Ghahremani, M., S. Goossens, et al. (2013). "The p53 family and VEGF regulation: "It's complicated"." *Cell Cycle* **12**(9): 1331-2.
107. Feine, I., I. Pinkas, et al. (2012). "Local oxidative stress expansion through endothelial cells--a key role for gap junction intercellular communication." *PLoS One* **7**(7): e41633.
108. Ferrari, G., B. D. Cook, et al. (2009). "Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) induces angiogenesis through vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated apoptosis." *J Cell Physiol* **219**(2): 449-58.
109. Filosto, S., M. Ashfaq, et al. (2012). "Neutral sphingomyelinase 2 activity and protein stability are modulated by phosphorylation of five conserved serines." *J Biol Chem* **287**(1): 514-22.
110. Folcik, V. A., R. A. Nivar-Aristy, et al. (1995). "Lipoxygenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques." *J Clin Invest* **96**(1): 504-10.
111. Fong, G. H., J. Rossant, et al. (1995). "Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium." *Nature* **376**(6535): 66-70.
112. Fredriksson, L., H. Li, et al. (2004). "The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms." *Cytokine Growth Factor Rev* **15**(4): 197-204.
113. Frey, R. S., M. Ushio-Fukai, et al. (2009). "NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology." *Antioxid Redox Signal* **11**(4): 791-810.
114. Fryer, J. A., P. C. Myers, et al. (1987). "Carotid intraplaque hemorrhage: the significance of neovascularity." *J Vasc Surg* **6**(4): 341-9.
115. Fukuhara, S., S. Simmons, et al. (2012). "The sphingosine-1-phosphate transporter Spns2 expressed on endothelial cells regulates lymphocyte trafficking in mice." *J Clin Invest* **122**(4): 1416-26.
116. Fulton, D., J. P. Gratton, et al. (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." *Nature* **399**(6736): 597-601.
117. Galis, Z. S. and J. J. Khatri (2002). "Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly." *Circ Res* **90**(3): 251-62.
118. Galle, J., T. Hansen-Hagge, et al. (2006). "Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells." *Atherosclerosis* **185**(2): 219-26.

119. Galvani, S., M. Trayssac, et al. (2011). "A key role for matrix metalloproteinases and neutral sphingomyelinase-2 in transplant vasculopathy triggered by anti-HLA antibody." Circulation **124**(24): 2725-34.
120. Gao, P., Z. Q. Chen, et al. (2007). "Correlation between carotid intraplaque hemorrhage and clinical symptoms: systematic review of observational studies." Stroke **38**(8): 2382-90.
121. Gartner, C., B. Ziegelhoffer, et al. (2012). "Knock-down of endothelial connexins impairs angiogenesis." Pharmacol Res **65**(3): 347-57.
122. Gault, C. R., L. M. Obeid, et al. (2010). "An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown." Adv Exp Med Biol **688**: 1-23.
123. Gavard, J. and J. S. Gutkind (2006). "VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin." Nat Cell Biol **8**(11): 1223-34.
124. Gerber, H. P., F. Condorelli, et al. (1997). "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia." J Biol Chem **272**(38): 23659-67.
125. Gerhardt, H. (2008). "VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting." Organogenesis **4**(4): 241-6.
126. Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1977). "The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis." Annu Rev Biochem **46**: 897-930.
127. Goldstein, J. L. and M. S. Brown (2009). "The LDL receptor." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(4): 431-8.
128. Goldstein, J. L., T. Kita, et al. (1983). "Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia." N Engl J Med **309**(5): 288-96.
129. Goni, F. M. and A. Alonso (2002). "Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity." FEBS Lett **531**(1): 38-46.
130. Guedez, L., A. M. Rivera, et al. (2003). "Quantitative assessment of angiogenic responses by the directed in vivo angiogenesis assay." Am J Pathol **162**(5): 1431-9.
131. Guo, F. H., H. R. De Raeve, et al. (1995). "Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7809-13.
132. Haimovitz-Friedman, A., C. C. Kan, et al. (1994). "Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis." J Exp Med **180**(2): 525-35.
133. Hait, N. C., J. Allegood, et al. (2009). "Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate." Science **325**(5945): 1254-7.
134. Hait, N. C., A. Bellamy, et al. (2007). "Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation." J Biol Chem **282**(16): 12058-65.
135. Hanada, K. (2010). "Intracellular trafficking of ceramide by ceramide transfer protein." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **86**(4): 426-37.
136. Hanada, K., K. Kumagai, et al. (2003). "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide." Nature **426**(6968): 803-9.
137. Hanahan, D. (1997). "Signaling vascular morphogenesis and maintenance." Science **277**(5322): 48-50.
138. Hannun, Y. A. and L. M. Obeid (2008). "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 139-50.
139. Hannun, Y. A. and L. M. Obeid (2011). "Many ceramides." J Biol Chem **286**(32): 27855-62.
140. Hansen-Smith, F., A. S. Greene, et al. (1990). "Structural changes during microvascular rarefaction in chronic hypertension." Hypertension **15**(6 Pt 2): 922-8.
141. Hansen, A. H., J. J. Nielsen, et al. (2010). "Exercise training normalizes skeletal muscle vascular endothelial growth factor levels in patients with essential hypertension." J Hypertens **28**(6): 1176-85.
142. Harvey, K. A., Z. Welch, et al. (2010). "Role of Rho kinase in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial and smooth muscle cell migration and differentiation." Mol Cell Biochem **342**(1-2): 7-19.
143. Hattenbach, L. O., A. Allers, et al. (2000). "L-Arginine-nitric oxide pathway-related metabolites in the aqueous humor of diabetic patients." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(1): 213-7.



144. Healy, L. M., G. K. Sheridan, et al. (2013). "Pathway specific modulation of S1P1 receptor signalling in rat and human astrocytes." Br J Pharmacol **169**(5): 1114-29.
145. Heinrich, M., J. Neumeyer, et al. (2004). "Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation." Cell Death Differ **11**(5): 550-63.
146. Hellstrom, M., H. Gerhardt, et al. (2001). "Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis." J Cell Biol **153**(3): 543-53.
147. Hellstrom, M., M. Kalen, et al. (1999). "Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse." Development **126**(14): 3047-55.
148. Hemmings, D. G., Y. Xu, et al. (2004). "Sphingosine 1-phosphate-induced vasoconstriction is elevated in mesenteric resistance arteries from aged female rats." Br J Pharmacol **143**(2): 276-84.
149. Heydeck, D., J. M. Upston, et al. (2001). "Oxidation of LDL by rabbit and human 15-lipoxygenase: prevalence of nonenzymatic reactions." J Lipid Res **42**(7): 1082-8.
150. Hicklin, D. J. and L. M. Ellis (2005). "Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis." J Clin Oncol **23**(5): 1011-27.
151. Hirschi, K. K., S. A. Rohovsky, et al. (1998). "PDGF, TGF-beta, and heterotypic cell-cell interactions mediate endothelial cell-induced recruitment of 10T1/2 cells and their differentiation to a smooth muscle fate." J Cell Biol **141**(3): 805-14.
152. Hla, T. (2003). "Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate." Pharmacol Res **47**(5): 401-7.
153. Ho-Tin-Noe, B. and J. B. Michel (2011). "Initiation of angiogenesis in atherosclerosis: smooth muscle cells as mediators of the angiogenic response to atheroma formation." Trends Cardiovasc Med **21**(7): 183-7.
154. Hobson, J. P., H. M. Rosenfeldt, et al. (2001). "Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility." Science **291**(5509): 1800-3.
155. Hoeben, A., B. Landuyt, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor and angiogenesis." Pharmacol Rev **56**(4): 549-80.
156. Holash, J., P. C. Maisonpierre, et al. (1999). "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF." Science **284**(5422): 1994-8.
157. Hood, J. D. and D. A. Cheresh (2002). "Role of integrins in cell invasion and migration." Nat Rev Cancer **2**(2): 91-100.
158. Hu, C., A. Dandapat, et al. (2007). "Angiotensin II induces capillary formation from endothelial cells via the LOX-1 dependent redox-sensitive pathway." Hypertension **50**(5): 952-7.
159. Hu, W., R. Xu, et al. (2010). "Alkaline ceramidase 3 (ACER3) hydrolyzes unsaturated long-chain ceramides, and its down-regulation inhibits both cell proliferation and apoptosis." J Biol Chem **285**(11): 7964-76.
160. Huang, L. E., J. Gu, et al. (1998). "Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(14): 7987-92.
161. Humar, R., L. Zimmerli, et al. (2009). "Angiogenesis and hypertension: an update." J Hum Hypertens **23**(12): 773-82.
162. Huwiler, A. and J. Pfeilschifter (2008). "New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets." Biochem Pharmacol **75**(10): 1893-900.
163. Hynes, R. O. (2002). "A reevaluation of integrins as regulators of angiogenesis." Nat Med **8**(9): 918-21.
164. Igarashi, J., P. A. Erwin, et al. (2003). "VEGF induces S1P1 receptors in endothelial cells: Implications for cross-talk between sphingolipid and growth factor receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 10664-9.
165. Igarashi, J., M. Miyoshi, et al. (2007). "Hydrogen peroxide induces S1P1 receptors and sensitizes vascular endothelial cells to sphingosine 1-phosphate, a platelet-derived lipid mediator." Am J Physiol Cell Physiol **292**(2): C740-8.
166. Ikeda, M., A. Kihara, et al. (2004). "Sphingosine-1-phosphate lyase SPL is an endoplasmic reticulum-resident, integral membrane protein with the pyridoxal 5'-phosphate binding domain exposed to the cytosol." Biochem Biophys Res Commun **325**(1): 338-43.



167. Ionita, M. G., P. van den Borne, et al. (2010). "High neutrophil numbers in human carotid atherosclerotic plaques are associated with characteristics of rupture-prone lesions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**(9): 1842-8.
168. Iyer, N. V., L. E. Kotch, et al. (1998). "Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha." *Genes Dev* **12**(2): 149-62.
169. Javerzat, S., P. Auguste, et al. (2002). "The role of fibroblast growth factors in vascular development." *Trends Mol Med* **8**(10): 483-9.
170. Jozkowicz, A., J. Dulak, et al. (2000). "Ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma increase the generation of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells and in macrophages." *Acta Biochim Pol* **47**(4): 1147-57.
171. Kalet-Litman, S., P. R. Moreno, et al. (2010). "The haptoglobin 2-2 genotype is associated with increased redox active hemoglobin derived iron in the atherosclerotic plaque." *Atherosclerosis* **209**(1): 28-31.
172. Kaplan, M. and M. Aviram (2001). "Retention of oxidized LDL by extracellular matrix proteoglycans leads to its uptake by macrophages: an alternative approach to study lipoproteins cellular uptake." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(3): 386-93.
173. Keul, P., S. Lucke, et al. (2011). "Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes recruitment of monocyte/macrophages in inflammation and atherosclerosis." *Circ Res* **108**(3): 314-23.
174. Keul, P., M. Tolle, et al. (2007). "The sphingosine-1-phosphate analogue FTY720 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(3): 607-13.
175. Khaidakov, M., S. Mitra, et al. (2012). "Large impact of low concentration oxidized LDL on angiogenic potential of human endothelial cells: a microarray study." *PLoS One* **7**(10): e47421.
176. Kharel, Y., S. Lee, et al. (2005). "Sphingosine kinase 2 is required for modulation of lymphocyte traffic by FTY720." *J Biol Chem* **280**(44): 36865-72.
177. Khong, T. L., N. Thairu, et al. (2013). "Identification of the angiogenic gene signature induced by EGF and hypoxia in colorectal cancer." *BMC Cancer* **13**: 518.
178. Khurana, R., M. Simons, et al. (2005). "Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal." *Circulation* **112**(12): 1813-24.
179. Kimura, T., T. Watanabe, et al. (2000). "Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of human endothelial cells possibly through the lipid receptors, Edg-1 and Edg-3." *Biochem J* **348 Pt 1**: 71-6.
180. Kiran, M. S., R. I. Viji, et al. (2011). "Changes in expression of VE-cadherin and MMPs in endothelial cells: Implications for angiogenesis." *Vasc Cell* **3**(1): 6.
181. Kluk, M. J. and T. Hla (2002). "Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors." *Biochim Biophys Acta* **1582**(1-3): 72-80.
182. Kolb, S., R. Vranckx, et al. (2007). "The phosphatidylserine receptor mediates phagocytosis by vascular smooth muscle cells." *J Pathol* **212**(3): 249-59.
183. Kolodgie, F. D., A. P. Burke, et al. (2007). "Free cholesterol in atherosclerotic plaques: where does it come from?" *Curr Opin Lipidol* **18**(5): 500-7.
184. Kolodgie, F. D., H. K. Gold, et al. (2003). "Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma." *N Engl J Med* **349**(24): 2316-25.
185. Kolter, T. and K. Sandhoff (2005). "Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids." *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**: 81-103.
186. Kono, M., J. L. Dreier, et al. (2006). "Neutral ceramidase encoded by the Asah2 gene is essential for the intestinal degradation of sphingolipids." *J Biol Chem* **281**(11): 7324-31.
187. Kono, M., Y. Mi, et al. (2004). "The sphingosine-1-phosphate receptors S1P1, S1P2, and S1P3 function coordinately during embryonic angiogenesis." *J Biol Chem* **279**(28): 29367-73.
188. Krut, O., K. Wiegmann, et al. (2006). "Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein." *J Biol Chem* **281**(19): 13784-93.
189. Kruth, H. S. (1985). "Platelet-mediated cholesterol accumulation in cultured aortic smooth muscle cells." *Science* **227**(4691): 1243-5.
190. Labrecque, L., C. Nyalendo, et al. (2004). "Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase." *J Biol Chem* **279**(50): 52132-40.

191. Ladomery, M. R., S. J. Harper, et al. (2007). "Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm." Cancer Lett **249**(2): 133-42.
192. Lafont, A. (2003). "Basic aspects of plaque vulnerability." Heart **89**(10): 1262-7.
193. Lambeng, N., Y. Wallez, et al. (2005). "Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues." Circ Res **96**(3): 384-91.
194. Lambert, V., B. Wielockx, et al. (2003). "MMP-2 and MMP-9 synergize in promoting choroidal neovascularization." FASEB J **17**(15): 2290-2.
195. LaMontagne, K., A. Littlewood-Evans, et al. (2006). "Antagonism of sphingosine-1-phosphate receptors by FTY720 inhibits angiogenesis and tumor vascularization." Cancer Res **66**(1): 221-31.
196. Langlois, S., K. N. Cowan, et al. "The tumor-suppressive function of Connexin43 in keratinocytes is mediated in part via interaction with caveolin-1." Cancer Res **70**(10): 4222-32.
197. Langlois, S., D. Gingras, et al. (2004). "Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation." Blood **103**(8): 3020-8.
198. Langlois, S., C. Nyalendo, et al. (2007). "Membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates cell migration through epidermal growth factor receptor transactivation." Mol Cancer Res **5**(6): 569-83.
199. Larroque-Cardoso, P., A. Swiader, et al. (2013). "Role of protein kinase C delta in ER stress and apoptosis induced by oxidized LDL in human vascular smooth muscle cells." Cell Death Dis **4**: e520.
200. Le Stunff, H., I. Galve-Roperh, et al. (2002). "Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase in regulation of sphingolipid metabolism and apoptosis." J Cell Biol **158**(6): 1039-49.
201. Leaphart, C. L., S. Dai, et al. (2008). "Interferon-gamma inhibits enterocyte migration by reversibly displacing connexin43 from lipid rafts." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **295**(3): G559-69.
202. Leclercq, A., X. Houard, et al. (2007). "Topology of protease activities reflects atherothrombotic plaque complexity." Atherosclerosis **191**(1): 1-10.
203. Leclercq, A., X. Houard, et al. (2007). "Involvement of intraplaque hemorrhage in atherothrombosis evolution via neutrophil protease enrichment." J Leukoc Biol **82**(6): 1420-9.
204. Leclercq, T. M. and S. M. Pitson (2006). "Cellular signalling by sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate." IUBMB Life **58**(8): 467-72.
205. Lee, H., E. J. Goetzl, et al. (2000). "Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing." Am J Physiol Cell Physiol **278**(3): C612-8.
206. Lee, M. J., S. Thangada, et al. (1999). "Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate." Cell **99**(3): 301-12.
207. Lee, M. J., S. Thangada, et al. (2001). "Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis." Mol Cell **8**(3): 693-704.
208. Lee, S. H., D. J. Schloss, et al. (2000). "Maintenance of vascular integrity in the embryo requires signaling through the fibroblast growth factor receptor." J Biol Chem **275**(43): 33679-87.
209. Leenders, W. P., B. Kusters, et al. (2002). "Vessel co-option: how tumors obtain blood supply in the absence of sprouting angiogenesis." Endothelium **9**(2): 83-7.
210. Lemaire, S., G. Lizard, et al. (1998). "Different patterns of IL-1beta secretion, adhesion molecule expression and apoptosis induction in human endothelial cells treated with 7alpha-, 7beta-hydroxycholesterol, or 7-ketocholesterol." FEBS Lett **440**(3): 434-9.
211. Leonarduzzi, G., P. Gamba, et al. (2008). "Oxidation as a crucial reaction for cholesterol to induce tissue degeneration: CD36 overexpression in human promonocytic cells treated with a biologically relevant oxysterol mixture." Aging Cell **7**(3): 375-82.
212. Lepley, D., J. H. Paik, et al. (2005). "The G protein-coupled receptor S1P2 regulates Rho/Rho kinase pathway to inhibit tumor cell migration." Cancer Res **65**(9): 3788-95.
213. Levade, T. and J. P. Jaffrezou (1999). "Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why?" Biochim Biophys Acta **1438**(1): 1-17.
214. Levy, A. P., R. Asleh, et al. (2010). "Haptoglobin: basic and clinical aspects." Antioxid Redox Signal **12**(2): 293-304.
215. Levy, M., S. S. Castillo, et al. (2006). "nSMase2 activation and trafficking are modulated by oxidative stress to induce apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **344**(3): 900-5.

216. Levy, M. and A. H. Futerman (2010). "Mammalian ceramide synthases." *IUBMB Life* **62**(5): 347-56.
217. Li, Y. B., Z. Q. Wang, et al. (2013). "IC-4, a new irreversible EGFR inhibitor, exhibits prominent anti-tumor and anti-angiogenesis activities." *Cancer Lett* **340**(1): 88-96.
218. Liao, L., Q. Zhou, et al. (2013). "Ceramide Mediates Ox-LDL-Induced Human Vascular Smooth Muscle Cell Calcification via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling." *PLoS One* **8**(12): e82379.
219. Libby, P. (2002). "Inflammation in atherosclerosis." *Nature* **420**(6917): 868-74.
220. Liu, Y., R. Wada, et al. (2000). "Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation." *J Clin Invest* **106**(8): 951-61.
221. Lucke, S. and B. Levkau (2010). "Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate." *Cell Physiol Biochem* **26**(1): 87-96.
222. Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." *Nature* **407**(6801): 233-41.
223. Maceyka, M., S. Milstien, et al. (2007). "Shooting the messenger: oxidative stress regulates sphingosine-1-phosphate." *Circ Res* **100**(1): 7-9.
224. Maceyka, M., S. Milstien, et al. (2009). "Sphingosine-1-phosphate: the Swiss army knife of sphingolipid signaling." *J Lipid Res* **50** **Suppl**: S272-6.
225. Maceyka, M., H. Sankala, et al. (2005). "SphK1 and SphK2, sphingosine kinase isoenzymes with opposing functions in sphingolipid metabolism." *J Biol Chem* **280**(44): 37118-29.
226. Maisonpierre, P. C., C. Suri, et al. (1997). "Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis." *Science* **277**(5322): 55-60.
227. Makanya, A. N., D. Stauffer, et al. (2005). Microvascular growth, development, and remodeling in the embryonic avian kidney: the interplay between sprouting and intussusceptive angiogenic mechanisms. *Microsc Res Tech*. **66**: 275-88.
228. Makki, N., K. W. Thiel, et al. (2013). "The epidermal growth factor receptor and its ligands in cardiovascular disease." *Int J Mol Sci* **14**(10): 20597-613.
229. Mallat, Z. and A. Tedgui (1999). "[Apoptosis in the cardiovascular system]." *Ann Pathol* **19**(3): 265-73.
230. Mann, J. M. and M. J. Davies (1996). "Vulnerable plaque. Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries." *Circulation* **94**(5): 928-31.
231. Mansilla, S., Y. Boulaftali, et al. (2008). "Macrophages and platelets are the major source of protease nexin-1 in human atherosclerotic plaque." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**(10): 1844-50.
232. Mao, C. and L. M. Obeid (2008). "Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate." *Biochim Biophys Acta* **1781**(9): 424-34.
233. Marchesini, N. and Y. A. Hannun (2004). "Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation." *Biochem Cell Biol* **82**(1): 27-44.
234. Marchesini, N., W. Osta, et al. (2004). "Role for mammalian neutral sphingomyelinase 2 in confluence-induced growth arrest of MCF7 cells." *J Biol Chem* **279**(24): 25101-11.
235. Matloubian, M., C. G. Lo, et al. (2004). "Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1." *Nature* **427**(6972): 355-60.
236. Matsunaga, T., D. C. Warltier, et al. (2000). "Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide." *Circulation* **102**(25): 3098-103.
237. Mazurais, D., P. Robert, et al. (2002). "Cell type-specific localization of human cardiac S1P receptors." *J Histochem Cytochem* **50**(5): 661-70.
238. McCarthy, M. J., I. M. Loftus, et al. (1999). "Angiogenesis and the atherosclerotic carotid plaque: an association between symptomatology and plaque morphology." *J Vasc Surg* **30**(2): 261-8.
239. Means, C. K. and J. H. Brown (2009). "Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart." *Cardiovasc Res* **82**(2): 193-200.
240. Mehta, V. B., Y. Zhou, et al. (2008). "HB-EGF stimulates eNOS expression and nitric oxide production and promotes eNOS dependent angiogenesis." *Growth Factors* **26**(6): 301-15.
241. Metheny-Barlow, L. J. and L. Y. Li (2003). "The enigmatic role of angiopoietin-1 in tumor angiogenesis." *Cell Res* **13**(5): 309-17.

242. Michaud, J., D. S. Im, et al. (2010). "Inhibitory role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in macrophage recruitment during inflammation." J Immunol **184**(3): 1475-83.
243. Michaud, M. D., G. A. Robitaille, et al. (2009). "Sphingosine-1-phosphate: a novel nonhypoxic activator of hypoxia-inducible factor-1 in vascular cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(6): 902-8.
244. Michel, J. B., O. Thauinat, et al. (2007). "Topological determinants and consequences of adventitial responses to arterial wall injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(6): 1259-68.
245. Michel, J. B., R. Virmani, et al. (2011). "Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability." Eur Heart J **32**(16): 1977-85, 1985a, 1985b, 1985c.
246. Milhas, D., C. J. Clarke, et al. (2010). "Sphingomyelin metabolism at the plasma membrane: implications for bioactive sphingolipids." FEBS Lett **584**(9): 1887-94.
247. Milkiewicz, M., M. D. Brown, et al. (2001). "Association between shear stress, angiogenesis, and VEGF in skeletal muscles in vivo." Microcirculation **8**(4): 229-41.
248. Miller, F. J., Jr., X. Chu, et al. (2010). "A differential role for endocytosis in receptor-mediated activation of Nox1." Antioxid Redox Signal **12**(5): 583-93.
249. Minchenko, A., T. Bauer, et al. (1994). "Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo." Lab Invest **71**(3): 374-9.
250. Mitra, P., C. A. Oskeritzian, et al. (2006). "Role of ABCC1 in export of sphingosine-1-phosphate from mast cells." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(44): 16394-9.
251. Mizugishi, K., T. Yamashita, et al. (2005). "Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development." Mol Cell Biol **25**(24): 11113-21.
252. Morales-Ruiz, M., M. J. Lee, et al. (2001). "Sphingosine 1-phosphate activates Akt, nitric oxide production, and chemotaxis through a Gi protein/phosphoinositide 3-kinase pathway in endothelial cells." J Biol Chem **276**(22): 19672-7.
253. Morel, O., F. Toti, et al. (2006). "Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation?" Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(12): 2594-604.
254. Morel, S., M. A. Frias, et al. (2012). "The natural cardioprotective particle HDL modulates connexin43 gap junction channels." Cardiovasc Res **93**(1): 41-9.
255. Moreno, P. R., K. R. Purushothaman, et al. (2006). "Neovascularization in human atherosclerosis." Circulation **113**(18): 2245-52.
256. Moss, A. (2013). "The angiopoietin:Tie 2 interaction: a potential target for future therapies in human vascular disease." Cytokine Growth Factor Rev **24**(6): 579-92.
257. Mousseau, Y., S. Mollard, et al. (2012). "Fingolimod inhibits PDGF-B-induced migration of vascular smooth muscle cell by down-regulating the S1PR1/S1PR3 pathway." Biochimie **94**(12): 2523-31.
258. Muller, C., J. Bandemer, et al. (2013). "Protein disulfide isomerase modification and inhibition contribute to ER stress and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins." Antioxid Redox Signal **18**(7): 731-42.
259. Muller, Y. A., H. W. Christinger, et al. (1997). "The crystal structure of vascular endothelial growth factor (VEGF) refined to 1.93 Å resolution: multiple copy flexibility and receptor binding." Structure **5**(10): 1325-38.
260. Mullershausen, F., F. Zecri, et al. (2009). "Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors." Nat Chem Biol **5**(6): 428-34.
261. Murakami, A., H. Takasugi, et al. (2010). "Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P3 receptor: investigation based on a new S1P3 receptor antagonist." Mol Pharmacol **77**(4): 704-13.
262. Murata, N., K. Sato, et al. (2000). "Interaction of sphingosine 1-phosphate with plasma components, including lipoproteins, regulates the lipid receptor-mediated actions." Biochem J **352 Pt 3**: 809-15.
263. Murugesan, G., G. M. Chisolm, et al. (1993). "Oxidized low density lipoprotein inhibits the migration of aortic endothelial cells in vitro." J Cell Biol **120**(4): 1011-9.
264. Nagy, E., J. W. Eaton, et al. (2010). "Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(7): 1347-53.
265. Naitoh, K., T. Yano, et al. (2009). "Roles of Cx43-associated protein kinases in suppression of gap junction-mediated chemical coupling by ischemic preconditioning." Am J Physiol Heart Circ Physiol **296**(2): H396-403.



266. Negre-Salvayre, A., N. Auge, et al. (2002). "Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes." *Methods Enzymol* **352**: 62-71.
267. Negre-Salvayre, A., C. Coatrieux, et al. (2008). "Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors." *Br J Pharmacol* **153**(1): 6-20.
268. Negre-Salvayre, A., N. Paillous, et al. (1992). "Wavelength dependence of photoinduced peroxidation and cytotoxicity of human low density lipoproteins." *Photochem Photobiol* **55**(2): 197-204.
269. Negre-Salvayre, A., O. Vieira, et al. (2003). "Oxidized LDL and 4-hydroxynonenal modulate tyrosine kinase receptor activity." *Mol Aspects Med* **24**(4-5): 251-61.
270. Nishi, T., N. Kobayashi, et al. (2013). "Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters." *Biochim Biophys Acta*.
271. Nofer, J. R., M. Bot, et al. (2007). "FTY720, a synthetic sphingosine 1 phosphate analogue, inhibits development of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice." *Circulation* **115**(4): 501-8.
272. Nyberg, L., R. D. Duan, et al. (1996). "Identification of an alkaline sphingomyelinase activity in human bile." *Biochim Biophys Acta* **1300**(1): 42-8.
273. O'Sullivan, C. and K. K. Dev (2013). "The structure and function of the S1P1 receptor." *Trends Pharmacol Sci* **34**(7): 401-12.
274. Ogawa, S., A. Oku, et al. (1998). "A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain." *J Biol Chem* **273**(47): 31273-82.
275. Ogretmen, B. and Y. A. Hannun (2004). "Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment." *Nat Rev Cancer* **4**(8): 604-16.
276. Ohno-Matsui, K., T. Uetama, et al. (2003). "Reduced retinal angiogenesis in MMP-2-deficient mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(12): 5370-5.
277. Okamoto, H., N. Takuwa, et al. (2000). "Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3." *Mol Cell Biol* **20**(24): 9247-61.
278. Olivera, A., T. Kohama, et al. (1999). "Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival." *J Cell Biol* **147**(3): 545-58.
279. Olivera, A. and S. Spiegel (1993). "Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens." *Nature* **365**(6446): 557-60.
280. Osada, M., Y. Yatomi, et al. (2002). "Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist." *Biochem Biophys Res Commun* **299**(3): 483-7.
281. Palecek, S. P., A. Huttenlocher, et al. (1998). "Physical and biochemical regulation of integrin release during rear detachment of migrating cells." *J Cell Sci* **111** ( Pt 7): 929-40.
282. Panetti, T. S., J. Nowlen, et al. (2000). "Sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid stimulate endothelial cell migration." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(4): 1013-9.
283. Parthasarathy, S., D. Steinberg, et al. (1992). "The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis." *Annu Rev Med* **43**: 219-25.
284. Passaniti, A., R. M. Taylor, et al. (1992). "A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor." *Lab Invest* **67**(4): 519-28.
285. Pasterkamp, G., D. P. de Kleijn, et al. (2000). "Arterial remodeling in atherosclerosis, restenosis and after alteration of blood flow: potential mechanisms and clinical implications." *Cardiovasc Res* **45**(4): 843-52.
286. Paulis, Y. W., P. M. Soetekouw, et al. (2010). "Signalling pathways in vasculogenic mimicry." *Biochim Biophys Acta* **1806**(1): 18-28.
287. Pavoine, C. and F. Pecker (2009). "Sphingomyelinases: their regulation and roles in cardiovascular pathophysiology." *Cardiovasc Res* **82**(2): 175-83.
288. Pepper, M. S. (1997). "Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity." *Cytokine Growth Factor Rev* **8**(1): 21-43.
289. Peters, S. L. and A. E. Alewijnse (2007). "Sphingosine-1-phosphate signaling in the cardiovascular system." *Curr Opin Pharmacol* **7**(2): 186-92.



290. Pettus, B. J., J. Bielawski, et al. (2003). "The sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate pathway mediates COX-2 induction and PGE2 production in response to TNF-alpha." FASEB J **17**(11): 1411-21.
291. Pitson, S. M. (2011). "Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling." Trends Biochem Sci **36**(2): 97-107.
292. Pitson, S. M., P. A. Moretti, et al. (2003). "Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation." EMBO J **22**(20): 5491-500.
293. Poulsen, R. R., C. M. McClaskey, et al. (2011). "The Sphingosine-1-phosphate receptor 1 mediates S1P action during cardiac development." BMC Dev Biol **11**: 37.
294. Prewitt, R. L., Chen, II, et al. (1982). "Development of microvascular rarefaction in the spontaneously hypertensive rat." Am J Physiol **243**(2): H243-51.
295. Pugh, C. W. and P. J. Ratcliffe (2003). "Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system." Nat Med **9**(6): 677-84.
296. Qi, X., Y. Okamoto, et al. (2010). "Sustained delivery of sphingosine-1-phosphate using poly(lactic-co-glycolic acid)-based microparticles stimulates Akt/ERK-eNOS mediated angiogenesis and vascular maturation restoring blood flow in ischemic limbs of mice." Eur J Pharmacol **634**(1-3): 121-31.
297. Raab, S. and K. H. Plate (2007). "Different networks, common growth factors: shared growth factors and receptors of the vascular and the nervous system." Acta Neuropathol **113**(6): 607-26.
298. Rader, D. J. and A. Daugherty (2008). "Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis." Nature **451**(7181): 904-13.
299. Rajamaki, K., J. Lappalainen, et al. (2010). "Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation." PLoS One **5**(7): e11765.
300. Rajavashisth, T. B., J. K. Liao, et al. (1999). "Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase." J Biol Chem **274**(17): 11924-9.
301. Razban, V., A. S. Lotfi, et al. (2012). "HIF-1alpha Overexpression Induces Angiogenesis in Mesenchymal Stem Cells." Biores Open Access **1**(4): 174-83.
302. Reiner, J. E. and P. K. Datta (2011). "TGF-beta-dependent and -independent roles of STRAP in cancer." Front Biosci (Landmark Ed) **16**: 105-15.
303. Rezvani, H. R., N. Ali, et al. (2011). "HIF-1alpha in epidermis: oxygen sensing, cutaneous angiogenesis, cancer, and non-cancer disorders." J Invest Dermatol **131**(9): 1793-805.
304. Ribatti, D. (2007). "The discovery of endothelial progenitor cells. An historical review." Leuk Res **31**(4): 439-44.
305. Ribatti, D. and V. Djonov (2012). "Intussusceptive microvascular growth in tumors." Cancer Lett **316**(2): 126-31.
306. Ribatti, D., C. Urbinati, et al. (1995). "Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane." Dev Biol **170**(1): 39-49.
307. Rikitake, Y., K. Hirata, et al. (2002). "Involvement of endothelial nitric oxide in sphingosine-1-phosphate-induced angiogenesis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(1): 108-14.
308. Robbesyn, F., N. Auge, et al. (2005). "High-density lipoproteins prevent the oxidized low-density lipoprotein-induced epidermal [corrected] growth factor receptor activation and subsequent matrix metalloproteinase-2 upregulation." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(6): 1206-12.
309. Rodriguez, C., M. Gonzalez-Diez, et al. (2009). "Sphingosine-1-phosphate: A bioactive lipid that confers high-density lipoprotein with vasculoprotection mediated by nitric oxide and prostacyclin." Thromb Haemost **101**(4): 665-73.
310. Rosen, H. and E. J. Goetzl (2005). "Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network." Nat Rev Immunol **5**(7): 560-70.
311. Rosen, H., G. Sanna, et al. (2003). "Egress: a receptor-regulated step in lymphocyte trafficking." Immunol Rev **195**: 160-77.
312. Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." N Engl J Med **340**(2): 115-26.
313. Rotolo, J. A., J. Zhang, et al. (2005). "Caspase-dependent and -independent activation of acid sphingomyelinase signaling." J Biol Chem **280**(28): 26425-34.

314. Ryu, Y., N. Takuwa, et al. (2002). "Sphingosine-1-phosphate, a platelet-derived lysophospholipid mediator, negatively regulates cellular Rac activity and cell migration in vascular smooth muscle cells." Circ Res **90**(3): 325-32.
315. Sandhoff, K. and K. Harzer (2013). "Gangliosides and gangliosidoses: principles of molecular and metabolic pathogenesis." J Neurosci **33**(25): 10195-208.
316. Sanson, M., C. Ingueneau, et al. (2008). "Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells." Cell Death Differ **15**(8): 1255-65.
317. Sanz, J. and Z. A. Fayad (2008). "Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease." Nature **451**(7181): 953-7.
318. Schiopu, A., B. Frendeus, et al. (2007). "Recombinant antibodies to an oxidized low-density lipoprotein epitope induce rapid regression of atherosclerosis in apobec-1(-)/low-density lipoprotein receptor(-) mice." J Am Coll Cardiol **50**(24): 2313-8.
319. Schissel, S. L., G. A. Keesler, et al. (1998). "The cellular trafficking and zinc dependence of secretory and lysosomal sphingomyelinase, two products of the acid sphingomyelinase gene." J Biol Chem **273**(29): 18250-9.
320. Schissel, S. L., E. H. Schuchman, et al. (1996). "Zn<sup>2+</sup>-stimulated sphingomyelinase is secreted by many cell types and is a product of the acid sphingomyelinase gene." J Biol Chem **271**(31): 18431-6.
321. Schulz, R., P. Gres, et al. (2003). "Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo." FASEB J **17**(10): 1355-7.
322. Sedel, F. (2007). "[Niemann-Pick diseases in adults]." Rev Med Interne **28** Suppl 4: S292-3.
323. Semenza, G. L. (2000). "Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1." J Clin Invest **106**(7): 809-12.
324. Semenza, G. L. (2001). "Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology." Trends Mol Med **7**(8): 345-50.
325. Semenza, G. L. (2004). "Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level." Physiology (Bethesda) **19**: 176-82.
326. Shalaby, F., J. Rossant, et al. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." Nature **376**(6535): 62-6.
327. Shepherd, J., S. M. Cobbe, et al. (1995). "Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group." N Engl J Med **333**(20): 1301-7.
328. Shepherd, J., S. M. Cobbe, et al. (2004). "Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. 1995." Atheroscler Suppl **5**(3): 91-7.
329. Shi, Y. and J. Massague (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell **113**(6): 685-700.
330. Shibuya, M. (2001). "Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis." Cell Struct Funct **26**(1): 25-35.
331. Shibuya, M. (2008). "Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis." BMB Rep **41**(4): 278-86.
332. Shibuya, M. (2013). "Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases." J Biochem **153**(1): 13-9.
333. Shimizu, T., A. De Wispelaere, et al. (2012). "Sphingosine-1-phosphate receptor 3 promotes neointimal hyperplasia in mouse iliac-femoral arteries." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(4): 955-61.
334. Shimizu, T., T. Nakazawa, et al. (2007). "Sphingosine 1-phosphate receptor 2 negatively regulates neointimal formation in mouse arteries." Circ Res **101**(10): 995-1000.
335. Shweiki, D., A. Itin, et al. (1992). "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." Nature **359**(6398): 843-5.
336. Simon, A. M. and A. R. McWhorter (2002). "Vascular abnormalities in mice lacking the endothelial gap junction proteins connexin37 and connexin40." Dev Biol **251**(2): 206-20.
337. Siow, D. and B. Wattenberg (2011). "The compartmentalization and translocation of the sphingosine kinases: mechanisms and functions in cell signaling and sphingolipid metabolism." Crit Rev Biochem Mol Biol **46**(5): 365-75.

338. Siow, D. L., C. D. Anderson, et al. (2011). "Sphingosine kinase localization in the control of sphingolipid metabolism." Adv Enzyme Regul **51**(1): 229-44.
339. Skoura, A. and T. Hla (2009). "Regulation of vascular physiology and pathology by the S1P2 receptor subtype." Cardiovasc Res **82**(2): 221-8.
340. Skoura, A., T. Sanchez, et al. (2007). "Essential role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in pathological angiogenesis of the mouse retina." J Clin Invest **117**(9): 2506-16.
341. Sluimer, J. C. and M. J. Daemen (2009). "Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis." J Pathol **218**(1): 7-29.
342. Smith, E. R., A. H. Merrill, et al. (2000). "Effects of sphingosine and other sphingolipids on protein kinase C." Methods Enzymol **312**: 361-73.
343. Soares, R. and I. Azevedo (2007). "Inhibition of S1P by polyphenols prevents inflammation and angiogenesis: NFkappaB, a downstream effector?" Free Radic Biol Med **42**(2): 311.
344. Solan, J. L. and P. D. Lampe (2005). "Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly." Biochim Biophys Acta **1711**(2): 154-63.
345. Solan, J. L. and P. D. Lampe (2009). "Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects." Biochem J **419**(2): 261-72.
346. Somanath, P. R., A. Ciocea, et al. (2009). "Integrin and growth factor receptor alliance in angiogenesis." Cell Biochem Biophys **53**(2): 53-64.
347. Son, D. J., H. W. Lee, et al. (2008). "Enhanced release of sphingosine-1-phosphate from hypercholesterolemic platelets: role in development of hypercholesterolemic atherosclerosis." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **78**(6): 383-90.
348. Song, J. W. and L. L. Munn (2011). "Fluid forces control endothelial sprouting." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(37): 15342-7.
349. Song, M., X. Yu, et al. (2009). "Blockade of connexin 43 hemichannels reduces neointima formation after vascular injury by inhibiting proliferation and phenotypic modulation of smooth muscle cells." Exp Biol Med (Maywood) **234**(10): 1192-200.
350. Spiegel, S., O. Cuvillier, et al. (1998). "Sphingosine-1-phosphate in cell growth and cell death." Ann N Y Acad Sci **845**: 11-8.
351. Spiegel, S. and S. Milstien (2003). "Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(5): 397-407.
352. Stary, H. C., A. B. Chandler, et al. (1995). "A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Circulation **92**(5): 1355-74.
353. Stary, H. C., A. B. Chandler, et al. (1994). "A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association." Arterioscler Thromb **14**(5): 840-56.
354. Steinberg, D. (1997). "Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance." J Biol Chem **272**(34): 20963-6.
355. Sterner, E., L. Meli, et al. (2013). "FGF-FGFR signaling mediated through glycosaminoglycans in microtiter plate and cell-based microarray platforms." Biochemistry **52**(50): 9009-19.
356. Stetler-Stevenson, W. G. (1999). "Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention." J Clin Invest **103**(9): 1237-41.
357. Stoffel, W., B. Jenke, et al. (2005). "Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(12): 4554-9.
358. Strale, P. O., J. Clarhaut, et al. (2012). "Down-regulation of Connexin43 expression reveals the involvement of caveolin-1 containing lipid rafts in human U251 glioblastoma cell invasion." Mol Carcinog **51**(11): 845-60.
359. Styp-Rekowska, B., R. Hlushchuk, et al. (2011). "Intussusceptive angiogenesis: pillars against the blood flow." Acta Physiol (Oxf) **202**(3): 213-23.
360. Sugimoto, N., N. Takuwa, et al. (2003). "Inhibitory and stimulatory regulation of Rac and cell motility by the G12/13-Rho and Gi pathways integrated downstream of a single G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor isoform." Mol Cell Biol **23**(5): 1534-45.

361. Sugiyama, S., Y. Okada, et al. (2001). "Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes." Am J Pathol **158**(3): 879-91.
362. Sun, H. Y., S. P. Wei, et al. (2010). "Sphingosine-1-phosphate induces human endothelial VEGF and MMP-2 production via transcription factor ZNF580: novel insights into angiogenesis." Biochem Biophys Res Commun **395**(3): 361-6.
363. Sun, W., R. Xu, et al. (2008). "Upregulation of the human alkaline ceramidase 1 and acid ceramidase mediates calcium-induced differentiation of epidermal keratinocytes." J Invest Dermatol **128**(2): 389-97.
364. Takabe, K., S. W. Paugh, et al. (2008). "'Inside-out' signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets." Pharmacol Rev **60**(2): 181-95.
365. Takahashi, H. and M. Shibuya (2005). "The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions." Clin Sci (Lond) **109**(3): 227-41.
366. Tall, A. R. (1998). "An overview of reverse cholesterol transport." Eur Heart J **19 Suppl A**: A31-5.
367. Tanaka, K., D. Nagata, et al. (2011). "Augmented angiogenesis in adventitia promotes growth of atherosclerotic plaque in apolipoprotein E-deficient mice." Atherosclerosis **215**(2): 366-73.
368. Tanimoto, T., Z. G. Jin, et al. (2002). "Transactivation of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flk-1/KDR is involved in sphingosine 1-phosphate-stimulated phosphorylation of Akt and endothelial nitric-oxide synthase (eNOS)." J Biol Chem **277**(45): 42997-3001.
369. Tellier, E., A. Negre-Salvayre, et al. (2007). "Role for furin in tumor necrosis factor alpha-induced activation of the matrix metalloproteinase/sphingolipid mitogenic pathway." Mol Cell Biol **27**(8): 2997-3007.
370. Tepper, A. D., P. Ruurs, et al. (2001). "Effect of overexpression of a neutral sphingomyelinase on CD95-induced ceramide production and apoptosis." Biochem Biophys Res Commun **280**(3): 634-9.
371. Terjung, R. L., R. Zarzeczny, et al. (2002). "Muscle blood flow and mitochondrial function: influence of aging." Int J Sport Nutr Exerc Metab **12**(3): 368-78.
372. Thurston, G., J. S. Rudge, et al. (2000). "Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage." Nat Med **6**(4): 460-3.
373. Tolan, D., A. M. Conway, et al. (1999). "Assessment of the extracellular and intracellular actions of sphingosine 1-phosphate by using the p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade as a model." Cell Signal **11**(5): 349-54.
374. Tsimikas, S. and Y. I. Miller (2011). "Oxidative modification of lipoproteins: mechanisms, role in inflammation and potential clinical applications in cardiovascular disease." Curr Pharm Des **17**(1): 27-37.
375. Tuder, R. M., B. E. Flook, et al. (1995). "Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide." J Clin Invest **95**(4): 1798-807.
376. Tziakas, D. N., G. K. Chalikias, et al. (2008). "Cholesterol composition of erythrocyte membranes and its association with clinical presentation of coronary artery disease." Coron Artery Dis **19**(8): 583-90.
377. Tziakas, D. N., J. C. Kaski, et al. (2007). "Total cholesterol content of erythrocyte membranes is increased in patients with acute coronary syndrome: a new marker of clinical instability?" J Am Coll Cardiol **49**(21): 2081-9.
378. Uchida, K. (2000). "Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases." Free Radic Biol Med **28**(12): 1685-96.
379. Uchida, K. (2003). "Histidine and lysine as targets of oxidative modification." Amino Acids **25**(3-4): 249-57.
380. Uchida, K., M. Kanematsu, et al. (1998). "Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 4882-7.
381. Uchida, K. and T. Kumagai (2003). "4-hydroxy-2-nonenal as a COX-2 inducer." Mol Aspects Med **24**(4-5): 213-8.
382. Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells functional characterization." Trends Cardiovasc Med **14**(8): 318-22.



383. Ushio-Fukai, M. (2007). "VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS." Antioxid Redox Signal **9**(6): 731-9.
384. Ushio-Fukai, M. and Y. Nakamura (2008). "Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as target for cancer therapy." Cancer Lett **266**(1): 37-52.
385. Ushio-Fukai, M., Y. Tang, et al. (2002). "Novel role of gp91(phox)-containing NAD(P)H oxidase in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis." Circ Res **91**(12): 1160-7.
386. van den Berg, J. J., J. A. Op den Kamp, et al. (1992). "Kinetics and site specificity of hydroperoxide-induced oxidative damage in red blood cells." Free Radic Biol Med **12**(6): 487-98.
387. van der Flier, A. and A. Sonnenberg (2001). "Function and interactions of integrins." Cell Tissue Res **305**(3): 285-98.
388. van der Veen, B. S., M. P. de Winther, et al. (2009). "Myeloperoxidase: molecular mechanisms of action and their relevance to human health and disease." Antioxid Redox Signal **11**(11): 2899-937.
389. Vanier, M. T. (2013). "Niemann-Pick diseases." Handb Clin Neurol **113**: 1717-21.
390. Vasquez-Garzon, V. R., P. Rouimi, et al. (2012). "Evaluation of three simple direct or indirect carbonyl detection methods for characterization of oxidative modifications of proteins." Toxicol Mech Methods **22**(4): 296-304.
391. Vieira, O., I. Escargueil-Blanc, et al. (2000). "Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis." FASEB J **14**(3): 532-42.
392. Vilar, J., L. Waeckel, et al. (2008). "Chronic hypoxia-induced angiogenesis normalizes blood pressure in spontaneously hypertensive rats." Circ Res **103**(7): 761-9.
393. Vilar, J. M., R. Jansen, et al. (2006). "Signal processing in the TGF-beta superfamily ligand-receptor network." PLoS Comput Biol **2**(1): e3.
394. Vindis, C., M. Elbaz, et al. (2005). "Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(3): 639-45.
395. Vindis, C., I. Escargueil-Blanc, et al. (2006). "Desensitization of platelet-derived growth factor receptor-beta by oxidized lipids in vascular cells and atherosclerotic lesions: prevention by aldehyde scavengers." Circ Res **98**(6): 785-92.
396. Virmani, R., F. D. Kolodgie, et al. (2005). "Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(10): 2054-61.
397. Waddington, E. I., K. D. Croft, et al. (2003). "Fatty acid oxidation products in human atherosclerotic plaque: an analysis of clinical and histopathological correlates." Atherosclerosis **167**(1): 111-20.
398. Wagner, P. D. (2001). "Skeletal muscle angiogenesis. A possible role for hypoxia." Adv Exp Med Biol **502**: 21-38.
399. Wallez, Y., I. Vilgrain, et al. (2006). "Angiogenesis: the VE-cadherin switch." Trends Cardiovasc Med **16**(2): 55-9.
400. Waltenberger, J., U. Mayr, et al. (1996). "Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia." Circulation **94**(7): 1647-54.
401. Wang, F., J. R. Van Brocklyn, et al. (1999). "Sphingosine 1-phosphate stimulates cell migration through a G(i)-coupled cell surface receptor. Potential involvement in angiogenesis." J Biol Chem **274**(50): 35343-50.
402. Wang, G., J. Silva, et al. (2005). "Direct binding to ceramide activates protein kinase Czeta before the formation of a pro-apoptotic complex with PAR-4 in differentiating stem cells." J Biol Chem **280**(28): 26415-24.
403. Wang, H. H., C. H. Su, et al. (2013). "Reduction of connexin43 in human endothelial progenitor cells impairs the angiogenic potential." Angiogenesis **16**(3): 553-60.
404. Wang, R., K. Chadalavada, et al. (2010). "Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium." Nature **468**(7325): 829-33.
405. Ward, M. R., G. Pasterkamp, et al. (2000). "Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications." Circulation **102**(10): 1186-91.



406. Watson, A. D., N. Leitinger, et al. (1997). "Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo." J Biol Chem **272**(21): 13597-607.
407. Wattenberg, B. W., S. M. Pitson, et al. (2006). "The sphingosine and diacylglycerol kinase superfamily of signaling kinases: localization as a key to signaling function." J Lipid Res **47**(6): 1128-39.
408. Wenger, R. H. (2002). "Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression." FASEB J **16**(10): 1151-62.
409. Wiesener, M. S., H. Turley, et al. (1998). "Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ." Blood **92**(7): 2260-8.
410. Wise, L. M., T. Veikkola, et al. (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(6): 3071-6.
411. Witztum, J. L. and D. Steinberg (1991). "Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis." J Clin Invest **88**(6): 1785-92.
412. Wong, A. L., Z. A. Haroon, et al. (1997). "Tie2 expression and phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues." Circ Res **81**(4): 567-74.
413. Wu, B. X., C. J. Clarke, et al. (2010). "Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses." Neuromolecular Med **12**(4): 320-30.
414. Wu, Y., Q. Wang, et al. (2009). "Effect of oxidized low-density lipoprotein on survival and function of endothelial progenitor cell mediated by p38 signal pathway." J Cardiovasc Pharmacol **53**(2): 151-6.
415. Xu, R., J. Jin, et al. (2006). "Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P." FASEB J **20**(11): 1813-25.
416. Yamakawa, K., M. Hosoi, et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists increase vascular endothelial growth factor expression in human vascular smooth muscle cells." Biochem Biophys Res Commun **271**(3): 571-4.
417. Yonesu, K., T. Nakamura, et al. (2010). "A novel sphingosine-1-phosphate receptor 1 antagonist prevents the proliferation and relaxation of vascular endothelial cells by sphingosine-1-phosphate." Biol Pharm Bull **33**(9): 1500-5.
418. Yoshida, H., O. Quehenberger, et al. (1998). "Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macroscialin in resident mouse peritoneal macrophages." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(5): 794-802.
419. Young, N. and J. R. Van Brocklyn (2006). "Signal transduction of sphingosine-1-phosphate G protein-coupled receptors." ScientificWorldJournal **6**: 946-66.
420. Yu, S., S. L. Wong, et al. (2011). "Oxidized LDL at low concentration promotes in-vitro angiogenesis and activates nitric oxide synthase through PI3K/Akt/eNOS pathway in human coronary artery endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **407**(1): 44-8.
421. Yun, J. K. and M. Kester (2002). "Regulatory role of sphingomyelin metabolites in hypoxia-induced vascular smooth muscle cell proliferation." Arch Biochem Biophys **408**(1): 78-86.
422. Yunoki, K., T. Naruko, et al. (2009). "Enhanced expression of haemoglobin scavenger receptor in accumulated macrophages of culprit lesions in acute coronary syndromes." Eur Heart J **30**(15): 1844-52.
423. Zhou, A., S. Egginton, et al. (1998). "Internal division of capillaries in rat skeletal muscle in response to chronic vasodilator treatment with  $\alpha$ 1-antagonist prazosin." Cell Tissue Res **293**(2): 293-303.
424. Zhou, H., S. A. Summers, et al. (1998). "Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis." J Biol Chem **273**(26): 16568-75.
425. Zumbansen, M. and W. Stoffel (2002). "Neutral sphingomyelinase 1 deficiency in the mouse causes no lipid storage disease." Mol Cell Biol **22**(11): 3633-8.

## **ANNEXES**



ORIGINAL RESEARCH COMMUNICATION

# Protein Disulfide Isomerase Modification and Inhibition Contribute to ER Stress and Apoptosis Induced by Oxidized Low Density Lipoproteins

Carole Muller,<sup>1,2</sup> Jan Bandemer,<sup>1</sup> Cecile Vindis,<sup>1,2</sup> Caroline Camaré,<sup>1,2</sup> Elodie Mucher,<sup>2</sup> Françoise Guéraud,<sup>3</sup> Pauline Larroque-Cardoso,<sup>1,2</sup> Corinne Bernis,<sup>1,2</sup> Nathalie Auge,<sup>1,2</sup> Robert Salvayre,<sup>1,2</sup> and Anne Negre-Salvayre<sup>1,2</sup>

## Abstract

**Aims:** Protein disulfide isomerase (PDI) is an abundant endoplasmic reticulum (ER)-resident chaperone and oxidoreductase that catalyzes formation and rearrangement (isomerization) of disulfide bonds, thereby participating in protein folding. PDI modification by nitrosative stress is known to increase protein misfolding, ER stress, and neuronal apoptosis. As LDL oxidation and ER stress may play a role in atherogenesis, this work was designed to investigate whether PDI was inactivated by oxLDLs, thereby participating in oxLDL-induced ER stress and apoptosis. **Results:** Preincubation of human endothelial HMEC-1 and of macrophagic U937 cells with toxic concentration of oxLDLs induced PDI inhibition and modification, as assessed by 4-HNE-PDI adducts formation. PDI inhibition by bacitracin potentiated ER stress (increased mRNA expression of CHOP and sXBP1) and apoptosis induced by oxLDLs. In contrast, increased PDI activity by overexpression of an active wild-type PDI was associated with reduced oxLDL-induced ER stress and toxicity, whereas the overexpression of a mutant inactive form was not protective. These effects on PDI were mimicked by exogenous 4-HNE and prevented by the carbonyl-scavengers N-acetylcysteine and pyridoxamine, which reduced CHOP expression and toxicity by oxLDLs. Interestingly, 4-HNE-modified PDI was detected in the lipid-rich areas of human advanced atherosclerotic lesions. **Innovation and Conclusions:** PDI modification by oxLDLs or by reactive carbonyls inhibits its enzymatic activity and potentiates both ER stress and apoptosis by oxLDLs. PDI modification by lipid peroxidation products in atherosclerotic lesions suggests that a loss of function of PDI may occur *in vivo*, and may contribute to local ER stress, apoptosis, and plaque progression. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 731–742.

## Introduction

Oxidized low-density lipoproteins (oxLDLs) are involved in atherogenesis (10, 11, 46). Moderate concentrations of oxLDLs trigger recruitment of macrophages, cellular activation, proliferation, and inflammation, whereas higher concentrations are proapoptotic (16, 36). In atherosclerotic areas, the modification of cellular proteins by reactive carbonyl compounds, such as aldehydes derived from lipid peroxidation, suggests that the ‘carbonyl stress’ may contribute to the conformational change (misfolding) and impaired

function of modified proteins (17, 18, 21, 23, 37, 38). Several defense mechanisms have been set up during the evolution to prevent the accumulation and the pathogenic effect of misfolded proteins generated during harsh conditions, including refolding by chaperones such as HSP, PDI, labeling by ubiquitination, and degradation by proteasome, deposition as aggregates, or fine tuning of protein synthesis *via* ER stress.

Protein disulfide isomerase (PDI) is a chaperone member of the thioredoxin superfamily, located in the ER lumen, in the cytosol, and at the cell surface (9, 22). In addition to its chaperone activity, this multifunctional protein is an

<sup>1</sup>Inserm UMR-1048, Team “Atherosclerosis and Graft Arteriosclerosis”, Toulouse, France.

<sup>2</sup>Université Toulouse-3, and CHU-Toulouse, Toulouse, France.

<sup>3</sup>INRA UMR1331, TOXALIM (Research Center in Food Toxicology), Toulouse, France.

### Innovation

The data that we present show that oxLDLs and 4-HNE modify and inhibit the enzymatic activity of PDI, a major chaperone in protein folding in the ER. The modification of PDI in the vascular wall suggests that its activity could be inhibited in atherosclerotic lesions, thereby altering the folding of nascent proteins in the ER and participating to activate ER stress/UPR response, and to promote apoptosis when ER stress is prolonged. This may locally aggravate the lesions and lead finally to plaque destabilization and rupture. More generally, these results point out that carbonyl stress, whose implication in advanced atherosclerotic plaques has been largely underestimated, represents a major aggravating mechanism as it progressively inhibits systems devoted to cellular and tissue protection.

oxido-reductase that catalyzes the formation of disulfide bonds on newly formed proteins (22, 44). The presence of two cystein-rich thioredoxin-like catalytic domains present at the N- and C-terminal moiety (39), determines its redox potential (15). PDI is antiapoptotic and attenuates neuronal cell death resulting from ER stress induction (39). This protective effect may depend on its subcellular localization, but the precise function of the ER, cytosolic or cell-surface associated isoforms is only partly understood (15). PDI is a target of S-nitrosylation and the resulting structural modifications are associated with a loss of its protective properties, with probable implication in neurodegenerative processes (39). In the cardiovascular field, PDI could protect cardiomyocytes of ischemic insult (34), but its possible role in atherosclerosis is not known.

OxLDL-induced modification of cellular proteins disturbs the expression and the regulation of pathways involved in cell homeostasis, such as the ubiquitin/proteasome system (40), and in cell signaling, such as the PDGFR pathway, which are progressively inhibited after prolonged contact with toxic oxLDL concentrations (5, 41). We recently reported that apoptosis of vascular cells induced by oxLDLs is associated with a sustained endoplasmic reticulum stress (ER stress) and unfolded protein response (UPR), characterized by a persistent phosphorylation of the ER stress sensor IRE1 $\alpha$  involved in the c-Jun N-terminal kinase pathway, and an increased expression of the ER stress markers XBP1 (spliced form) and CHOP (25, 26). Recent advances indicate that ER stress and UPR are chronically activated in atherosclerotic lesions, which contributes to maintain inflammation, and lesional cell apoptosis, all of which promoting atherosclerosis progression (31). As a matter of fact, the proapoptotic factor CHOP is involved in ER stress-induced apoptosis (30), and its deletion in mice results in a reduction of atherosclerotic lesions and of necrotic areas, supporting the fact that prolonged ER stress within the vascular wall, is proapoptotic and proatherogenic (33).

As the accumulation of lipid oxidation products (26) and PDI modification (35, 39) are strong inducers of prolonged ER stress and apoptosis (24, 47), we hypothesized that PDI could be targeted and inhibited by carbonyl compounds, such as 4-HNE, present in oxLDLs and in atherosclerotic lesions (5, 18, 37), and that PDI inhibition may result in increased protein misfolding and sustained ER stress, thereby promoting apoptosis and progression of atherosclerotic lesions (31, 33).

The aim of this study was to investigate whether PDI is a target of oxLDLs and whether PDI modification plays a role in oxLDL-induced ER stress and apoptosis in vascular cells.

### Results

#### *OxLDLs inhibit PDI enzyme activity*

In preliminary experiments, we observed that the activity of the antiapoptotic chaperone PDI was reduced in cells incubated with toxic concentration of oxLDLs. Since i) PDI is an abundant ER-resident enzyme/chaperone that is involved in the folding of proteins, ii) oxLDLs trigger both ER stress and apoptosis (25, 26) in vascular cells, and iii) nitrosative stress elicits PDI inactivation and increases neuronal apoptosis (39), we aimed to investigate whether PDI alteration by oxLDLs play a role in oxLDL-induced ER stress and apoptosis.

In HMEC-1 incubated with oxLDLs, PDI reductase activity determined with the fluorescent substrate Di-E-GSSG (diesoin glutathione disulfide) (20) was altered in a time- and dose-dependent manner (Fig. 1A and Supplementary Fig. 1; supplementary data are available online at [www.liebertonline.com/ars](http://www.liebertonline.com/ars)). For instance, in HMEC-1 incubated for 24 h with 200 mg/L oxLDLs, PDI reductase activity was reduced by 55% (compared to the basal PDI activity) (Fig. 1A). Interestingly, PDI activity was not significantly altered in HMEC-1 incubated with native (nonoxidized) LDLs (200 mg apoB/L) (Fig. 1A). Thus PDI inhibition is dependent on the oxidation status of LDLs, but is independent of the mechanism of oxidation utilized, since similar results were observed using three different methods of LDL oxidation (UV/Cu mildly oxLDLs, copper-oxLDLs, or cell-oxLDLs) (Supplementary Table S1).

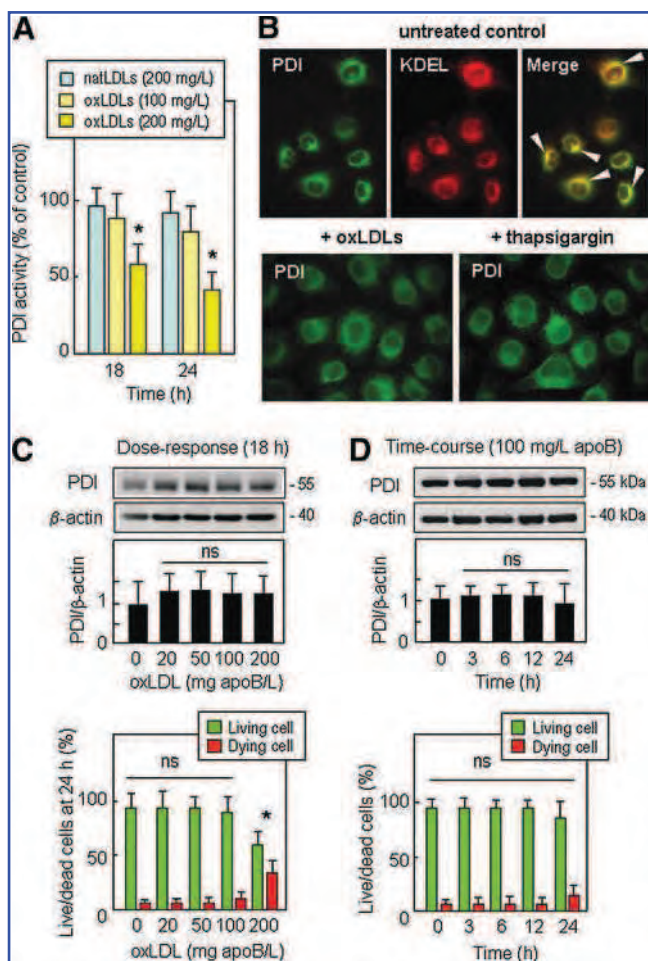
As PDI expression can be regulated by several stresses (27, 39), we checked whether the increase or loss of PDI activity in cells treated with oxLDLs was associated with changes in the PDI protein level or changes in subcellular distribution of PDI. In resting HMEC-1, immunofluorescence staining showed that PDI was mainly co-localized with KDEL motive-bearing proteins (Fig. 1B, upper panel), in agreement with the main subcellular location of PDI in the ER. Noteworthy, incubation of cells with oxLDLs (200 mg/L) or by thapsigargin (1  $\mu$ mol/L) for 18 h induced no obvious change in the subcellular distribution of PDI (Fig. 1B, lower panel). Dose-responses (0–200 mg apoB/L for 18 h incubation) and time-course experiments (with 100 mg/L apoB/L), showed no significant change of PDI expression over the time of the experiment, in HMEC-1 (Fig. 1C and 1D) and in the macrophage-like cell line U937 (Supplementary Fig. S2). This suggests that PDI inhibition in cells treated by 200 mg/L oxLDLs (Fig. 1A) does not result from a decrease of PDI protein level (Fig. 1C and 1D).

Interestingly, the comparison between the time-course of PDI activity (Fig. 1A) and oxLDL-induced toxicity (Fig. 1C and 1D) showed that PDI inactivation occurred before cell death. This led us to investigate whether PDI inactivation is involved (or not) in the susceptibility of cells to the apoptotic effect of oxLDLs.

#### *PDI inhibition by bacitracin increases both ER stress and apoptosis induced by oxLDLs*

PDI is generally thought to be protective, because its upregulation during brain ischemia protects against neuronal apoptosis (32) and, reversely, PDI inactivation abrogates the





**FIG. 1. Effect of oxLDLs on PDI activity and expression.** (A) PDI reductase activity in HMEC-1 incubated with the indicated concentration of oxidized and native LDLs for the indicated time. The enzymatic activity of PDI was measured in cell extracts, using Di-E-GSSG, as described in the Methods section. The data are expressed as % of fluorescence/fluorescence of the unstimulated control. (B) Immunofluorescence of PDI in HMEC-1. *Upper panel* : double immunofluorescence staining for PDI (green) and KDEL motive-bearing proteins (red) in control unstimulated HMEC-1 and merged image (*right panel*) showing the ER co-localization of PDI and KDEL (yellow areas). *Lower panel* : immunofluorescence staining for PDI in HMEC-1 treated with oxLDLs (200 mg apoB/L) (*left*), or with thapsigargin (1  $\mu$ mol/L) (*right*) for 18h. Dose-response (C) and time-course (D) of PDI expression in HMEC-1 incubated with oxLDLs. (C) *upper panel*, HMEC-1 were incubated for 18 h with the indicated concentrations of oxLDLs (0–200 mg/L). (D) HMEC-1 were incubated with 100 mg/L of oxLDLs for the indicated time. PDI expression was evaluated by Western blot experiments, using  $\beta$ -actin as a reference. The values for integrated density of each spot were evaluated using Image J software and expressed as PDI/ $\beta$ -actin ratio. Living, apoptotic, and necrotic cells were counted after Syto13/PI live/dead fluorescent staining (*lower panels*), either after 24 h incubation with the indicated oxLDL concentration (*left panel*) or at the indicated time with 100 mg apoB/L (*right panel*). In A, C, and D, mean  $\pm$  SD of at least 4 separate experiments, \* $p$  < 0.05. (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars).)

protection against neuronal cell death triggered by ER stress (2, 39). However, a recent report showed that PDI inhibition in rat brain cells suppressed the toxicity of mutant huntingtin and A $\beta$  amyloid peptides (7). This led us to investigate whether PDI inhibition plays a role in oxLDL toxicity. This question was addressed by examining whether the toxic effect of oxLDLs was affected when the activity of PDI was modulated, either reduced by inhibiting PDI by the classical PDI inhibitor bacitracin (13), or increased by transfection of a myc-tagged active PDI cDNA.

Interestingly, under the used conditions, PDI inhibition (Fig. 2A) by bacitracin was not associated to changes of ER stress markers levels (CHOP mRNA and sXBP1) (Fig. 2A–2C) and was not toxic *per se* (up to 10  $\mu$ mol/L) in the absence of oxLDLs (Fig. 2D–2G). In contrast, bacitracin potentiated dramatically the ER stress (increased CHOP and sXBP1 mRNAs) and the toxic effect of oxLDLs, since oxLDLs (100 mg apoB/L) used alone were not toxic but became toxic in the presence of bacitracin (Fig. 2D and 2E). This synergistic effect was obvious with 10  $\mu$ mol/L bacitracin and 100 mg/L oxLDLs that are highly toxic (MTT < 50%) when they are incubated simultaneously with HMEC-1, whereas they are not or only slightly toxic (< 10%) when each is incubated alone with the HMEC-1 (Fig. 2D). In the same way, bacitracin potentiated the toxic and apoptotic effects oxLDLs (200 mg apoB/L) in HMEC-1 (Fig. 2E–2G) and in U937 cells (Supplementary Fig. S3).

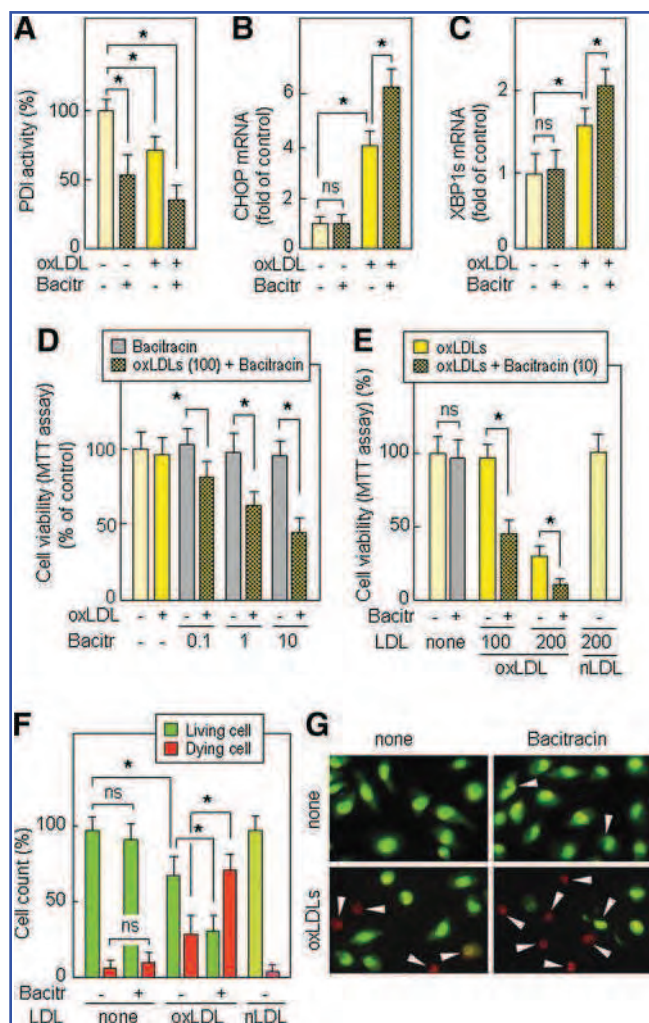
This mutual potentiation of the toxicity of oxLDLs and bacitracin may suggest that PDI inhibition by bacitracin enhances the toxic effect of oxLDLs, and, conversely, that the active PDI participates in the defense against oxLDL-induced toxicity. In order to test the hypothesis that active PDI may reduce both ER stress and toxicity elicited by oxLDLs, we used another approach utilizing HMEC-1 transduced and expressing an active myc-tagged wild-type PDI (myc-PDI wt) and an inactive myc-tagged mutated PDI cDNA (myc-PDI mut) (Fig. 3).

The expression of PDI in transfected cells was assessed by Western blot (Fig. 3A). The PDI reductase activity in myc-PDI wt HMEC-1 was about twice that of the parental HMEC-1, whereas in myc-PDI mut HMEC-1 it was in the same range as in control (untransfected) HMEC-1 (Fig. 3B) and in mock-transfected HMEC-1 (data not shown). As expected, in myc-PDI mut HMEC-1, the expression of the inactive PDI does not prevent and even increases the toxicity of oxLDLs (Fig. 3D–3G), thus suggesting that the enzymatic activity of PDI is required for the protection. In contrast, the forced expression of the active PDI in myc-PDI wt HMEC-1 increased the PDI reductase activity, reduced CHOP expression and the toxicity of oxLDLs (Fig. 3D–3I and Supplementary Fig. S4). The data from transfection experiments are consistent with those obtained with bacitracin, and all these data contribute to support the hypothesis that active PDI participates in the cellular defenses against oxLDL-induced toxicity, in agreement with the protective role of PDI against neuronal apoptosis by nitrosative stress (39) and cardiomyocyte apoptosis during ischemia (34).

Interestingly, PDI overexpression prevented the toxic effect of two other ER stress inducers, thapsigargin (Supplementary Fig. S5) and tunicamycin (data not shown).

**PDI inhibition by oxLDLs is associated with the formation of 4-HNE-PDI adducts**

The data reported in Figure 1 pointed out that toxic concentration of oxLDLs inhibited PDI activity, without altering



**FIG. 2. PDI inhibition by bacitracin potentiates oxLDL-induced toxicity in HMEC-1.** (A) Effect of bacitracin (10  $\mu$ mol/L) on PDI activity, evaluated in cells incubated for 18 h without or with 200 mg apoB/L of oxLDLs. (B and C) Effect of bacitracin (10  $\mu$ mol/L) or/and oxLDLs on the expression of CHOP and sXBP1. HMEC-1 were incubated with or without bacitracin (Bacitr, 10  $\mu$ mol/L) and with or without oxLDLs (200 mg apoB/L) for 14 h. CHOP and sXBP1 mRNAs were evaluated by Q-PCR. The levels of mRNAs were normalized to GAPDH mRNAs and compared to the basal mRNA levels in untreated cells. (D–G) Cell viability of HMEC-1 incubated with the indicated concentration of bacitracin (D) or 10  $\mu$ mol/L (E–G) and with oxLDLs (100 mg apoB/L in D, 100 and 200 in E, and 200 in F, G) or native LDLs (natLDL were used at 200 mg apoB/L, in E, F). Cell viability was evaluated after 24 h incubation, by the MTT assay (D, E) or by the live/dead Syto13/PI fluorescent assay (F, G). Under the used conditions, the major part of dying cells exhibited the morphological features of apoptosis (or post-apoptotic necrosis) and primary necrosis represented only few percent of the dying cells. In A–F, the data are expressed as % or ratio to the untreated control (A–E) or as per cent to total number of cell counted (F). Mean  $\pm$ SD of at least 4 separate experiments. \* $p$  < 0.05. In G, representative pictures of Syto13/PI fluorescent staining of HMEC-1 pre-treated or not with bacitracin and/or oxLDLs. (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars).)

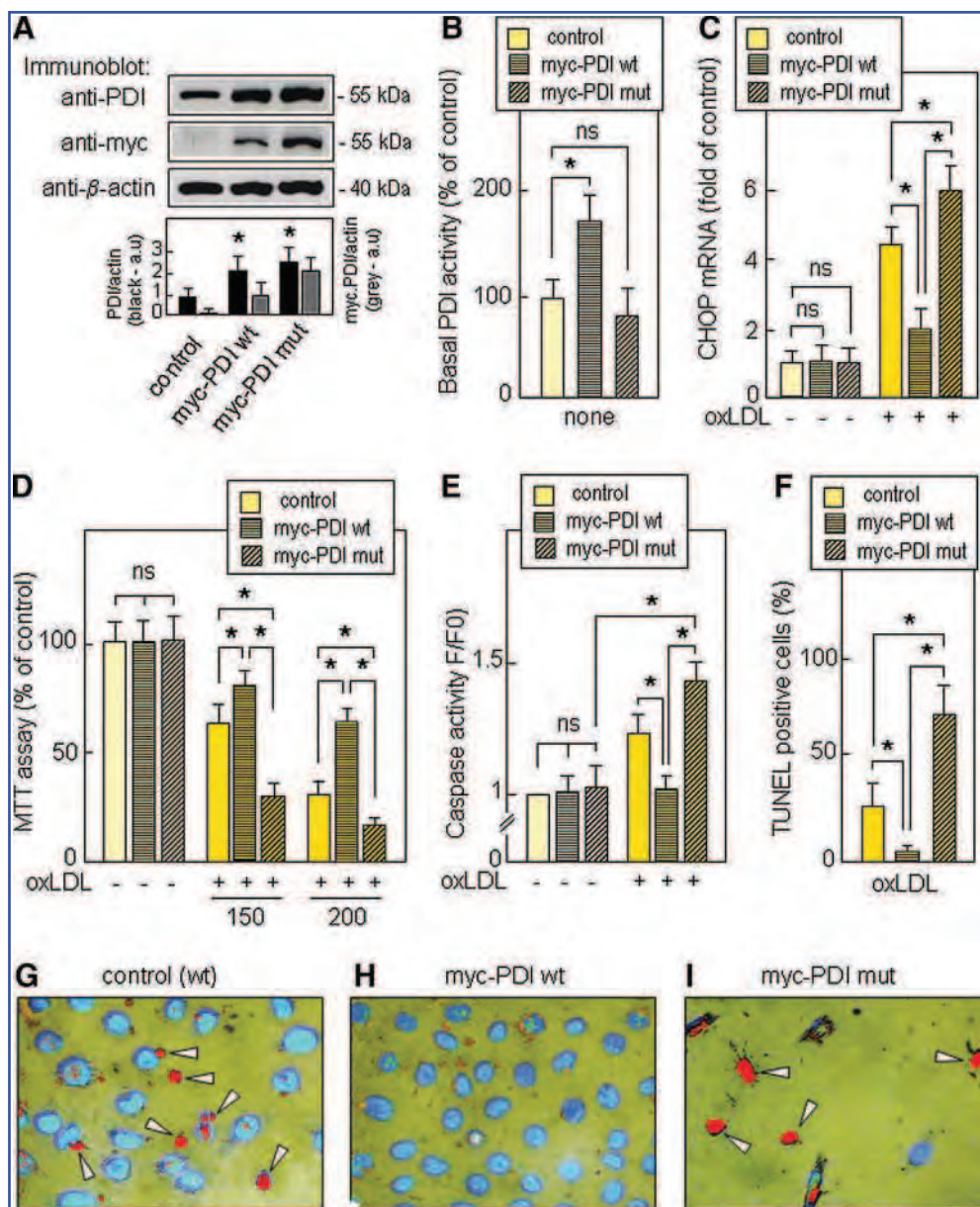
protein expression. OxLDLs contain reactive carbonyl compounds able to react with thiol and free amino groups of proteins, thereby altering their conformation and/or their enzymatic function (18, 23, 38). Since the active sites of thioredoxin-like domains of PDI contain Cys-x-x-Cys motifs which are involved in the disulfide oxidoreductase activity (22, 39), we investigated whether oxLDLs might inhibit PDI via a post-translational modification by lipid peroxidation products.

In cells incubated with oxLDLs (200 mg apoB/L) or with 4-HNE (10  $\mu$ mol/L), (one of the most abundant reactive carbonyl compound formed during the oxidation of LDLs or cellular lipids), we observed a modification of PDI protein, detected by immunoblot of PDI immunoprecipitates with an anti-4-HNE-Michael adduct antibody, and characterized by the formation of 4-HNE-adducts on high molecular weight PDI-reactive bands (Fig. 4A). Note that SDS-PAGE was performed with or without mercaptoethanol in order to avoid immunoglobulin interference to visualize the 55 kDa PDI and the modified/polymerized PDI. Western blots labeled with the anti-PDI antibody in untreated HMEC-1, showed only the presence of monomeric PDI, but revealed several additional bands with higher molecular weight in cells treated by 4-HNE or oxLDLs (Fig. 4A). PDI modification by 4-HNE was associated with a loss of enzymatic activity (Fig. 4B) and a rise of toxicity (Supplementary Fig. S6) in a dose-dependent manner. Immunofluorescence and confocal microscopy showed that 4-HNE adducts co-localize with PDI in the ER (Fig. 4C). These data confirm the formation of 4-HNE-PDI adducts observed on Western blots, and suggest that PDI modification by 4-HNE (and probably by other reactive carbonyl generated during lipid peroxidation) may lead to a progressive loss of PDI enzymatic activity.

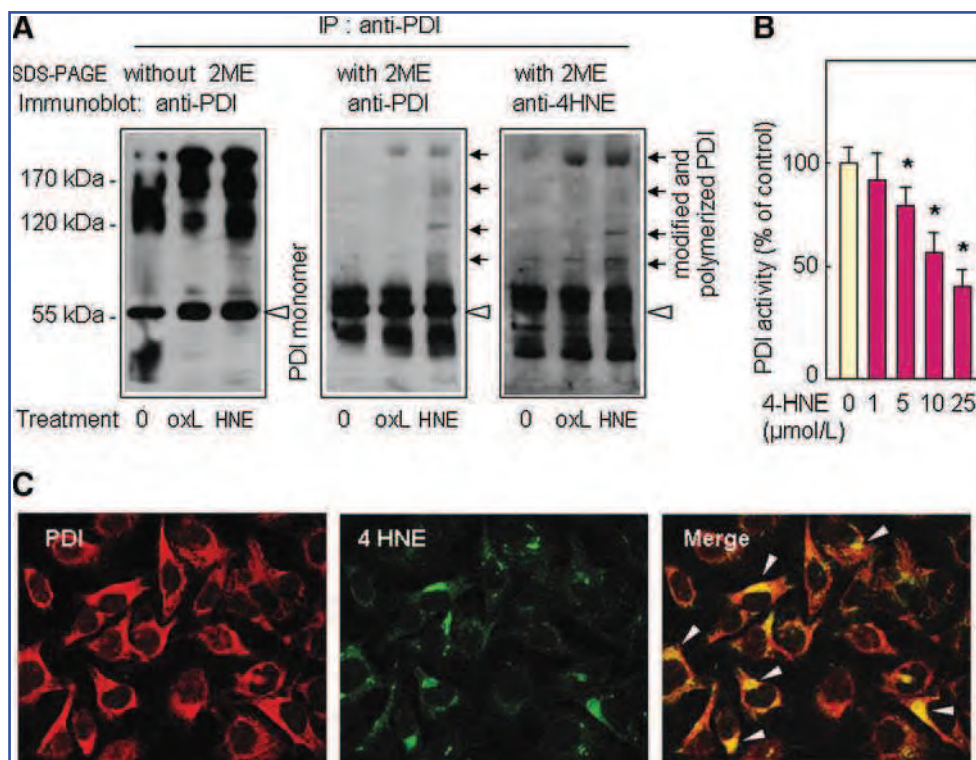
Interestingly, antioxidants such as trolox and BHT, and carbonyl scavengers, such as pyridoxamine and N-acetyl cysteine (NAC), prevented both the modification and the inactivation of PDI by oxLDLs (Fig. 5A and Supplementary Fig. S7).

This strongly suggests that oxLDLs act mainly by triggering a cellular oxidative stress that induces in turn the peroxidation of cellular lipids and the formation of reactive aldehydes (among them 4-HNE). This is consistent with the fact that the major part of 4-HNE contained in oxLDLs, forms adducts with LDL components (e.g., apoB or phosphatidylethanolamine) and that only a minor part (10%–20%) of 4-HNE remains free, dissolved in the lipid phase of oxLDLs (5). However, the free 4-HNE contained in oxLDLs is able to react with cell proteins (4), including PDI, as shown by incubation of cells with oxLDLs pre-loaded with radiolabeled [ $^3$ H]4-HNE (Supplementary Fig. S8). The carbonyl scavengers NAC and pyridoxamine prevented PDI inactivation by 4-HNE (Fig. 5B) and inhibited CHOP mRNA increase and oxLDL toxicity (Fig. 5C and 5D). In contrast, the antioxidants trolox and BHT were almost completely inefficient to prevent PDI inactivation by 4-HNE (Fig. 5B). This suggests that 4-HNE-PDI adducts generated in cells treated with exogenous free 4-HNE may result from the direct reaction of the 4-HNE with PDI (without any additional oxidative stress), in contrast to oxLDLs that act mainly by triggering cellular oxidative stress. As expected, other aldehydes, issued from lipid peroxidation and glycoxidation, are able to inhibit PDI (Supplementary Table S1). Methylglyoxal (MGO) and glyoxal (GO), two  $\alpha$ -ketoaldehydes formed





**FIG. 3. Expression of wild-type myc-PDI or inactive mutant myc-PDI modulates ER stress and apoptosis induced by oxLDLs in HMEC-1.** (A) Expression of the whole PDI (upper), myc-tagged PDI (middle), and β-actin (lower panel) evaluated by Western blot on lysates from control (parental untransfected) HMEC-1, and HMEC-1 transfected with myc-PDI wt cDNA and myc-PDI mutant cDNA. Densitometric analysis was performed using Image J software and expressed as ratio PDI/β-actin (black bars) or myc-PDI/β-actin (gray bars). Western blot representative of 3 experiments. (B) Basal PDI activity in control HMEC-1, myc-PDI wt HMEC-1, or myc-PDI mut HMEC-1. PDI activity was evaluated using the Di-E-GSSG fluorescent substrate under standard conditions used in Figure 1A. (C) CHOP mRNA expression, evaluated by Q-PCR, in control, myc-PDI wt, or myc-PDI mut HMEC-1, treated with or without oxLDLs (200 mg apoB/L) for 14 h. CHOP mRNA levels were normalized to GAPDH mRNA and expressed as ratio of the initial level in controls. (D) Cell viability in control, myc-PDI wt, or myc-PDI mut HMEC-1, treated with or without oxLDLs (200 mg apoB/L) for 24 h, evaluated by the MTT assay. (E) Determination of the DEVDase activity in cell extracts from control, myc-PDI wt, and myc-PDI mut HMEC-1, treated with or without oxLDLs (200 mg apoB/L) for 18 h, using the fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC, as indicated in the Supplementary Section. (F–I) Evaluation of apoptotic cells by TUNEL labeling of control, myc-PDI wt, or myc-PDI mut HMEC-1 incubated with for 24 h with oxLDLs (200 mg/L). Cells were fixed and TUNEL stained by the ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon/Millipore France). Red-colored TUNEL-positive cells were counted and expressed as percentage of total cell number (nuclei labeled by DAPI) (F). (G–I) Composite images of DAPI (fluorescence) TUNEL (bright-field). See original pictures used to obtain the composite pictures in Supplementary Figure S4. In B–F, the data are expressed as % or ratio of the control. Mean ± SD of at least 3 separate experiments; \**p* < 0.05. (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars).)



**FIG. 4. 4-HNE mimics PDI modification and inhibition induced by oxLDLs.** (A) Formation of 4-HNE-PDI adducts by oxLDLs and by 4-HNE. After 14 h incubation of HMEC-1 with or without oxLDLs (200 mg/L) or 4-HNE (10 μmol/L), cells were lysed and PDI was immunoprecipitated and resolved by SDS-PAGE with or without 2-mercaptoethanol (2ME), as indicated, and revealed with anti-PDI or anti-4-HNE-adduct antibodies. *Arrowheads* show the monomeric PDI (55 kDa) and *arrows* the high molecular weight cross-linked modified PDI. (B) Inhibition of PDI activity by increasing 4-HNE concentrations. HMEC-1 were incubated for 18 h with the indicated concentration of 4-HNE. Then cells were harvested, lysed, and PDI activity was determined with the Di-E-GSSG fluorometric assay, under conditions used in Figure 1A. PDI activity was expressed as % of the untreated control. Mean ± SD of 4 separate experiments, \* $p < 0.05$ . (C) Immunofluorescence confocal microscopy of HMEC-1 incubated for 18 h with oxLDLs (200 mg/L) and labeled with anti-PDI polyclonal (Sigma) and anti-4-HNE monoclonal antibody (Oxis). The *white arrows* show some co-localization of PDI and 4-HNE adducts (*yellow areas*) on the composite image (merge). Representative pictures of 4 separate experiments. (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars).)

under hyperglycemic conditions and precursors of advanced glycation end product (AGE) required higher concentrations (100 μmol/L) to inhibit PDI.

#### PDI modification by 4-HNE in atherosclerotic lesions

PDI was present both in human mammary arteries and in human carotid atherosclerotic plaques where it was relatively highly expressed in endothelium and subendothelial areas and in the central macrophagic core (Fig. 6A and Supplementary Fig. S9), consistent with the constitutive expression of PDI in cultured vascular cells and in human macrophage-like U937 cells (Supplementary Fig. S10). 4-HNE-adducts were detected in atherosclerotic lesions and were localized in the same areas as PDI, in the endothelium and in the central necrotic core of advanced plaques (Fig. 6A and Supplementary Fig. 9). Western blots of PDI immunoprecipitates showed the presence of 4-HNE-PDI adducts, particularly in high MW polymerized PDI from atherosclerotic carotid plaque, but not in control mammary artery (Fig. 6B). This was confirmed by immunofluorescence double staining, which showed the co-localization of PDI and 4-HNE in intact cells (Fig. 6C) and in

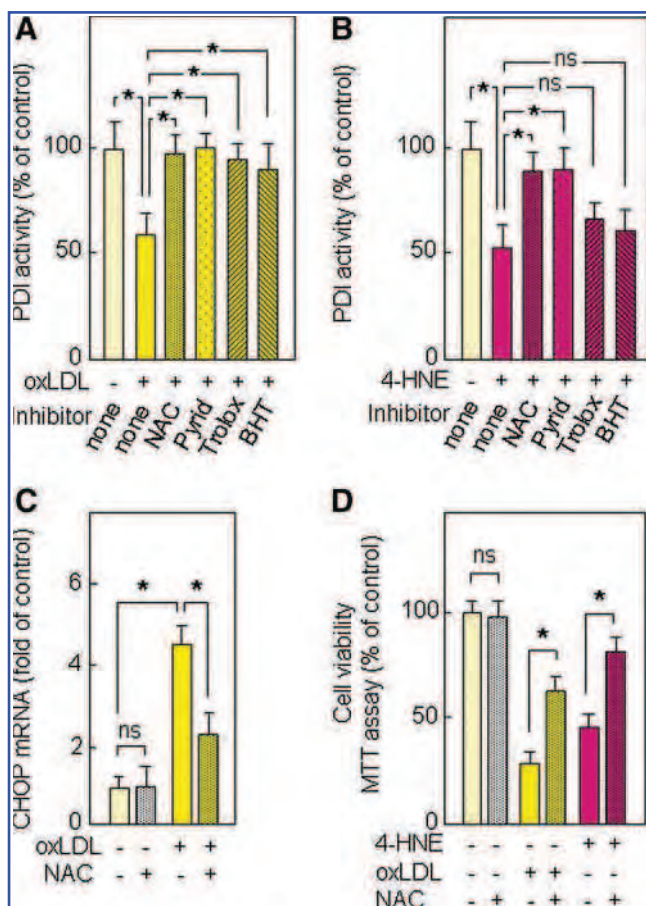
cellular debris (some of them also stained by anti-CD68 specific for macrophages) in the central core area of carotid advanced plaques (Fig. 6D).

These data indicate that PDI modification occurs *in vivo* in atherosclerotic lesions, and suggest a possible loss of function (subsequent to 4-HNE-PDI adducts formation) in the endothelial/subendothelial areas and in the macrophagic core of atherosclerotic plaques.

#### Discussion

This study indicates that toxic concentrations of oxLDLs inhibit the activity of the ER-resident PDI. This was potentiated by bacitracin, and was associated to ER stress and apoptosis. PDI inhibition may result from its carbonylation by reactive lipid peroxidation derivatives, as supported i) by the presence of 4-HNE-PDI adducts in cells treated by oxLDLs; and ii) by the formation of similar adducts and PDI inhibition in cells incubated with 4-HNE. NAC and pyridoxamine prevented PDI inactivation by oxLDLs and 4-HNE, and reduced ER stress and toxicity. Interestingly, PDI modification by 4-HNE occurs *in vivo* in advanced atherosclerotic lesions.





**FIG. 5. N-acetylcysteine (NAC) prevents in part PDI inhibition, ER stress, and toxicity induced by oxLDLs or 4-HNE.** HMEC-1 were preincubated with NAC (5 mmol/L), pyridoxamine (100 μmol/L), and trolox (10 μmol/L) or BHT (25 μmol/L) for 2 h before addition of oxLDLs (200 mg apoB/L) (A), or 4-HNE (10 μmol/L) (B). After 18 h incubation, PDI activity was measured as described in the legend to Figure 1. CHOP expression (C) and cell viability (MTT assay) (D) were evaluated in HMEC-1 incubated with oxLDLs with or without NAC (5 mmol/L), as in Figure 3 (and as described in Methods section). The data are expressed as % or ratio of the control. Mean ± SD of 4 separate experiments, \**p* < 0.05. (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars).)

*Molecular mechanism of PDI inhibition by oxLDLs and 4-HNE*

At the molecular level, PDI acts as a dithiol-disulfide oxidoreductase and a chaperone able to reduce, oxidize, and isomerize disulfide bonds, thereby contributing to the correct folding of proteins (9, 22, 44). The isomerase function can repair misformed disulfide bonds *via* a “scanning and escape” mechanism, in which the N-terminal thioredoxin active site forms a disulfide bond with a (to-be-corrected) protein (“scanning”), which is released by the C-terminal thioredoxin active site (“escape”), allowing in turn a regeneration of PDI (2, 42). This requires the integrity of the catalytic Cys-x-x-Cys motives and an important neighboring Arg (27, 42). Moreover, the cellular activity of PDI depends on GSH level, which is required to reduce the oxidized form of PDI, thus the redox state of the ER subcellular compartment, in which PDI is mainly

located (2). Cys of the PDI active site and the neighboring Arg are targets for aldehydes, and Carbone et al. (2) report that the modification of a Cys of the PDI active site by 4-HNE or by the thiol reactive N-ethylmaleimide, is associated with a loss of the PDI isomerase activity. The integrity of the two SH groups of the N-terminal thioredoxin-like active site is required for the “scanning and escape” mechanism of PDI, and any mutation on Cys compromises the isomerase function (2, 42).

Since PDI activity depends on the ER redox state that allows disulfide formation (oxidation), while maintaining sufficient reducing power to break incorrect disulfide bonds, a ratio GSH/GSSG 5/1 is optimal for a rapid oxidative folding *in vitro* (45). As discussed by Raturi and Mutus (20), the ratio GSH/GSSG is around 2/1 in the ER, suggesting a half-reduced and half-oxidized state for PDI, potentially favorable to reduction/oxidation cycles required for the rearrangement of disulfide bonds of misformed proteins (42, 44). As oxLDLs induce a cellular oxidative stress (28), known to decrease the GSH/GSSG ratio, oxLDLs may alter the redox state of PDI and slow down its activity (45). However, in our conditions, PDI inactivation by oxLDLs began between 6 h and 12 h, (*i.e.*, before the drop of GSH that starts during the late phase of cell apoptosis after 18–24 h incubation with oxLDLs) (28), thus suggesting that GSH depletion is not the *primum movens* of PDI inactivation. Likewise PDI inactivation, as assessed by the *in vitro* assay, is independent of the cellular GSH (since DTT, the reductive compound, is added in the assay mixture), thereby demonstrating that the inhibitory effect of reactive carbonyls results mainly from a direct action on PDI protein.

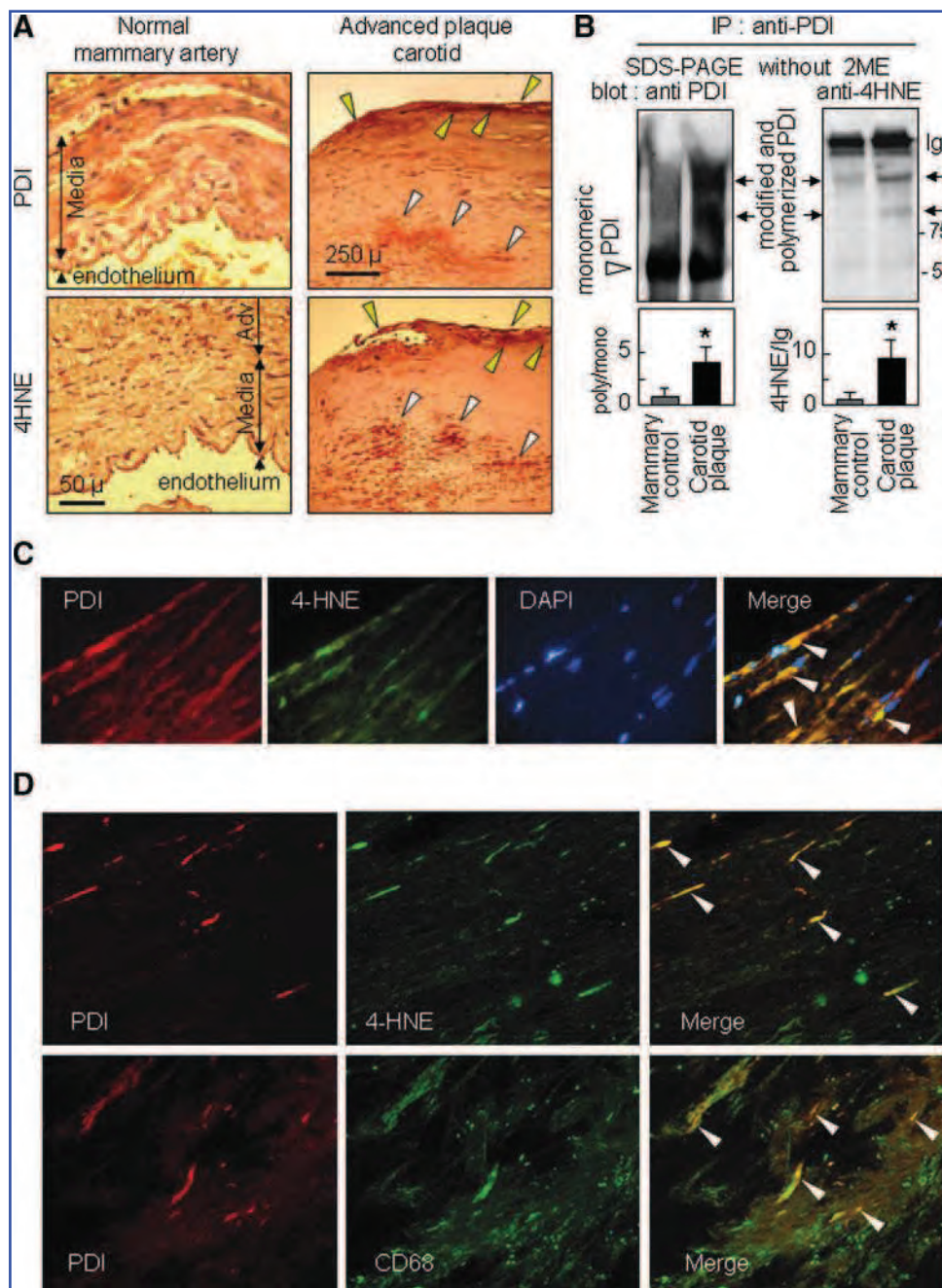
Finally, another molecular mechanism of PDI inactivation has been described in etoposide-induced apoptosis, in which the cytosolic PDI is cleaved by caspase-3, which results in the generation of 33 and 40 kDa fragments (15). In our system, caspases cannot explain the inhibition of PDI by oxLDLs, because i) we did not detect the formation of 33 or 40 kDa PDI fragments, even in apoptotic cells (data not shown); ii) while caspases are activated by oxLDLs (Fig. 3E and Ref. 41), their inhibition by the caspase inhibitors DVED-fmk and z-VAD-fmk did not prevent PDI inhibition induced by oxLDLs (data not shown).

PDI inhibition by oxLDLs may result from its modification by 4-HNE generated through intracellular oxidative stress and subsequent lipid peroxidation, as suggested by the protective effect of antioxidants trolox and BHT. A transfer of free 4-HNE (minor part of the whole 4-HNE content) (48) from oxLDLs to PDI may also occur, which is blocked by NAC and pyridoxamine. As previously reported (1), antioxidants such as trolox and BHT (which are devoid of carbonyl scavenger activity) were unable to protect PDI against the inhibitory effect of free 4-HNE, whereas the carbonyl scavengers, pyridoxamine and NAC, prevented the modification of PDI, and protected against ER stress and apoptosis induced by 4-HNE and oxLDLs. Altogether, these studies suggest that the main mechanism of PDI inactivation by oxLDLs or 4-HNE and other electrophilic aldehydes present in oxLDLs, results from the formation of carbonyl-PDI adducts, *via* oxidative and subsequent carbonyl stress, and *via* transfer of 4-HNE from oxLDLs to PDI.

*Physiological role of PDI and consequences of its inhibition*

PDI is one of the most abundant ER proteins, which catalyzes the folding of newly synthesized proteins and the





**FIG. 6. Co-localization of PDI and 4-HNE-adducts in human advanced atherosclerotic lesions and presence of 4-HNE-PDI adducts.** (A) Immunohistochemical staining of PDI and 4-HNE-Michael adducts (HNE) in human mammary artery (control) and in an advanced atherosclerotic plaque from carotid endarterectomy (*right panels*). *Arrowheads* show the labeled areas (*yellow arrowheads* in the endothelial and subendothelial areas, and *white arrowheads* in the core area). Representative micrographies (see additional pictures in Supplementary Fig. S9). (B) Western blot of PDI immunoprecipitate from protein extracts of mammary artery and carotid plaque blotted with anti-PDI and anti-4-HNE-Michael adduct antibodies (SDS-PAGE electrophoresis was done without 2-mercaptoethanol). *White arrowheads* show the monomeric PDI (55 kDa), and *black arrows* show high molecular weight cross-linked and modified PDI. Densitometric evaluation of the bands was performed using Image J software. Mean  $\pm$ SD of 3 separate experiments, \* $p < 0.05$ . (C) Immunofluorescence microscopy of PDI, 4-HNE adducts, DAPI, and composite image (merge) of thin section of advanced atherosclerotic plaque from carotid endarterectomy, labeled with the anti-PDI polyclonal (Sigma) and anti-4-HNE-adduct monoclonal (Oxis) primary antibodies and with AlexaFluor<sup>®</sup>-568-conjugated (*red*) and AlexaFluor<sup>®</sup>-488-conjugated (*green*) secondary antibodies (1/1000), respectively, and stained with DAPI. The composite image (merge) shows PDI and 4-HNE-adducts (*yellow areas*, as indicated by *arrowheads*) co-localized in intact cells of the endothelial and intimal part of the plaque. (D) Immunofluorescence confocal microscopy of PDI, 4-HNE adducts, and CD68 macrophagic marker in the core area of an advanced atherosclerotic plaque from carotid endarterectomy. Thin sections were incubated with the anti-PDI polyclonal (Sigma) revealed with AlexaFluor<sup>®</sup>-568-conjugated (*red*) secondary antibodies (1/1000) and with anti-4-HNE-adduct monoclonal (Oxis) or anti-CD68 (Abcam) primary antibodies revealed with AlexaFluor<sup>®</sup>-488-conjugated (*green*) secondary antibodies (1/1000). On the composite image (merge), *white arrowheads* show co-localized PDI and 4-HNE adducts (*yellow areas of the upper panel*) and co-localized PDI and CD68 (*yellow areas of the lower panel*) in cellular debris of the central necrotic core. Representative pictures of the analysis of 3 separate plaques. (To see this illustration in color, the reader is referred to the web version of this article at [www.liebertpub.com/ars](http://www.liebertpub.com/ars).)

rearrangement of incorrect disulfide bonds (9, 45). PDI activity tends to prevent the accumulation of misfolded proteins in the ER, and may thereby limit ER stress induction (22) and subsequent apoptosis, thus acting as a survival mechanism (12, 43). In our system, PDI inhibition (by bacitracin) sensitizes cells to ER stress and apoptosis induced by oxLDLs. This is in agreement with the concomitant inhibition of PDI and neuronal apoptosis induced by nitrosative stress (39), and cell death induced by chemotherapy drugs (12). Consistently, high PDI expression tends to limit or delay ER stress and apoptosis induced by oxLDLs and 4-HNE.

The data obtained in HMEC-1 expressing inactive 'myc-PDI mut' are apparently more puzzling, since under basal conditions (*i.e.*, in the absence of oxLDLs), constitutive PDI activity is not inhibited by the expression of the inactive mutant PDI and CHOP expression and toxicity are not increased in the absence of oxLDLs. This suggests that the inactive mutant PDI has no inhibitory effect on the constitutive wt PDI. In HMEC-1 expressing inactive 'myc-PDI mut' treated by oxLDLs, both CHOP induction (ER stress) and the cytotoxicity are enhanced (in comparison to parental HMEC-1 not expressing the mutant PDI). The extrapotential of oxLDL toxicity in myc-PDI mut HMEC-1 requires the additional effect of lipid peroxidation compounds that may aggravate the misfolding of mutant PDI (possibly misfolded by mutations), which is relatively abundant (mut-PDI level is twice that of constitutive wt PDI) and could reinforce ER stress/UPR. Then the prolonged ER stress/UPR elicits the activation of caspase-dependent apoptosis, as assessed by caspase 3 activation and increase of TUNEL positive cells. It may be noted that this model is also consistent with the effect of thapsigargin that disturbs ER calcium homeostasis, induces ER stress and toxicity (but induces no major formation of 4-HNE-protein adducts), thus explaining that the toxic effect of thapsigargin was similar in control cells and in myc-PDI mut HMEC-1 (Supplementary Fig. 5).

The protective effect of PDI may result from its enzymatic (oxidase and isomerase) activities and/or from its chaperone activity (3, 32). However, this generally accepted protective role of PDI is challenged by a recent report showing that PDI may play a pro-apoptotic role in Huntingtin neuronal toxicity, which highlights a new mechanism linking protein misfolding and apoptotic cell death (7). Thus, PDI could participate in both phases of ER stress, the first one being protective when protein repair is effective, the second one being pro-apoptotic when the reparative phase is overwhelmed and misfolded proteins accumulate (24, 47).

#### *PDI modification by 4-HNE, ER stress, and atherosclerosis*

PDI modification by 4-HNE has been reported in the liver of aged mice (19), and in rat models for alcoholic liver disease (2, 29), and cysteine modification of PDI by S-nitrosylation occurs in neurodegenerative diseases (39).

In atherosclerosis, carbonyl stress is thought to be involved in foam cell formation, and cellular dysfunction in the vascular wall (18), but the precise molecular targets of reactive carbonyls are only partly identified (6), and to our knowledge, 4-HNE-PDI-adduct formation has never been reported. Our data show that PDI modification and inactivation by

4-HNE or oxLDLs contribute to ER stress and apoptosis, and that PDI modification by 4-HNE occurs in the endothelium and in the macrophage-rich core of advanced atherosclerotic lesions, thereby suggesting that this event may play a role in atherosclerosis. This hypothesis is consistent with the chronic activation of ER stress/UPR pathway at all stages of atherosclerosis (49). The prolonged ER stress may be proatherogenic through several mechanisms, including (i) activation of inflammatory pathways in macrophages, (ii) endothelial cell apoptosis, which may contribute to lipoprotein influx into the plaque, thrombocyte aggregation, and plaque extension, and (iii) apoptosis of macrophages, which in turn leads to plaque necrosis if the apoptotic cells are not rapidly cleared (31). In addition, ER stress may link immune response (low chronic inflammation) with the metabolic disorders occurring in obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes that are known to participate in the pathogenesis of atherosclerosis and its complications (8). Moreover, increased ER stress may induce apoptosis of smooth muscle cells and macrophages, thereby contributing to plaque vulnerability and athero-thrombotic events (14).

#### **Materials and Methods**

An expanded Methods section is available in Supplementary Data.

#### *LDL isolation and oxidation*

LDL from human pooled sera were prepared as reported (25). Mildly oxidized LDLs (oxLDLs) contained 71–104 nmol lipid hydroperoxide/mg apoB, 6–8 nmol TBARS/mg apoB, and 8–10 nmol 4-HNE/mg apoB under standard conditions.

#### *Cell culture and transfection*

Human Microvascular Endothelial Cell-1 (HMEC-1) (Dr. Candal, CDC, Atlanta), were grown in MCDB-131 culture medium supplemented with 10% fetal calf serum and 40  $\mu$ mol/L of glutamine. HMEC-1 were transfected with 10  $\mu$ g of Myc-tagged PDI wt cDNA (Myc-PDI wt) or Myc-PDI N-terminal and C-terminal mutant cDNA (Myc-PDI mutant) subcloned into pCR3.1 vector (a generous gift from Drs. Nakamura and Lipton, Boston, MA) using 20  $\mu$ L of lipofectamine (Invitrogen) as reported (32). Transfected cells were cultured in the presence of G418 (1.5 mg/L) (PAA Laboratories). Cells were starved in serum-free medium for 12 h before the experiments.

#### *Determination of PDI activity*

Control, wild type, or mutant HMEC-1 were incubated with oxLDLs or 4-HNE, homogenized in 250  $\mu$ L of PDI buffer (0.1 mol/L potassium phosphate buffer pH 7.0 containing 2 mmol/L EDTA) and 20  $\mu$ mol/L digitonin. The assay contained 150 nmol/L Di-E-GSSG, a fluorogenic PDI substrate (20), (a generous gift from Dr B. Mutus, Windsor, Canada), DTT (5  $\mu$ mol/L), cell extract (50–100  $\mu$ g cell protein), and PDI buffer in 500  $\mu$ L final volume. The reduction of di-E-GSSG was measured fluorometrically at time 0 and after 30 min of incubation at 37°C (exc.525 nm em. 545 nm). The data are expressed as ratio of fluorescence/fluorescence of the unstimulated control.



### Evaluation of cell viability, apoptosis, and necrosis

Cytotoxicity was estimated using the MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay. Apoptosis and necrosis were evaluated using two vital fluorescent dyes, the permeant DNA intercalating green-colored DNA probe SYTO-13 (0.6  $\mu\text{mol/L}$ ), and the nonpermeant intercalating red DNA probe propidium iodide (15  $\mu\text{mol/L}$ ), (fluorescence microscope Fluovert FU, Leitz), (25). DEVDase activity and TUNEL experiments were done as indicated in the Expanded Method section.

### Immunofluorescence

Cells grown on glass cover slides, were washed with PBS and fixed for 10 min in 30% paraformaldehyde containing 4% triton X100, then incubated with the anti-PDI antibody, revealed with Alexa Fluor-conjugated secondary antibody, and visualized using a Zeiss LSM 510 fluorescence confocal microscope.

### Immunohistochemistry

Human advanced carotid plaques (5 patients 70–75 years old) were obtained after endarterectomy (Cardiovascular Surgery Department, CHU Toulouse), fixed in formalin and paraffin embedded. Serial 3  $\mu\text{m}$  thin sections were incubated with anti-4-HNE-adduct, and anti-PDI antibodies, and revealed by using avidin-biotin horseradish peroxidase visualization system (Vectastain, ABC kit Elite, Vector Laboratories).

### Western blot analysis

HMEC-1 and human tissue samples were homogenized in extraction buffer, and used for SDS-PAGE/immunoblotting either as total protein extracts or after immunoprecipitation (22). When indicated, beta-mercaptoethanol was omitted in the SDS-PAGE. Atherosclerotic plaque extract analysis was performed as described in Supplementary Data.

### Quantitative and semi-quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was used for Real-Time Quantitative PCR analysis to evaluate the expression of CHOP and spliced XBP1 (see detailed method in Supplementary Data).

### Statistical analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SD. Differences between means values were evaluated by unpaired *t* test (two groups) or by one-way ANOVA (more than two groups) followed by multiple comparisons versus a control by the Holm-Sidak Test. Estimates of statistical significance were performed using the SigmaStat 3.5 (Systat software). Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

### Acknowledgments

We thank Drs. T Nakamura and SA Lipton (Boston, MA) for giving the Myc-tagged wt and mutant cDNA PDI vectors, Dr. B. Mutus (Windsor, Canada) for providing the PDI substrate Di-E-GSSG, and Pr. S. Sasson (Jerusalem, Israel) for

fruitful discussion. The authors wish to acknowledge Dr. R. d'Angelo (Cellular Imaging TRI Platform) for confocal microscopy, MH Grazide and C. Santiago for their excellent technical assistance.

Financial supports by INSERM, Université de Toulouse, Fondation pour la Recherche Médicale (DCV2007040927), and ANR Blanc SVSE1 "CARINA".

### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

- Bouguerne B, Belkheiri N, Bedos-Belval F, Vindis C, Uchida K, Duran H, Grazide MH, Baltas M, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Antiatherogenic effect of bisvanillyl-hydralazone, a new hydralazine derivative with antioxidant, carbonyl scavenger, and antiapoptotic properties. *Antioxid Redox Signal* 14: 2093–2106, 2011.
- Carbone DL, Doorn JA, Kiebler Z, and Petersen DR. Cysteine modification by lipid peroxidation products inhibits protein disulfide isomerase. *Chem Res Toxicol* 18:1324–1331, 2005.
- Creighton TE, Hillson DA, and Freedman RB. Catalysis by protein-disulphide isomerase of the unfolding and refolding of proteins with disulphide bonds. *J Mol Biol* 142: 43–62, 1980.
- Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Vacaresse N, Jürgens G, Darblade B, Arnal JF, Parthasarathy S, and Nègre-Salvayre A. Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor beta-receptor pathway. *Circulation* 104:1814–1821, 2001.
- Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, and Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13:341–390, 1992.
- Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, and Uchida K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 44: 1098–1124, 2010.
- Hoffstrom BG, Kaplan A, Letso R, Schmid RS, Turmel GJ, Lo DC, and Stockwell BR. Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nat Chem Biol* 12: 900–906, 2010.
- Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med* 16: 396–399, 2010.
- Kozlov G, Määttänen P, Thomas DY, and Gehring K. A structural overview of the PDI family of proteins. *FEBS J* 277: 3924–3936, 2010.
- Libby P, Ridker PM, and Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135–1143, 2002.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 407: 233–241, 2000.
- Lovat PE, Corazzari M, Armstrong JL, Martin S, Pagliarini V, Hill D, Brown AM, Piacentini M, Birch-Machin MA, and Redfern CP. Increasing melanoma cell death using inhibitors of protein disulfide isomerase to abrogate survival responses to endoplasmic reticulum stress. *Cancer Res* 68: 5363–5369, 2008.
- Mandel R, Ryser HJ, Ghani F, Wu M, and Peak D. Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4112–4116, 1993.
- Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, and

- Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 116:1226–1233, 2007.
15. Na KS, Park BC, Jang M, Cho S, Leedo H, Kang S, Lee CK, Bae KH, and Park SG. Protein disulfide isomerase is cleaved by caspase-3 and -7 during apoptosis. *Mol Cell* 24: 261–267, 2007.
  16. Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann NY Acad Sci* 1010: 698–709, 2003.
  17. Negre-Salvayre A, Vieira O, Escargueil-Blanc I, and Salvayre R. Oxidized LDL and 4-hydroxynonenal modulate tyrosine kinase receptor activity. *Mol Aspects Med* 24: 251–261, 2003.
  18. Negre-Salvayre A, Coatrieux C, Ingueneau C, and Salvayre R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. *Br J Pharmacol* 153: 6–20, 2008.
  19. Rabek JP, Boylston WH 3rd, and Papaconstantinou J. Carbonylation of ER chaperone proteins in aged mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 566–572, 2003.
  20. Raturi A and Mutus B. Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Radic Biol Med* 43: 62–70, 2007.
  21. Requena JR, Fu MX, Ahmed MU, Jenkins AJ, Lyons TJ, and Thorpe SR. Lipoxidation products as biomarkers of oxidative damage to proteins during lipid peroxidation reactions. *Nephrol Dial Transplant* 11 Suppl 5: 48–53, 1996.
  22. Riemer J, Bulleid N, and Herrmann JM. Disulfide formation in the ER and mitochondria: Two solutions to a common process. *Science* 324: 1284–1287, 2009.
  23. Riahi Y, Cohen G, Shamni O, and Sasson S. Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299: E879–886, 2010.
  24. Ron D and Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519–529, 2007.
  25. Sanson M, Ingueneau C, Vindis C, Thiers JC, Glock Y, Rousseau H, Sawa Y, Bando Y, Mallat Z, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDLs in vascular cells. *Cell Death Differ* 15: 1255–1265, 2008.
  26. Sanson M, Augé N, Vindis C, Muller C, Bando Y, Thiers JC, Marachet MA, Zarkovic K, Sawa Y, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Oxidized LDLs trigger endoplasmic reticulum stress in vascular cells: Prevention by oxygen-regulated protein 150 expression. *Circ Res* 104: 328–336, 2009.
  27. Santos CX, Tanaka LY, Wosniak J, and Laurindo FR. Mechanisms and implications of reactive oxygen species generation during the unfolded protein response: Roles of endoplasmic reticulum oxidoreductases, mitochondrial electron transport, and NADPH oxidase. *Antioxid Redox Signal* 11: 2409–2427, 2009.
  28. Schmitt A, Salvayre R, Delchambre J, and Nègre-Salvayre A. Prevention by alpha-tocopherol and rutin of glutathione and ATP depletion induced by oxidized LDL in cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol* 116: 1985–1990, 1995.
  29. Smathers RL, Galligan JJ, Stewart BJ, and Petersen DR. Overview of lipid peroxidation products and hepatic protein modification in alcoholic liver disease. *Chem Biol Interact* 192: 107–112, 2011.
  30. Song B, Scheuner D, Ron D, Pennathur S, and Kaufman RJ. CHOP deletion reduces oxidative stress, improves beta cell function, and promotes cell survival in multiple mouse models of diabetes. *J Clin Invest* 118: 3378–3389, 2008.
  31. Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res* 107: 839–850, 2010.
  32. Tanaka S, Uehara T, and Nomura Y. Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J Biol Chem* 275: 10388–10393, 2000.
  33. Thorp E, Li G, Seimon TA, Kuriakose G, Ron D, and Tabas I. Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of ApoE<sup>-/-</sup> and LDLr<sup>-/-</sup> mice lacking CHOP. *Cell Metab* 9: 474–481, 2009.
  34. Toldo S, Severino A, Abbate A, and Baldi A. The role of PDI as a survival factor in cardiomyocyte ischemia. *Methods Enzymol* 489: 47–65, 2011.
  35. Townsend DM, Manevich Y, He L, Xiong Y, Bowers RR Jr, Hutchens S, and Tew KD. Nitrosative stress-induced S-glutathionylation of protein disulfide isomerase leads to activation of the unfolded protein response. *Cancer Res* 69: 7626–7634, 2009.
  36. Tsimikas S and Miller YI. Oxidative modification of lipoproteins: Mechanisms, role in inflammation and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Curr Pharm Des* 17: 27–37, 2011.
  37. Uchida K. Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 28: 1685–1696, 2000.
  38. Uchida K. Lipid peroxidation and redox-sensitive signaling pathways. *Curr Atheroscler Rep* 9: 216–221, 2007.
  39. Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Maslah E, Nomura Y, Lipton SA. S-nitrosylated protein-disulphide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 441: 513–517, 2006.
  40. Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jürgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J* 14: 532–542, 2000.
  41. Vindis C, Elbaz M, Escargueil-Blanc I, Augé N, Henriquez A, Thiers JC, Nègre-Salvayre A, and Salvayre R. Two distinct calcium-dependent mitochondrial pathways are involved in oxidized LDL-induced apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 639–645, 2005.
  42. Walker KW and Gilbert HF. Scanning and escape during protein-disulfide isomerase-assisted protein folding. *J Biol Chem* 272: 8845–8848, 1997.
  43. Wang M, Ye R, Barron E, Baumeister P, Mao C, Luo S, Fu Y, Luo B, Dubeau L, Hinton DR, and Lee AS. Essential role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in protection from neuronal apoptosis. *Cell Death Differ* 17: 488–7498, 2010.
  44. Weissman JS and Kim PS. Efficient catalysis of disulphide bond rearrangements by protein disulfide isomerase. *Nature* 365: 185–188, 1993.
  45. Wilkinson B and Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 1699: 35–44, 2004.
  46. Witztum JL and Steinberg D. Role of oxidized LDL in atherogenesis. *J Clin Invest* 88: 1785–1792, 1991.
  47. Wu J and Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* 13: 374–384, 2006.
  48. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, and Steinberg D. Evidence





## Supplementary Data

### Methods

#### Chemicals and reagents

Anti-c-Myc antibody was from Santa-Cruz (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). N-acetyl L-cysteine (NAC), 4-hydroxy hexenal (4-HHE), methylglyoxal (MGO), and glyoxal (GO), anti- $\beta$ -actin, and anti-PDI polyclonal antibodies were from Sigma-Aldrich. Anti-PDI monoclonal antibody was from Thermo Scientific (Pierce Biotech, Rockford, Ireland), anti-CD68 and anti-KDEL monoclonal antibodies were from Abcam (VWR, Fontenay sous Bois, France). Anti-4-HNE-Michael adduct polyclonal antibody was from Calbiochem (VWR, France), and anti-4-HNE monoclonal antibody (for immunohistochemistry experiments) was from Oxis Int (Foster City, CA). The EnVision kit for immunofluorescence studies was from Dako (Trappes, France), AlexaFluor®-546 (red) and AlexaFluor®-488 (green)-conjugated secondary antibodies were from Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) and acrylamide-4X/bisacrylamide-2X solution were from Euromedex (Souffelweyersheim, FR). 4-HNE was from Calbiochem (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ).

#### Cell culture, LDL preparation, and lipid oxidation content determination

Human Microvascular Endothelial Cell-1 (HMEC-1) (Dr. Candal, CDC, Atlanta), were grown in MCDB-131 culture medium supplemented with 10% fetal calf serum and 40  $\mu$ mol/L of glutamine. Human mesenteric smooth muscle cells (hmSMC) were prepared from human mesenteric arteries and grown in DMEM containing Glutamax® and supplemented with 10% FCS, penicillin (100 units/mL), and streptomycin (100  $\mu$ g/mL), as previously used (9). Macrophage-like U-937 human leukemic cells (from American Type Culture Collection, Manassas, VA) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, penicillin (100 units/mL), and streptomycin (100  $\mu$ g/mL). LDLs were isolated from human pooled sera, and were oxidized by UV-C irradiation as previously reported (2, 7, 8). When indicated, LDL were oxidized by copper (5  $\mu$ mol/L CuSO<sub>4</sub>, 90 min at 37°C) or by overnight incubation with HMEC-1 (51). Under the standard conditions used in this study, mildly oxidized LDL (oxLDLs) contained 71–104 nmol lipid hydroperoxide/mg apoB, 5–8 nmol TBARS/mg apoB, and 8–10 nmol 4-HNE/mg apoB (determined using the OxiSelect™ HNE-His adduct ELISA kit (Cell Biolabs Inc., EUROMEDEX, Souffelweyersheim, France).

[3H]4-HNE was prepared from [3H]4-HNE diethylacetal as reported in (8), and allowed to react with oxLDL (1 mg apoB/mL) for 1 h at 37°C. HMEC-1 were pre-incubated with NAC (5 mmol/L) and pyridoxamine (100  $\mu$ mol/L) for 2 h, then incubated with [3H]4-HNE-oxLDL (100,000 dpm/200 mg apoB/L) for 14 h, washed, harvested, and used for PDI immunoprecipitation and counting of the [3H]4-HNE-associated radioactivity in PDI immunoprecipitates.

#### Counting of live and dead cells

Cells were counted (200/well) after double staining by two fluorescent DNA intercalating agents SYTO-13/PI (0.6  $\mu$ mol/L SYTO-13, permeant green-colored intercalating probe, and 15  $\mu$ mol/L propidium iodide (PI), a non permeant red intercalating probe), using an inverted fluorescence microscope (Fluovert FU, Leitz) (13). Living, apoptotic, and necrotic cells were characterized on the basis of their morphological features of the nucleus. Normal living cells exhibit green loose chromatin. Apoptotic nuclei display green/yellow condensed (pyknotic) chromatin and/or fragmented nuclei (the green color indicates that the plasma membrane or the membrane of apoptotic bodies is not permeabilized). In contrast, post-apoptotic necrotic cells exhibited the same morphological features (condensed fragmented nuclei), but were redcolored due to PI penetration into the cell subsequent to permeabilization of plasma membrane fragments surrounding apoptotic bodies. Cells undergoing primary necrosis exhibit red nuclei with loose chromatin (13).

#### TUNEL-positive cell evaluation

DNA fragmentation was visualized *in situ* by the TUNEL (terminal transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) procedure, using the ApopTag® Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon/Millipore France). Cells were grown on glass slides, stimulated by oxLDLs as indicated, then washed three times in PBS, and were fixed in 3% buffered paraformaldehyde. Endogenous peroxidases were inactivated by 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and the TUNEL assay was performed according to manufacturer's protocol.

#### DEVDase activity

DEVDase activity (caspase 3) was determined using the fluorogenic substrate Ac-DEVDAMC (N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-methylcoumarin) (40  $\mu$ M), on cell lysates from HMEC-1 stimulated with toxic oxLDL concentrations (200  $\mu$ g/mL) in the presence of the tested agents, as reported (2). After 30 min incubation at 37°C, the released fluorescent product AMC (aminomethylcoumarin) was determined by fluorometry (ex/em 351/ 430 nm).

#### Quantitative and semi-quantitative RT-PCR analysis

Cells were trypsinized and washed in PBS, then diluted in SV RNA lysis buffer (Promega) and placed at –80°C until use. Total RNA extract was purified (Promega) and equal amounts of RNA were used for Real-Time Quantitative PCR Analysis experiments. Expression levels of CHOP and spliced XBP1 were determined by using the specific primers as follows: forward huPDI (5'-CACTCAAGTTCTTTCCTGCC-3') and reverse huPDI (5'-ATCGTCTTCTCCATGTCTG-3'), forward CHOP (5'-CAGATGAAAATGGGGTACCT-3') and reverse CHOP (5'-AGAAGCAGGGTCAAGAGTGGT-3'), forward spliced XBP1 (5'-GCAGGTGCAGGCCAGT-3'), and reverse spliced XBP1 (5'-GAATGCCAACAGGATATCAGACT-3'), forward GAPDH (5'-CCTCCCGCTTCGCTCTCT-3'), and reverse GAPDH (5'-CCTCCCGCTTCGCTCTCT-3'). The Fast SYBR Green MasterMix (Applied Biosystems) and the

StepOne Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) were used to detect the real-time quantitative PCR products of reverse-transcribed cDNA samples, according to the manufacturer's instructions. The incubation conditions were as follows: 95°C for 20 sec, followed by 40 cycles of 3 sec at 95°C, annealing/extension for 30 sec, at 60°C. For each sample, PCR were done in duplicate for both the target genes and GAPDH control. The data were analyzed using StepOne Software v2.0.

#### Western blot analysis

Western blots of extracts from human carotid atherosclerotic plaques were performed under the previously described conditions (8). Briefly, human carotid atherosclerotic plaques obtained after endarterectomy were homogenized (Pre-celllys® system, Bertin Technology, MI) in solubilizing buffer (50 mmol/L Tris pH 7.4, containing 250 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L sodium vanadate, 10 mmol/L sodium pyrophosphate, 160 mmol/L sodium fluoride, 2.5 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μmol/L leupeptin, 2 μmol/L pepstatin A, 10 mg/L aprotinin and 1% triton X-100) at 4°C. Protein concentration was determined using the Bradford reagent (Biorad). After centrifugation (15,000 g for 10 min), the supernatant was used for SDS-PAGE/immunoblotting either as total protein extracts or after immunoprecipitation experiments, under the previously described conditions (8, 14).

#### Immunohistochemistry and immunofluorescence

Cells grown on glass cover slides, were washed with PBS and fixed for 10 min. in 30% paraformaldehyde containing 4% triton X100, then incubated with the respective primary and Alexa Fluor-conjugated secondary antibody (Sigma, France), revealed by wide-field epifluorescence Diaplan Leitz, or a Zeiss LSM 510 fluorescence confocal microscope.

Human advanced carotid plaques (6 male patients, 70–75 years old) were obtained from endarterectomy for therapeutic purpose (Cardiovascular Surgery Department, CHU Toulouse, Prof. Y. Glock), and used according to national rules of surgical residues for research purpose and with written informed consent from patients. Part of the endarterectomy sample was frozen in liquid nitrogen for biochemistry studies and other specimens were fixed in formalin (4% in PBS) and paraffin embedded for histology. Serial thin sections were incubated with the antibodies (anti-4-HNE-adducts, anti-PDI, anti-CD68) and revealed by a peroxidase-conjugated secondary antibody (immunoperoxidase kit, StrepABComplex/HRP Duet, Dako). Alternatively, the co-localizations of PDI, CD68, and 4-HNE-adducts were studied by immunofluorescence and confocal microscopy.

#### Statistical analyses

Estimates of statistical significance were performed by *t*-test or analysis of variance, followed by multiple comparison procedure (using the SigmaStat 3.5, Systat software). Tests for normality and equal variance were performed by the Kolmogorov-Smirnov test and by the Levene median test, respectively. When the populations were normally distributed and exhibited equal variances, differences between means values were evaluated by unpaired *t* test, to compare two groups, or by one-way ANOVA (experiments were

designed to study the effect of one factor) to compare several experimental groups with different treatments. When a difference in the groups was detected by one-way ANOVA, multiple comparisons (generally versus a control group) were performed by the Holm-Sidak test. Values of  $p < 0.05$  were considered significant.

#### Supplementary Results

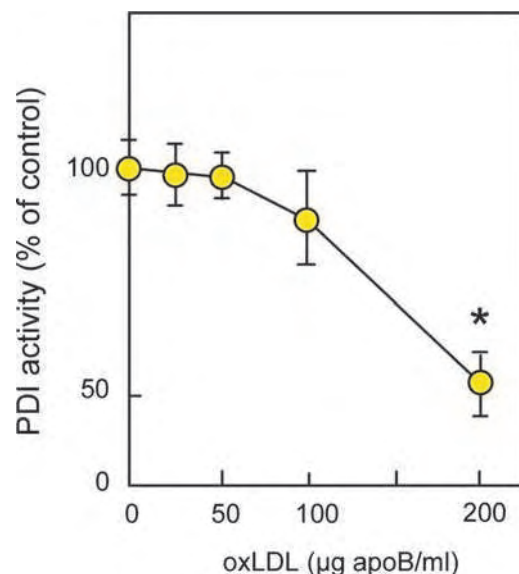
##### *Dose-dependent inhibition of PDI in HMEC-1 pre-incubated with increasing concentrations of oxLDLs*

When cells were pre-incubated for 18 h with increasing concentration of oxLDLs, PDI activity was inhibited in a dose-dependent manner (Supplementary Fig. S1). Note that PDI inhibition can be mimicked by incubating HMEC-1 with increasing concentration of 4-HNE (Fig. 5B of the main document).

##### *Inhibition of PDI activity in HMEC-1 treated with various oxLDLs and aldehydes*

In order to evaluate whether the method of LDL oxidation and the structure of aldehydes resulting from lipid oxidation or glycooxidation have an influence on PDI inhibition, we compared the effect of three methods of LDL oxidation, and several aldehydes.

We compared the effect of UV-oxLDL (generally used in our experiments) (2, 7, 8, 13), CuoxLDLs, and cell-oxLDLs (upper part of Supplementary Table S1), and the effect of several aldehydes, two medium chain hydroxy-aldehydes (4-HNE and 4-HHE), and two short chain dialdehydes (MGO and GO). PDI inhibition was effective with all the tested oxLDLs, and was grossly parallel to the TBARS content of oxLDLs (upper Supplementary Table S1). All the aldehydes



**SUPPLEMENTARY FIG. S1. PDI inhibition by increasing concentration of oxLDLs in HMEC-1.** HMEC-1 were incubated for 18 h with increasing concentration of oxLDLs, cells were harvested, and PDI activity was measured in cell extracts, using Di-E-GSSG, as described in the Methods section. The data are expressed as % of the untreated control. Mean ± SD of 3 separate experiments. \* $p < 0.05$ .

SUPPLEMENTARY TABLE S1. INHIBITORY EFFECT OF ALDEHYDES AND OXLDLS ON PDI ACTIVITY IN HMEC-1

OxLDLs	none	UV-OxLDL	Cu-OxLDL		Cell-OxLDL		
Concentration (mg apoB/L)	0	200	200		200		
PDI activity (% control)	100	68 ± 5*	55 ± 4*		60 ± 4*		
Aldehydes	none	4-HNE	4-HHE	MGO	MGO	GO	GO
Concentration (μM)	0	10	10	10	100	10	100
PDI activity (% control)	100	65 ± 5*	55 ± 4*	88 ± 3*	48 ± 4*	93 ± 3*	58 ± 5*

In the upper part of the Table, HMEC-1 were incubated for 18 h with 200 μg apoB/mL of oxLDLs, UVOxL (LDL oxidized UV/Cu/EDTA, TBARS content, 6–8 nmol/mg apoB), CuOxL (Cu-oxidized LDL

TBARS content 12–15 nmol/mg apoB) (1 mg/mL native LDL incubated with 5 μmol/L CuSO<sub>4</sub> for 1 h 30 min at 37°C) and CellOxL (cell-oxidized LDL, TBARS content 9–12 nmol/mg apoB) (200 mg apoB/L of native LDLs in RPMI medium containing 1 μmol/L CuSO<sub>4</sub>, incubated overnight with subconfluent HMEC-1, then the medium was recovered and used for incubation with a new HMEC-1 batch for 18 h).

In the lower part of the Table, HMEC-1 were incubated for 18 h with the various aldehydes (4-HNE, 10 μmol/L, 4-hydroxyhexenal or 4-HHE, 10 μmol/L, methylglyoxal or MGO, 10 and 100 μmol/L, glyoxal or GO, 10 and 100 μmol/L). At the end of the incubation with oxLDL or aldehydes, cells were washed three times in PBS, harvested and PDI activity was determined using Di-E-GSSG, as described in the Methods section. The data are expressed as % of the untreated control. Mean ± SD of 3 separate experiments. \**p* < 0.05.

tested inhibited PDI, but their efficacy was quite different. PDI inhibition by 4-HHE (4-hydroxyhexenal) and 4-HNE were similar, but the dialdehydes GO (glyoxal) and MGO (methylglyoxal) were less effective, since a 10 times higher concentration of GO or MGO was required to inhibit PDI as with 4-HNE (lower part of Supplementary Table S1).

#### Expression of PDI in macrophage-like U937 cells incubated with oxLDLs

The expression of PDI in macrophage-like U937 cells was not altered by incubation of cells with oxLDLs (as in HMEC-1) (Supplementary Fig. S2).

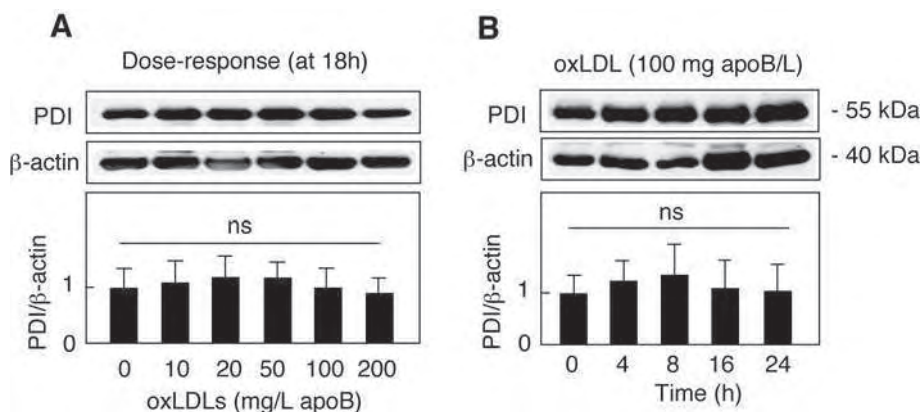
#### PDI inhibition by bacitracin increases the cytotoxic effect of oxLDLs in U937

Bacitracin potentiated the toxic effect of oxLDLs on U937 cells. As shown in Supplementary Figure S3, bacitracin

(10 μmol/L) was not (or only slightly) toxic to U937 cells. OxLDLs (100 mg apoB/L) were slightly toxic, but became more toxic in the presence of bacitracin, in agreement with the data on HMEC-1.

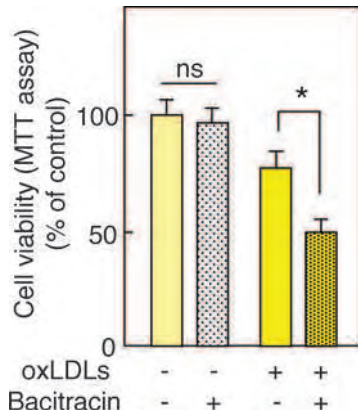
#### Evaluation of the apoptotic effect of oxLDLs (200 mg apoB/L) by TUNEL labeling

Toxic concentration of oxLDL may trigger necrosis or apoptosis (7, 12). To evaluate the effect of PDI on the apoptotic effect of toxic concentration of oxLDLs more precisely, we performed TUNEL labeling of control HMEC-1, myc-PDI wt HMEC-1, and myc-PDI mut HMEC-1 incubated with for 24 h with oxLDLs (200 mg apoB/L) using the ApopTag<sup>®</sup> Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit from Chemicon/Millipore France. The nuclei of TUNEL-positive cells are red colored and counted as percentage of total cell number evaluated by DAPI labeled nuclei. It should be noted that the red color of TUNEL positive nuclei masks the blue fluorescence of DAPI. The composite



SUPPLEMENTARY FIG. S2. Dose-response (A) and time course (B) of the expression of PDI in U937 cells incubated with oxLDLs. Expression of PDI in U937 preincubated for 18 h with increasing concentrations of oxLDLs (A) or preincubated with 100 mg apoB/L oxLDLs for increasing period of time (B). Western blots were performed as indicated in Methods section. Densitometric analysis was performed using Image J software and expressed as ratio PDI/β-actin (black bars) or myc-PDI/β-actin (gray bars). Western blots representative of 3 experiments. The data of PDI/β-actin (ratio) are expressed as mean ± SD of 3 separate experiments. \**p* < 0.05; ns, not significant.





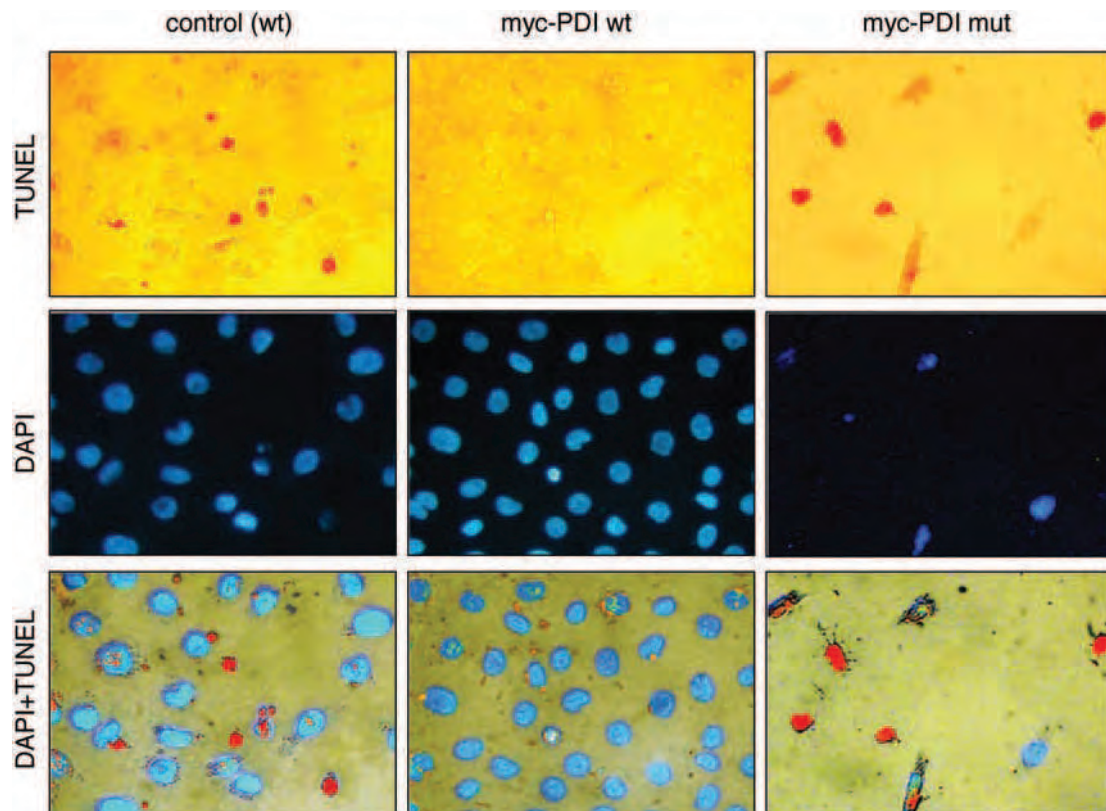
**SUPPLEMENTARY FIG. S3. Bacitracin potentiates oxLDL toxicity in U937 cells.** U937 cells were incubated with or without bacitracin (10  $\mu$ mol/L) and with or without oxLDLs (100 mg apoB/L) for the indicated time, and cell viability was evaluated by the MTT assay. The data are expressed as % of the untreated control. Mean  $\pm$ SD of 3 separate experiments. \* $p$  < 0.05.

images of Figure 3G are obtained from the microphotography of DAPI fluorescence and from bright-field microphotography of TUNEL staining, shown in Supplementary Figure S4.

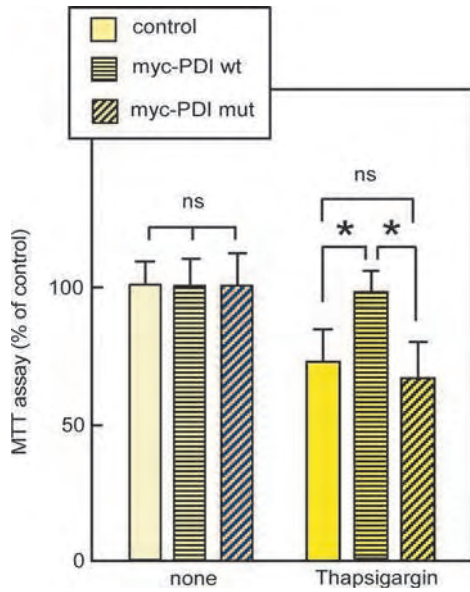
*Forced expression of wt PDI reduces the toxic effect of thapsigargin*

In order to better understand the mechanism of action of oxLDLs on PDI (PDI modification and inactivation) and its relationship with their putative consequences on ER stress and apoptosis, we compared it with the effect of the ER stress inducer thapsigargin. Higher expression of active PDI in myc-PDI wt HMEC-1 than in control (parental) was associated with lower toxic effect of thapsigargin (Supplementary Fig. S5), as with oxLDLs. However, interestingly, the expression of myc-PDI mut did not worsen the toxic effect of thapsigargin, in contrast to oxLDLs.

The extra-potential of toxic effects of oxLDLs in cells expressing inactive mut-PDI is apparently puzzling, given the constitutive enzyme was still present and active. The comparison of the effect of oxLDLs and thapsigargin, which act through different mechanisms to trigger ER stress and toxicity, provides some clues. This suggests that, in myc-PDI mut HMEC-1, reactive aldehydes generated upon oxLDLs treatment elicit: i) the modification of cellular proteins,



**SUPPLEMENTARY FIG. S4. Apoptosis in control (parental untransfected) HMEC-1, myc-PDI wt HMEC-1, and myc-PDI mut HMEC-1 incubated with oxLDLs.** HMEC-1, myc-PDI mut HMEC-1, and myc-PDI wt HMEC-1 were incubated for 24 h with oxLDLs (200 mg apoB/L). After fixation, TUNEL staining (*upper panel*) was performed by the ApopTag<sup>®</sup> Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon/Millipore France) and nuclei were stained by the blue-fluorescent DNA stain DAPI (*middle panel*). It may be noted that the DAPI fluorescence is hidden by the *red color* of the TUNEL in apoptotic nuclei. The composite image (*lower panel*) was obtained by overlaying the bright field TUNEL and the fluorescent DAPI pictures using Adobe Photoshop CS5 software. Representative pictures of 3 experiments.



**SUPPLEMENTARY FIG. S5. Toxicity of thapsigargin on wt parental (control) HMEC-1, myc-PDI mut HMEC-1, and myc-PDI wt HMEC-1.** The toxic effect of thapsigargin (1  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h) on control, myc-PDI wt, and myc-PDI mut HMEC-1, was evaluated by the MTT assay. Mean  $\pm$  SD of 3 separate experiments. \* $p < 0.05$ .

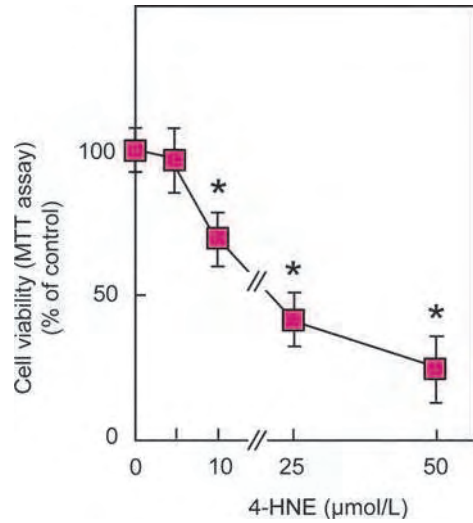
including PDI, and the inactivation of the constitutive PDI; and ii) the modification of inactive mut-PDI that may induce misfolding of mutant PDI (possibly already destabilized by mutations). As mut-PDI is relatively abundant (mut-PDI level is twice that of constitutive wt PDI, which is one of the most abundant ER proteins), misfolding of the mut-PDI could reinforce and prolong ER stress, thereby activating the apoptotic pathway.

#### Dose-dependent toxicity of 4-HNE on HMEC-1

Incubation of HMEC-1 for 24 h with increasing concentrations of 4-HNE, generated a toxic effect for concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$  and higher (Supplementary Fig. S6). It may be noted that 4-HNE toxicity was evaluated in HBSS culture medium, in order to avoid any buffering of free 4-HNE by amino acids and peptides present in the classical culture medium.

#### The carbonyl scavengers N-acetylcysteine and pyridoxamine inhibit 4-HNE-PDI adduct formation by oxLDLs

As the carbonyl scavengers N-acetylcysteine (NAC) and pyridoxamine prevented the inhibition of PDI by oxLDLs (Fig. S5 A), it was of interest to investigate whether they also inhibit the formation of 4-HNE-PDI adducts. Under the experimental conditions used in the Supplementary Figure S7, Western blots of PDI immunoprecipitated from HMEC-1 incubated with oxLDLs in the presence or absence of NAC and pyridoxamine showed that both NAC and pyridoxamine prevented the formation of high molecular weight polymerized form of PDI and 4-HNE-PDI adducts (Supplementary Fig. S7). These data reinforce the link between PDI modification and inactivation by 4-HNE (and more

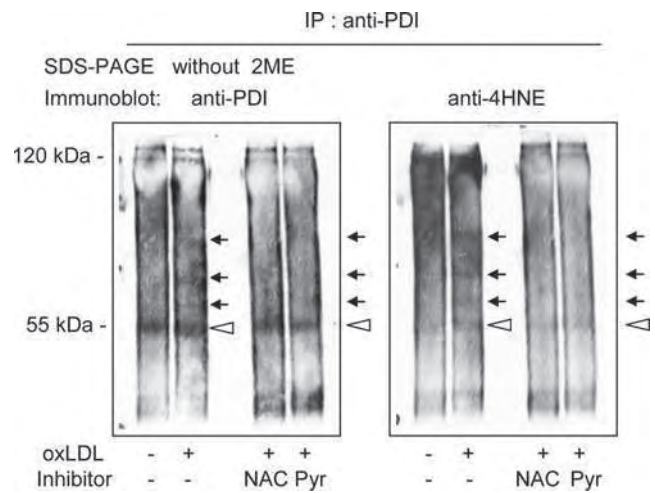


**SUPPLEMENTARY FIG. S6. Toxicity of increasing concentration of 4-HNE.** HMEC-1 were incubated with 4-HNE at the indicated concentrations, and for 24 h in HBSS, then cell viability was evaluated by the MTT assay. The data are expressed as % of the untreated control. Mean  $\pm$  SD of 3 separate experiments. \* $p < 0.05$ .

largely by reactive carbonyl compounds derived from lipid peroxidation).

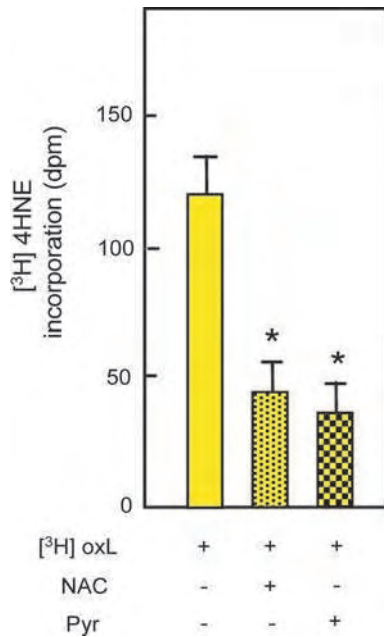
#### 4-HNE is transferred from oxLDLs to HMEC-1

In cultured cells incubated with oxLDLs loaded with [ $^3\text{H}$ ]4-HNE, we have observed a transfer of the radiolabeled [ $^3\text{H}$ ]4-HNE from oxLDLs to cell proteins (8). Here, we report that incubation of HMEC-1 with oxLDLs pre-loaded with



**SUPPLEMENTARY FIG. S7. The carbonyl scavengers NAC and pyridoxamine inhibit 4-HNE-PDI adduct formation by oxLDLs.** Western blot of PDI immunoprecipitates from HMEC-1 incubated for 14 h with oxLDLs (200 mg/L), with or without NAC (5 mmol/L) or pyridoxamine (100  $\mu\text{mol/L}$ ), then resolved by SDS-PAGE without mercaptoethanol and revealed with anti-PDI or anti-4-HNE adduct antibodies. Arrows show the monomeric PDI (55 kDa) and high molecular weight cross-linked modified PDI. Representative of 3 separate experiments.





**SUPPLEMENTARY FIG. S8. Transfer of [<sup>3</sup>H]4-HNE from oxLDLs to HMEC-1 and inhibition by the carbonyl scavengers NAC and pyridoxamine.** HMEC-1 were incubated for 14 h with oxLDLs pre-loaded with free radiolabeled [<sup>3</sup>H]4-HNE (100 000 dpm for 200 μg apoB/mL) and with or without the carbonyl scavengers NAC (5 mmol/L) or pyridoxamine (100 μmol/L). PDI was immunoprecipitated (from 1 mg cell protein extract), and the [<sup>3</sup>H]4-HNE radioactivity was counted. The data are expressed as dpm of radioactivity associated to PDI (representing 4%–6 % of the total cell associated [<sup>3</sup>H]4-HNE radioactivity). Mean ± SD of 3 separate experiments. \**p* < 0.05.

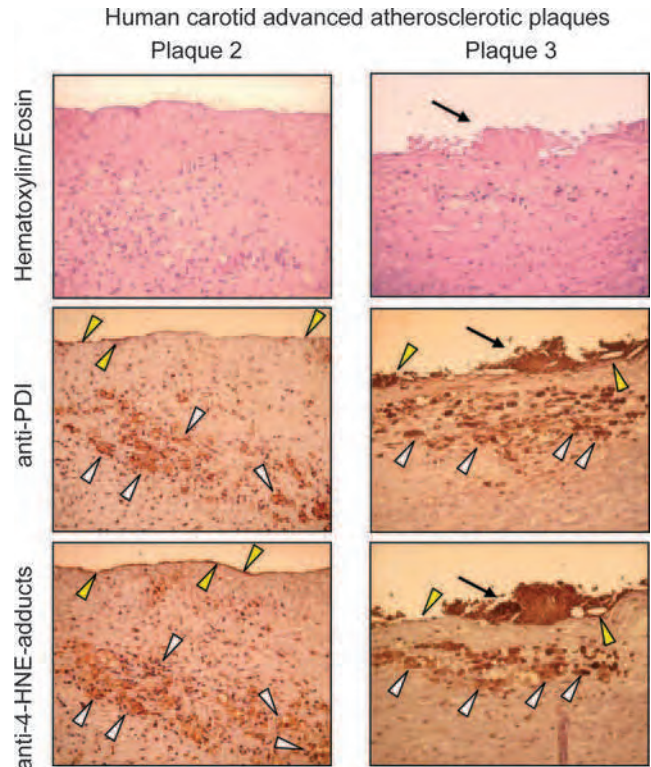
radiolabeled 4-HNE elicited the formation of radiolabeled [<sup>3</sup>H]4-HNE-PDI that was in part inhibited by NAC and pyridoxamine (Supplementary Fig. S8).

Interestingly, this suggests that, beside the major part of 4-HNE contained in oxLDLs which forms adducts with LDL components (e.g., apoB or phosphatidylethanolamine), a (minor) part of [<sup>3</sup>H]4-HNE remains free, dissolved in the lipid phase of the oxLDL, estimated to around 10% of total 4-HNE contained in oxLDLs by Esterbauer et al. (6), is able to react with cellular protein, among them PDI, to form [<sup>3</sup>H]4-HNE-PDI adducts. This is consistent with the fact that the major part of 4-HNE-PDI adducts are formed through oxidative stress triggered by oxLDLs (and inhibited by antioxidants trolox and BHT).

#### Expression of PDI and 4-HNE-adducts in human carotid atherosclerotic plaque

As reported in Supplementary Figure S9, advanced atherosclerotic plaques from human carotid endarterectomy were intensely labeled by anti-PDI and by anti-4-HNE-adducts at the endothelial cell lining (*yellow arrowheads*) and in the macrophage-rich (CD68-positive, as shown in Supplementary Fig. S9) lipidic core area (*white arrowheads*) of the plaques.

Interestingly, the thrombus attached to the endothelium of the plaque 3 is also intensely labeled by PDI and 4-HNE-adducts (*arrows in the right panels* of Supplementary Fig. S9). The presence of PDI in the thrombus is consistent with the



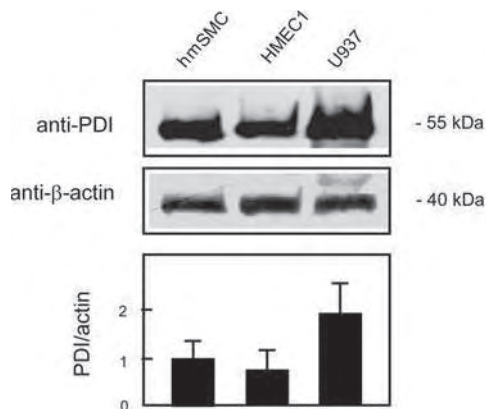
**SUPPLEMENTARY FIG. S9. Expression of PDI and 4-HNE-adducts in human advanced plaque.** Sequential sections of two atherosclerotic plaques stained with Hematoxylin/Eosin and labeled with anti-PDI and anti-4-HNE-Michael adducts antibodies (revealed by immunoperoxidase-labeled secondary antibody) in atherosclerotic plaques from carotid endarterectomy. *White arrowheads* show some areas of the plaque intensely labeled for PDI and 4-HNE-Michael adducts, and *yellow arrowheads* point the staining of endothelium. *Black arrows* point a thrombus attached to an eroded area of the surface of the plaque 3.

presence of PDI in thrombocytes (3), and the critical role of PDI in thrombus formation (4). The intense staining for 4-HNE adducts is also in agreement with the generation of ROS during platelet aggregation (1, 5, 11), and subsequent lipid peroxidation by activated platelets (10).

In the light of the data obtained on cultured cells, this suggests that PDI modification could be associated with a loss of PDI activity and of its antiapoptotic activity in the endothelium and in the core of advanced atherosclerotic lesions, and may contribute to reduce the antiapoptotic power of the vascular cells in these areas, thereby decreasing plaque stability and increasing the risk of plaque erosion or rupture. It may be noted that, in the plaque 3, the thrombus was probably formed in an area of erosion of the surface of plaque.

#### Expression of PDI in HMEC-1, hmSMC, and U937

We examined the basal level of PDI expression in three cell lines we used as models of various cell types potentially involved in arterial atherosclerotic remodeling, namely hmSMC, HMEC-1, and U937 cells. As shown by Western blot (Supplementary Fig. S10), PDI was expressed in the three cell



**SUPPLEMENTARY FIG. S10. Expression of PDI in hmSMC, HMEC-1 and U937.** Expression of PDI in hmSMC, HMEC-1, and U937 grown under standard conditions. Densitometric analysis was performed using Image J software and expressed as ratio PDI/ $\beta$ -actin (black bars) or myc-PDI/b-actin (gray bars). Western blot representative of 3 experiments.

lines. Compared to HMEC-1, PDI expression was slightly higher in hmSMC and was about twice higher in U937 cells (Supplementary Fig. S10). It may be noted that, under the used experimental conditions, the preincubation of U937 cells with oxLDLs for increasing period of time or with increasing concentrations of oxLDLs did not alter PDI expression as shown above (Supplementary Fig. S2), similarly to the data observed on HMEC-1 (Fig.1 of the main document).

### Supplementary References

- Bakdash N and Williams MS. Spatially distinct production of reactive oxygen species regulates platelet activation. *Free Radic Biol Med* 45: 158–166, 2008.
- Bouguerne B, Belkheiri N, Bedos-Belval F, Vindis C, Uchida K, Duran H, Grazide MH, Baltas M, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Antiatherogenic effect of bisvanillylhydralazine, a new hydralazine derivative with antioxidant, carbonyl scavenger, and antiapoptotic properties. *Antioxid Redox Signal* 14: 2093–2106, 2011.
- Chen K, Lin Y, and Detwiler TC. Protein disulfide isomerase activity is released by activated platelets. *Blood* 79: 2226–2228, 1992.
- Cho J, Furie BC, Coughlin SR, and Furie B. A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice. *J Clin Invest* 118: 1123–1131, 2008.
- Del Principe D, Frega G, Savini I, Catani MV, Rossi A, and Avigliano L. The plasma membrane redox system in human platelet functions and platelet-leukocyte interactions. *Thromb Haemost* 101: 284–289, 2009.
- Esterbauer H, Schaur RJ, and Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81–128, 1991.
- Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Nègre-Salvayre A. Necrosis and apoptosis induced by oxidized low density lipoproteins occur through two calcium-dependent pathways in lymphoblastoid cells. *FASEB J* 8: 1075–1080, 1994.
- Escargueil-Blanc I, Salvayre R, Vacaresse N, Jürgens G, Darblade B, Arnal JF, Parthasarathy S, and Nègre-Salvayre A. Mildly oxidized LDL induces activation of platelet-derived growth factor beta-receptor pathway. *Circulation* 104: 1814–1821, 2001.
- Galvani S, Trayssac M, Augé N, Thiers JC, Calise D, Krell HW, Sallusto F, Kamar N, Rostaing L, Thomsen M, Nègre-Salvayre A, and Salvayre R. A key role for matrix metalloproteinases and neutral sphingomyelinase-2 in transplant vasculopathy triggered by anti-HLA antibody. *Circulation* 124: 2725–2734, 2011.
- Gorog P and Kovacs IB. Lipid peroxidation by activated platelets: A possible link between thrombosis and atherogenesis. *Atherosclerosis* 115: 121–128, 1995.
- Krötz F, Sohn HY, and Pohl U. Reactive oxygen species: Players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 1988–1996, 2004.
- Salvayre R, Auge N, Benoist H, and Nègre-Salvayre A. Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585: 213–221, 2002.
- Sanson M, Ingueneau C, Vindis C, Thiers JC, Glock Y, Rousseau H, Sawa Y, Bando Y, Mallat Z, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Oxygen-regulated protein-150 prevents calcium homeostasis deregulation and apoptosis induced by oxidized LDL in vascular cells. *Cell Death Differ* 15: 1255–1265, 2008.
- Suc I, Meilhac O, Lajoie-Mazenc I, Vandaele J, Jürgens G, Salvayre R, and Nègre-Salvayre A. Activation of EGF receptor by oxidized LDL. *FASEB J* 12: 665–671, 1998.



## **Role of Neutral Sphingomyelinase type-2 / Sphingosine kinase 1 / Sphingosine-1-phosphate pathway in the angiogenic effect of oxidized LDL.**

Atherosclerosis and relative complications represent the main cause of morbi-mortality in western countries and arise a major problem for public health. Many risk factors have been described, in particular hypercholesterolemia linked to circulating LDL. The oxidation of LDL constitutes a decisive stage in atherogenesis.

The vascular wall of the medium and large arteries is vascularized by a microcapillaries plexus (vasa vasorum) located in adventice, and in charge to bring oxygen and nutrients to the most external layers of the arterial wall. Although, no capillaries are found in the intima or media of normal arteries, we observe neovascularization under intimal hyperplasia of atherosclerotic arteries. As oxidized LDL could display angiogenic properties, they may contribute to this neovascularization, taking part in plaque growth but also in increasing risk of intraplaque haemorrhage and destabilization leading to atherothrombotic complications.

The angiogenic mechanisms of oxidized LDL is yet incompletely known, and the involvement of sphingosine-1-phosphate (S1P), a second messenger of sphingolipid pathway, well known for its angiogenic properties, has never been reported in oxLDL-induced angiogenesis.

The aim of this work is to evaluate the involvement of sphingolipid pathway and its mechanisms of activation, with subsequent generation of S1P, in proangiogenic effects of oxidized LDL on microvascular endothelial cells.

In a first part, we have demonstrated a biphasic effect exhibited by oxidized LDL in HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cells), low oxLDL concentrations (20 to 50µg/ml) being angiogenic, whereas higher concentrations being not toxic yet (100µg/ml) are non angiogenic. Beyond these concentrations, as expected, a toxic effect was observed. Inhibition of SK1 (sphingosine kinase-1) expression by using a specific SiRNA, and use of S1P blocking antibody (*Sphingomab*<sup>TM</sup>), exhibit an efficient inhibition of oxLDL-induced tubulogenesis of endothelial cells *in vitro*. Angiogenesis in C57/Bl6 mice (using Matrigel plug assay containing oxLDL), is efficiently prevented by administration of the S1P blocking antibody *Sphingomab*<sup>TM</sup>, defining the major role of this bioactive lipid in the oxLDL angiogenic signal, *in vitro* and *in vivo*. Mechanistically speaking, ox-LDL-induced SK1 activation and angiogenesis are blocked by using anti-CD36 and anti-LOX-1 blocking antibody, showing the involvement of oxLDL scavenger receptors in this signaling. The use of a sphingosine kinase inhibitor of VEGFR2 blocks ox-LDL-induced angiogenesis in the same range as exogenous S1P-induced angiogenesis, evoking a cross-talk between VEGFR and membranary S1P receptors, in the absence of ox-LDL-induced VEGF synthesis in HMEC-1

In a second part, we have shown that ox-LDL-induced SK1 activation and subsequent S1P synthesis, was tightly linked to the amount of nSMase2 activation in endothelial cells *in vitro*, involving also oxidative stress and p38MPAK. The use of a chemical inhibitor of nSMase2 efficiently blocks both ox-LDL-induced angiogenesis and SK1 activation *in vitro*. The time course of ROS generation and p38MAPK phosphorylation in HMEC-1 submitted to angiogenic doses of oxLDL appears earlier than enzymes activation of sphingolipid pathway. Using antioxidants as NAC and trolox, as well as a phospho-p38MPAK inhibitor, we block both angiogenesis and nSMase2 and SK1 activation *in vitro*, evoking implication of oxidative stress and p38MPAK in this signalling amount of sphingolipid pathway.

In a third part, we have studied the link between oxLDL induction of sphingolipid pathway and connexin-43, a constitutive protein of gap junctions allowing signal transduction between adjacent cells. Through the use of two connexin pharmacological inhibitors, we have obtained an efficient inhibition of oxLDL-induced SK1 activation and tubulogenesis *in vitro*, evoking that gap junctions may take part in oxLDL angiogenic signalling, implicating S1P generation. In the perspective of this work, we plan to intensify the knowledge of mechanisms involving connexin-43 in this signaling, particularly in relation to sphingolipid pathway and p38MAPK. Thereafter we would like to establish a link between this work and the development of plaque neovascularization *in vivo*, in support of SK1 or connexin-43 staining on endarterectomy samples of human carotids from patients.

These results arise new targets (S1P, connexin-43) implicated in development of intraplaque neoangiogenesis, and new therapeutic possibilities to limit atherothrombotic complications that significantly worsen the prognosis of atherosclerotic patients.







AUTEUR : CAMARE Caroline

**TITRE : Rôle de la voie Sphingomyélinase neutre de type-2 / Sphingosine kinase 1 / Sphingosine-1-phosphate dans l'effet angiogénique des LDL oxydées.**

**DIRECTEURS DE THESE :** Pr Robert Salvayre et Dr Anne Nègre-Salvayre.

**LIEU ET DATE DE SOUTENANCE :** 5 Mai 2014, Faculté de médecine de Rangueil, Toulouse.

---

**RESUME :**

La vascularisation des plaques d'athérome au niveau des artères de gros et moyen calibre est un élément déterminant dans le processus complexe de l'athérogenèse. Les LDL oxydées, par leur effet proangiogénique, peuvent contribuer à cette neovascularisation qui participerait à l'expansion de la plaque mais augmenterait aussi le risque d'hémorragies intraplaques ainsi que le risque de rupture et d'accidents athérothrombogènes.

Dans ce travail nous évaluons l'implication et les mécanismes d'activation de la voie des sphingolipides, avec la génération consécutive de S1P, dans l'effet pro-angiogénique des LDL oxydées *in vitro* sur les cellules endothéliales microvasculaires, et *in vivo* chez des souris C57/Bl6.

Dans une première partie nous montrons l'effet biphasique dose-dépendant des LDL oxydées sur l'angiogénèse, les faibles doses étant proangiogènes. Cette signalisation angiogénique implique les récepteurs scavengers des LDLox à l'origine de l'activation de la sphingosine kinase 1 et la génération de sphingosine-1-phosphate, un lipide bioactif bien connu pour ses propriétés angiogéniques.

Dans une deuxième partie nous montrons que l'activation de la voie SK1/S1P sous l'effet de faibles doses de LDLox est étroitement liée à l'activation en amont de la Sphingomyélinase neutre de type 2. La mise en jeu du stress oxydant et de p38MAPK en amont de la voie des sphingolipides est également impliquée dans cette signalisation angiogénique.

Dans une troisième partie nous avons étudié le lien entre l'activation de la voie des sphingolipides par les LDLox et la connexine-43, protéine constitutive des jonctions gap permettant la transduction d'une signalisation entre cellules adjacentes. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des connexines, a permis d'obtenir une inhibition efficace de l'activation de la SK1 et de la tubulogénèse induite par les LDLox *in vitro*, permettant d'évoquer la participation des jonctions gap dans la transduction du signal angiogène des LDLox à l'origine de la génération de S1P. En perspective à ce travail, nous projetons d'approfondir les mécanismes impliquant la connexine-43 dans cette signalisation notamment par rapport à la nSMase2 et à p38MPAK et d'établir un lien avec le développement de la vascularisation des plaque *in vivo* sur des échantillons d'artériectomie carotidienne.

Ces travaux mettent en évidence de nouvelles cibles (S1P, connexine-43) impliquées dans le mécanisme de la néoangiogénèse intraplaque, évoquant de nouvelles perspectives thérapeutiques pour limiter les complications athérothrombogènes grèvant de façon importante le pronostic des patients atteints d'athérosclérose.

---

**MOTS-CLES :** Athérosclérose, LDL oxydées, angiogénèse, voie des sphingolipides, stress oxydant, p38MAPK, connexines.

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :** Physiopathologie

**LABORATOIRE :** INSERM UMR 1048, I2MC, Equipe 10  
1 avenue Jean Poulhès  
BP 84225  
31432 TOULOUSE Cedex 4