Altérations Phénotypiques des Cellules Musculaires Lisses Vasculaires dans la Maladie d'Alzheimer et l'Athérosclérose

Régis Blaise

▶ **To cite this version:**

Régis Blaise. Altérations Phénotypiques des Cellules Musculaires Lisses Vasculaires dans la Maladie d'Alzheimer et l'Athérosclérose. Physiologie [q-bio.TO]. Sorbonne Université, 2019. tel-02971805

HAL Id: tel-02971805
https://hal.science/tel-02971805

Submitted on 19 Oct 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université
Faculté des Sciences et Ingénieries
Campus Pierre et Marie Curie
UFR 927- Sciences de la Vie

Mémoire en vue de l'obtention de l'

HABILITATION À DIRIGER DES RECHERCHES (HDR)

Spécialité Physiologie et Physiopathologie

ALTÉRATIONS PHÉNOTYPIQUES DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES VASCULAIRES DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER ET L'ATHÉROSCLÉROSE

présenté par

Régis BLAISE

MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS

Soutenue le 5 juillet 2019 devant le jury composé de:

Xavier HOUARD, Professeur d'Université, Sorbonne-Université, Paris, France.	*Président*
Marie-Luce BOCHATION-PIALLAT, Maître d'Enseignement et de Recherche, Université de Genève, Suisse.	*Rapportice*
Jean-Luc OLIVIER, Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, Faculté de Médecine de Nancy, France.	*Rapporteur*
Grégoire VANDECASTEELE, Directeur de Recherche, INSERM U1180, Chatenay-Malabry, France.	*Rapporteur*
Anne NEGRE-SALVAYRE, Directrice de Recherche, UMR-1048, Toulouse, France.	*Examinatrice*
Jean-Noël OCTAVE, Professeur d'Université, Université Catholique de Louvain, Belgique.	*Examinateur*
Isabelle LIMON, Professeure d'Université, Sorbonne-Université, Paris, France.	*Membre invité*

Sorbonne Université, Faculté des Sciences et Ingénierie
Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS)
UMR-CNRS 8256 Adaptation Biologique et Vieillisement (B2A)
Equipe «*Dynamique de la signalisation intracellulaire et cibles thérapeutiques*»
7 Quai St Bernard, Bâtiment B, 6ème étage
75252 Paris Cedex 5

à Arielle, Aaron et Sacha

Remerciements

J'ai croisé énormément de personnes depuis mes premiers pas dans un laboratoire de recherche en 1995. Il m'est impossible de toutes les citer, mais elles m'ont accompagné pendant ces 24 années et certaines d'entre elles ont été une véritable source d'inspiration et d'admiration.

Tout d'abord un grand merci aux membres du jury, qui m'ont fait l'honneur et/ou l'amitié d'accepter de participer à cette HDR, pendant la période de l'année la plus chargée qui soit. Tout d'abord Marie-Luce Bochaton-Pialat, Jean-Luc Olivier et Grégoire Vandecasteele pour leur bienveillance en tant que rapporteur de cette HDR, ainsi que Anne Nègre-Salvayre, Jean-Noël Octave, et Xavier Houard.

Je souhaite ensuite remercier tout particulièrement Isabelle Limon de me faire confiance depuis presque 10 ans, avec bienveillance mais exigence. Isabelle est grandement responsable du scientifique et de l'enseignant que je suis aujourd'hui, sans son soutien, sa combativité, ses conseils, son objectivité et son amitié, je ne serai pas là où j'en suis. Merci à toi pour tout.

Un immense merci à Pierre Vincent, pour tout ce que j'ai appris avec lui. Merci pour ton sens critique, ta rigueur et ton intégrité scientifique, des valeurs essentielles à mes yeux. Merci également à son équipe pour les moments passés et surtout à venir.

Un merci spécial aux étudiants que j'ai encadrés et qui ont eu souvent à supporter mon caractère pas toujours facile. Votre motivation et votre investissement dans ces projets ont été décisifs, vous les avez fait grandir et mûrir, vous avez eu le même effet sur moi et j'espère que j'en ai fait autant pour vous. Un merci tout particulier à Benjamin Vallin, Justine Hur et Yohan Legueux-Cajgfinger pour tout.

Merci à tous les membres de l'équipe CMLV, présents ou passés, qui ont participé à tous les niveaux à ces deux projets : Martine Glorian, Mégane Babiak, Véronique Matéo, Célia Moulin, Clotilde Rouxel et aux étudiants du laboratoire ayant travaillé sur ces projets: Amélie Vromman, Eda Sellam, Emilie Wong-Chong, Nesrine Trabelsi, Zela Keuylian, Jeroen de Baaj, Saskia Flamand, Marion Millerand, Myrian Batoul Moumni et François Zaccarini.

Un grand merci également à tous les membres de l'UMR8256 et à son directeur, Bertrand Friguet, ainsi qu'à tous mes collègues enseignants-chercheurs de Sorbonne Université.

❖

A ma famille, de sang comme de cœur, et à mes amis pour leur soutien indéfectible.

A mon épouse Arielle, et à mes enfants Aaron et Sacha, mes trois piliers, mes trois merveilles, mes trois points cardinaux, mon triptyque... Ma plus belle récompense est la fierté que je lis dans vos yeux.

ABREVIATIONS

12-LOX : 12-lipooxygénase
AA : Acide Arachidonique
AAC : Angiopathie amyloïde cérébrale
AC : Adénylyl Cyclases
Ach : Achétylcholine
AINS : Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AKT : protein kinase B
APP : Amyloid precursor protein
ATP : Adénosine triphosphate
Aβ : Peptides beta-amyloïdes Aβ
Aβ1-40 : Peptides Aβ de 40 aa
Aβ1-42: Peptides Aβ de 42aa
Aβ25-35 : Peptides Aβ de 11 aa
BACE1 : Enzyme-1 de clivage du site- β de APP
Bam10 : Anticorps spécifique des peptides amyloïdes.
bEnd3 : Lignée de cellules vasculaires endothéliales cérébrales murines.
CCL3 : C-C motif chemokine ligand 3
CCL5 : C-C motif chemokine ligand 5
CD40 : Cluster de differenciation 40
CD40-L : Ligand de CD40
cDNA : ADN complémentaire
CMLV : Cellules musculaires lisses vasculaires
tdCMLV : Cellules musculaires lisses vasculaires transdifferenciées à l'IL1β
CNG : Cyclic nucleotide-gated ion channel
COX2 : Cyclooxygénase-2
CXCL2 : C-X-C motif chemokine ligand 2
DHA : Acide docosahexaénoïque
EPA : Acide eicosapentaénoïque
EPAC :Exchange protein directly activated by cAMP
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
FRET : Förster ou Fluorescence Resonance Energy Transfer
GC/MS : Chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse
GMP : Guanosine 5'-monophosphate
GMPc : Guanosine monophosphate cyclique
HA : Human influenza hemagglutinin
HEK : human epithelial kidney
HETE : Hydroxyeicosatetraénoïques
IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine
ICAM-1 : intercellular adhesion molecule 1
IFNγ : Interféron γ
IL-1β : Interleukine-1 β
IL-6 : interleukine 6
IL-8 : interleukine 8
iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible.

LC/ESI-MS : Chromatographie liquide/spectrométrie de masse
LDL : Lipoprotéines de faible densité
LDL-Ox : LDL oxydées
LTB4, LTC4, LTE4 : Leucotriènes D4, C4 et E4
LXA4 et LXB4 : lipoxines A4 et B4
M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor
M1 et M2 : Cassettes transmembranaires des adenylyl cyclases
MAPT : Etude menée chez l'homme « Multidomain Alzheimer Preventive Trial »
Mar1 : Marésine 1
MCP-1 :Monocyte chemoattractant protein 1
MLC20 : Chaine légère de Myosine, 20KDa
MMP : Métalloprotéases
MT1-MMP : Membrane-type 1 metalloprotease
NE : Noradrénaline
NF-κB : Nuclear Factor kappa B
NLS : Nuclear localization signal
NO : Oxyde nitrique
PDE : Phosphodiestérases
PDGF : Platelet-derived growth factor
PDX : Protectine DX
PFA : Paraformaldéhyde
PGE2 : Prostaglandine E2
PI3K : phosphatidylinositol 3 kinase
PKA : Protéine kinase A
PUFA : Acides gras poly-insaturés
RACE-PCR : Rapid amplification of cDNA-ends by polymerase chain reaction
RCPG : Récepteurs couplés aux protéines G
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RvD1 : Resolvine D1
SM-MHC : Smooth Muscle Myosine Heavy chain)
SM22 : Smooth muscle protein
SPM : Médiateurs lipidiques pro-résolutifs spécialisés
^{T}EPAC^{VV} : Biosenseur AMPc
TGFβ : Transforming growth factor β
TIMP2 : Tissue inhibitor metalloprotease 2
TNF-α : Facteur de nécrose tumorale α
VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule 1
VSV : Virus de la stomatite vésiculaire
WT : Souris sauvages

SOMMAIRE

Curriculum Vitae **1**

Avant-Propos **9**

Projet 1 : « Maladie d'Alzheimer et Altérations Vasculaires ». **10**

1. Introduction 10

1.1. Contexte et problématique. 10

1.2. Neuro-inflammation dans la maladie d'Alzheimer et cibles thérapeutiques 11

1.3. Altérations vasculaires et maladie d'Alzheimer. 13

1.4. Les médiateurs lipidiques, acteurs clés de l'inflammation 14

1.5. Neuro-inflammation et inflammation vasculaire : médiateurs lipidiques pro-inflammatoires et pro-résolutifs. 14

1.6. Objectifs de l'étude 16

2. Résultats 17

2.1. Dégénérescence et réponse inflammatoire des CMLV induites par le peptide $A\beta_{1-40}$. 17

2.2. Effets du DHA sur l'inflammation cérébrovasculaire associée à la maladie d'Alzheimer et aux angiopathies amyloïdes cérébrales : étude in vivo. 20

3. Contribution personnelle et encadrement sur ce projet. 25

4. Projet de recherche. 26

4.1. Contexte 26

4.2. Objectifs du projet. 27

4.3. Méthodologie. 28

Projet 2 : « Remodelages vasculaires pathologiques et AC8 » **29**

1. Introduction 29

1.1. Les CMLV au cœur des remodelages vasculaires pathologiques 29

1.2. Importance de l'AMPc dans des CMLV. 30

1.3. L'Adenylyl cyclase 8, un acteur clé de la transition phénotypique des CMLV. 31

1.4. Historique et objectifs du projet 32

2. Principaux résultats 33

2.1. Identification et clonage des AC8 exprimées dans les CMLVtd. 33

2.2. Implication des AC8E-H dans la dynamique de production d'AMPc. 34

2.3. Caractérisation des AC8E-H. 34

2.4 L'AC8E se comporte comme un dominant négatif 35

3. Contribution personnelle et encadrement sur ce projet. 36

4. Projet de recherche. 37

3.1. Caractérisation des effets de l'AC8E sur l'intégration du signal et sur les propriétés des CMLV. 38

3.2. Conception et validation de peptides interférents ciblant les AC8E-H. 39

3.3 Validation de l'efficacité des peptides sur la resténose post-angioplastie. 39

Références Bibliographiques **41**

Curriculum Vitae

Régis BLAISE
Maitre de Conférences des Universités (CNU 66)
Né le 02 novembre 1971 à Toulouse

Affiliation

Sorbonne Université, Faculté des Sciences et Ingénierie
Campus Pierre et Marie Curie
Institut de Biologie (IBPS)
UMR-CNRS 8256 Adaptation Biologique et Vieillissement (B2A)
Equipe « *Dynamique de la signalisation intracellulaire et cibles thérapeutiques* »
7 quai St Bernard, Bât A 5ème étage
75252 Paris Cedex 5
Tel: 01 44 27 26 92
regis.blaise@sorbonne-universite.fr

Diplômes

1999. Doctorat d'Université en Biologie, Santé et Biotechnologie.
Spécialité *« Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire ».* Université Paul Sabatier, Toulouse III. *Thèse soutenue le 13 décembre 1999. Mention très honorable avec félicitations du jury.*
Sujet : **Expression de la Lipase Hormono-sensible dans le testicule**
Directeur de thèse: Dr Dominique Langin (DR, INSERM), unité INSERM 317, Toulouse.

1998. Habilitation à L'expérimentation Animale de Niveau I.
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

1996. Diplôme d'Etudes Approfondies.
DEA de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (Dir. Pr Jean Cros). Université Paul Sabatier, Toulouse. *Mention Bien.*

Activités de Recherche

Depuis Sept 2013. **Maître de Conférences des Universités. Section CNU 66 (Echelon 7 depuis novembre 2018).**
Sorbonne Université-CNRS. Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS), UMR 8256 Adaptation Biologique et Vieillissement (Dir. Pr. B. Friguet),
Equipe du Pr. I. Limon
Projet 1: « Caractérisation et rôle d'une nouvelle isoforme de l'adenylyl cyclase 8 (AC8) dans les remodelages vasculaires pathologiques».
Projet 2: « Altérations phénotypiques et réponse inflammatoire des cellules musculaires lisses vasculaires induites par le peptide amyloïde-beta».
Bénéficiaire de la Prime d'Investissement en Recherche (PIR) de niveau 2 (2015-2019).

Sept 2012-Août 2013. **Attaché Temporaire Enseignement et Recherche (ATER), Section 66, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.**
UR4 Vieillissement, stress et inflammation (Dir. Pr. B. Friguet), Université UPMC Paris 6.
Thématique: « Expression de l'Adenylyl Cyclase 8 dans les cellules musculaires lisses vasculaires». (Equipe Pr. I. Limon)

Sept 2009-Août 2012. **Chercheur contractuel. Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.**

UR4 Vieillissement, stress et inflammation (Dir. Pr. B. Friguet), Université UPMC Paris 6.
Thématique: « Altérations phénotypiques et réponse inflammatoire des cellules musculaires lisses vasculaires induites par le peptide amyloïde-beta». (Equipe Pr. I. Limon)
Projet financé par Pierre Fabre Innovation

Oct 2006 à Avril 2008. **Chercheur postdoctoral. Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.**
UMR7079 Physiologie et Physiopathologie (Dir. Pr. M. Raymondjean), Université UPMC Paris 6.
Thématique: « Voie de signalisation Notch dans la dédifférenciation chondrocytaire». (Equipe Pr. F. Berenbaum)
Financement INSERM (Projet National de Recherche sur les maladies Ostéoarticulaires-ProA).
Obtention d'un financement INSERM (Pro-A) jeune équipe pour les années 2007 et 2008.

Oct 2002 à Sept 2006**. Chercheur postdoctoral. Institut Pasteur, Paris.**
Unité de Biologie Moléculaire de l'Expression Génique (Dir. Pr. A. Israël), Institut Pasteur, Paris.
Thématique: « Voie de signalisation NF-κB dans les lymphocytes T» (Equipe Dr. R. Weil)
Financement postdoctoral de la Fondation de France (2002-2004) et de L'institut Pasteur (2004-2006).

2000-2001**. Chercheur postdoctoral. Institut Cochin de Génétique Moléculaire.**
Unité INSERM 129 (Dir. Pr. A. Kahn), Institut Cochin de Génétique Moléculaire, Paris, France.
Financement par l'association française de lutte contre les myopathies (AFM).
Thématique: « Régulation de l'expression de Six1 dans le développement musculaire » (Equipe Dr. D. Daegelen / Dr. P. Maire)
Financement par l'association française de lutte contre les myopathies (AFM).

1996-1999**. Thèse de 3ème cycle universitaire. Université Paul Sabatier, Toulouse 3.**
Unité INSERM 317 (Dir. Dr. Max Lafontan) « Recherche sur les obésités » (Dir. de Thèse : Dr. D. Langin), IFR31, Toulouse, France. Spécialité Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire
Thématique: « Expression de la Lipase Hormono-Sensible (LHS) dans le testicule »
Thèse financée par le ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MENESR). 1996-1999.

Activités d'Enseignement Universitaire

Maitre de Conférence des Universités : depuis septembre 2013.
Université Pierre et Marie Curie, Paris VI. Section 66 : Physiologie
Enseignements principaux en licence (L2 et L3) : Neurophysiologie intégrative et Physiologie des grandes fonctions (3V515), Intégration fonctionnelle des signaux nerveux et hormonaux (2V415).
Enseignements principaux en Master (M1) : Mécanismes Moléculaires et Signalisation Cellulaire (4B001), Ateliers Technologiques (4B008), Outils de Biologie et d'Analyse Moléculaire Appliquées (4B031).

Responsable de l'UE de Master 1 : « Outils de Biologie et d'Analyse Moléculaire Appliquées » (4B031).
Co-Responsable des TD de l'UE de Licence 3 : « Neurophysiologie intégrative et Physiologie des grandes fonctions » (3V515).

Responsabilités Administratives

• Représentant élu (statutaire) des Chercheurs/Enseignants-Chercheurs (collège A et B) au conseil d'unité de L'UMR 8256 CNRS/UPMC (Dir. Pr. B.Friguet). Mandat 2014-2019.
• Représentant élu (suppléant) des Enseignants-Chercheurs (Collège B) au Conseil du Département du Master Biologie Intégrative (Dir. Pr. I.Limon). Mandat 2018-2022.
• Représentant élu (suppléant) des Chercheurs/Enseignants-Chercheurs (Rang B) au conseil de l'Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS) (Dir. Dr. M.Labouesse). Mandat 2014-2019.

Activités Académiques et scientifiques

• Membre du North American Vascular Biology Organization (NAVBO, USA). Depuis 2013.
• Membre du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (Filiale de la Société Française de Cardiologie). Depuis 2012
• Membre de la Nouvelle Société française d'Athérosclérose (NSFA). Depuis 2013
• Membre du comité scientifique de la plateforme d'imagerie cellulaire (Resp. Dr. S.Bolte) de l'Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS) (Dir. Dr. M.Labouesse). Depuis 2013.

Comité d'évaluation, jury, tutorat

• Participation au jury d'attribution des allocations doctorales : Ecole doctorale ED394 Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique (Dir. Xavier Houard et Catherine Monnot)
• Membre du jury de soutenance de stage des masters 1 et 2, spécialité Physiologie et Physiopathologie Humaine. Master de Biologie intégrative et Physiologie (BIP), Sorbonne-Université, Paris 6, Depuis 2015.
• Membre du jury de soutenance de stage des masters 1 et 2, spécialité Nutrition, Qualité, Santé. Master de Biologie intégrative et Physiologie (BIP), Sorbonne-Université, Paris 6. Depuis 2013.
• Membre de l'équipe pédagogique de la spécialité Nutrition, Qualité, Santé (NQS) du Master de Biologie Intégrative et Physiologie (BIP), Sorbonne-Université.
• Membre de l'équipe pédagogique de la spécialité Physiologie et Physiopathologie Humaine (PPH) du Master de Biologie Intégrative et Physiologie (BIP), Sorbonne-Université.
• Tutorat d'étudiants en M2 pro, Master Biologie Intégrative spécialité Nutrition Qualité Santé (suivi et encadrement des démarches de recherche de stage en entreprise. Interlocuteur privilégié entre le master et l'entreprise. Participation au jury de soutenance). Depuis 2014.
• Tutorat de Doctorants de l'Ecole Doctorale ED394 Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique. Depuis 2017.

Evaluation d'articles (reviewer) dans des revues internationales de catégorie A

• **Journal of Cellular Physiology** (Wiley Online Library, Hoboken USA Online ISSN: 1097-4652)
• **Journal of Cell Science** (The company of Biologist, Cambridge UK ISSN 1477-9137)
• **Arthritis and Rheumatology** (American College of Rheumatology/Wiley Online Library , USA ISSN: 2326-5205)

Liste des Publications

Art#18. Vallin B, Legueux-Cajgfinger Y, Clément N, Glorian M, Duca L, Vincent P*, Limon I* and **Blaise R***. Novel short isoforms of adenylyl cyclase as negative regulators of cAMP production. Biochim Biophys Acta (Mol Cell Research). 2018 Sep;1865(9):1326-1340
* *co-last authors.*

Art#17. Hur J, Mateo V, Babiak M, Béréziat G, Kanoni-Truc C, Clerc T, **Blaise R*** and Limon I*. A DHA-enriched diet reduces cerebrovascular β-amyloid deposition and associated microhaemorrages in Tg2576-Alzheimer mouse model. FASEB J. 2018 Sep;32(9):4972-4983
* *co-last authors.*

Art#16. Gueguen M, Vallin B, Glorian M, **Blaise R**, Limon I. Adénylyl cyclases et transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires: rôle dans le remodelage vasculaire pathologique. Biol Aujourdhui. 2016;210(3):153-166.

Art#15. Hur JC, **Blaise R**, Limon I. Protocol for Isolating the Mouse Circle of Willis. J Vis Exp. 2016 Oct 22;(116).

Art#14. Blirando K, **Blaise R**, Gorodnaya N, Tanaka I, Rouxel C, Meilhac O, Vincent P and Limon I. The stellate vascular smooth muscle cell phenotype is induced by IL-1β via the secretion of PGE2 and subsequent cAMP-dependent protein kinase A activation.
Biochim Biophys Acta (Mol Cell Research). 2015 Dec;1853(12):3235-47

Art#13. Lipskaia L., Keuylian Z., Blirando K., Mougenot N., Jacquet A., Rouxel C., Sghairi H., Elaib Z., **Blaise R**., Adnot S., Hajjar R.J., Chemaly E.R., Limon I. and Bobe R. Expression of sarco (endo) plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) system in normal mouse cardiovascular tissues, heart failure and atherosclerosis.
Biochim Biophys Acta (Mol Cell Research). 2014 Aug 7;1843(11):2705-2718

Art#12. Lompré AM, Hadri L, Merlet E, Keuylian Z, Mougenot N, Karakikes I, Chen J, Atassi F, Marchand A, **Blaise R**, Limon I, McPhee S, Samulski RJ, Hajjar RJ and Lipskaia L. Efficient transduction of vascular smooth muscle cells with a translational AAV2.5 vector: a new perspective for in-stent restenosis gene therapy.
Gene Ther, 2013 Sep;20(9):901-12

Art#11. Vromman A, Trabelsi N, Rouxel C, Béréziat G, Limon I and **Blaise R**. β-amyloid context intensifies vascular smooth muscle cells induced-inflammatory response and de-differentiation.
Aging Cell. 2013 Jun;12(3):358-69. [Epub ahead of print]

Art#10. Keuylian Z, de Baaij J, Glorian M, Rouxel C, Merlet E, Lipskaia L, **Blaise R**, Mateo V and Limon I. Implication of the Notch pathway in the regulation of Adenlyl Cyclase 8 expression marking vascular smooth muscle cell trans-differentiation.
J Biol Chem. 2012 Jul 20;287(30):24978-89.

Art#09. **Blaise R,** Mateo V, Rouxel C, Zaccarini F, Glorian M, Béréziat G, Golubkov VS, Limon I. Wild-type amyloid beta 1-40 peptide induces vascular smooth muscle cell death independently from matrix metalloprotease activity.
Aging Cell. 2012 Jun;11(3):384-93

Art#08. Crassous P.A., **Blaise R.**, Marquette A., Snapir A., Paris H., Scheinin M., Paris H., Schaak S., Identification of a novel 12-nucleotide insertion polymorphism in the promoter region of ADRA2B : full-linkage with the 9-nucleotide deletion in the coding region and influence on transcriptional activity.
Biochem Pharmacol. 2010 Feb 1;79(3):407-12.

Art#07. **Blaise R**., Mahjoub M., Salvat C., Brou C., Corvol M., Savouret J.F., Rannou F., Berenbaum F., Bausero P. Involvement of the notch pathway in the regulation of matrix metalloproteinase 13 and the dedifferentiation of articular chondrocytes in murine cartilage.
Arthritis Rheum. 2009 Feb;60(2):428-39.

Art#06. Clément N, Gueguen M, Glorian M, **Blaise R**, Andréani M, Brou C, Bausero P, Limon I. Notch3 and IL-1beta exert opposing effects on a vascular smooth muscle cell inflammatory pathway in which NF-kappaB drives crosstalk.
J Cell Sci. 2007 Oct 1;120 :3352-61.

Art#05. Bonnin M.A, Laclef C., **Blaise R**., Eloy-Trinquet S., Relaix F., Pascal Maire P. and Duprez D. Six1 is not involved in limb tendon development, but is expressed in limb connective tissue under Shh regulation.
Mech Dev. 2005 Apr;122(4):573-85.

Art#04. **Blaise R.**, Guillaudeux T., Tavernier G., Daegelen D., Evrard B., Merial A., Holm C., Jegou B. and Langin D. Testis hormone-sensitive lipase expression in spermatids is governed by a short promoter in transgenic mice.
J Biol Chem. 2001;276(7):5109-5115.

Art#03. **Blaise R.**, Grober J., Rouet P., Tavernier G., Daegelen D. and Langin D. Testis expression of hormone-sensitive lipase is conferred by a specific promoter that contains four regions binding testicular nuclear proteins.
J Biol Chem. 1999;274(14):9327-34.

Art#02. Grober J., Laurell H., **Blaise R.**, Fabry B., Schaak S., Holm C. and Langin D. Characterization of the promoter of human adipocyte hormone sensitive lipase.
Biochem J. 1997; 328 (Pt2): 453-61.

Art#01. Schaak S., Cayla C. **Blaise R.**, Quinchon F. and Paris H. Two human models to study alpha-2 adrenergic receptors of the alpha-2 subtype.
J Pharmacol Exp Ther. 1997; 281(2):983-91.

LISTE DES PUBLICATIONS NATIONALES ET REVUES

Blaise R. Le protocole d'Edmonton : nouvelle approche thérapeutique du diabète insulinodépendant.
Bio-Futur N°211, Mai 2001 p15.

Langin D., Lucas S. et **Blaise R**. Que nous apprend le knock-out de la LHS? Médecine & Science, 2000.

Principales Communications en congrès à comité de sélection

PRINCIPALES COMMUNICATIONS EN CONGRES A COMITE DE SELECTION

Blaise R., et Coll. Cerebrovascular β-amyloid deposition and associated microhemorrhages in a Tg2576 Alzheimer mouse model are reduced with a DHA-enriched diet. XXVIth national meeting of SFBMEc Société Française de Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMEc). Reims, 15-17 Mai 2019 (communication affichée)

Blaise R., et Coll. The newly identified Adenylyl Cyclases 8E inhibit cAMP production within trans-differentiated vascular smooth muscle cells – Potential implication in pathological vascular remodeling.
VIIth Biosensor Group Meeting. Toulouse 01-02 juin 2017. (Communication orale).

Blaise R., et Coll. Identification of a new adenylyl cyclase 8 isoform. Implication in Vascular Smooth muscle Cells transdifferentiation and in pathological vascular remodeling. XI^{ème} Congrès de la Société Française de Cardiologie (SFC), Centre des congrès de Dijon, 07-08 avril 2016. (Communication orale).

Blaise R., et Coll. Vascular Smooth muscle cells phenotypic modification and inflammatory responses induced by Wild-type Amyloid Beta 1-40. New Frontiers in Basic Cardiovascular Research 2012, 10th Meeting. 12-15 juin 2012. Hradec Králové, Czech Republic. (Communication orale et affichée).

Blaise R., et Coll. Wild-type Amyloid Beta 1-40 peptide induces Vascular Smooth Muscle Cells Death independently of MMP-2 and MT1-MMP activation. VI^{ème} Congrès de la Société Française de Cardiologie (SFC), Centre des congrès de Lyon, 12-14 mai 2011. (Communication orale et affichée).

Blaise R. et Coll. Notch pathway is involved in phenotypic modulation in-vitro of chondrocyte through regulation of MMP13 expression. The Notch Meeting 23-27 septembre 2007, Athènes, Grèce. (Communication affichée)

Blaise R. et Coll. Notch pathway in chondrocyte dedifferentiation. 2ème journée ProA INSERM, 25 Janvier 2007, Institut Curie, Paris. (Communication orale)

R.Blaise et Coll. Constitutive activation of NF-kB leads to activation and survival of human primary T cells. Journées de Biologie Cellulaire et infection. 7-8 Avril 2005. Institut Pasteur, Paris. (Communication orale)

Blaise R. et Coll. Study of the regulation of Six1 expression during muscle development. Molecular Biology of Muscle Development and Disease Meeting. 21-26 Mai 2000, Péninsule de Monterey, Californie, Etats-Unis. (Communication affichée).

Blaise R. et Coll. Characterization of a testis specific promoter of human hormone-sensitive lipase. 26th FEBS (The Federation of European Biochemical Societies) meeting; 19-24 juin 1999, Nice, France. Prix de la société française de Biochimie et de Biologie Moléculaire. (Communication affichée)

Blaise R. et Coll. Testis-specific expression of hormone-sensitive lipase. 25th Silver Jubilee FEBS (The Federation of European Biochemical Societies) meeting; 5-10 Juillet 1998, Copenhague, Danemark. (Communication affichée)

Séminaires et conférences donnés aux cours des dernières années

14 Mars 2014 : **Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), Toulouse**. Altérations phénotypiques et réponse inflammatoire des cellules musculaires lisses vasculaires par le peptide amyloïde Aβ1-40. Conférencier invité.

19 Novembre 2012 **: IRPF - Pierre Fabre Innovation, Toulouse**. "Impact des acides gras sur les changements phénotypiques que subissent les cellules pariétales au cours du développement de la maladie d'Alzheimer et des pathologies apparentées".

17 Septembre 2012 : Conférencier invité par le Département de Biologie de la **Faculté de Médecine, Université Masaryk, Brno, République Tchèque.** « Molecular Mechanisms of vascular smooth muscle cell Alterations in Cerebral Amyloid Angiopathy »

21 Février 2012 : **UMR-8256 Adaptation Biologique et Vieillissement. Université Paris 6**, **Paris**. "Angiopathies amyloïdes cérébrales: Effets du peptide amyloïde $A\beta_{1-40}$ sur les cellules musculaire lisses et cellules endothéliales"

21 Février 2012 : **UR4, Vieillissement, Stress et inflammation. Université Paris 6**, **Paris**."Angiopathies amyloïdes cérébrales: Effets du peptide amyloïde $A\beta_{1-40}$ sur les cellules musculaire lisses et cellules endothéliales"

1er Décembre 2011 : **UMR S702 "Remodelage et réparation du tissu rénal", Hôpital Tenon, Paris**. "Angiopathies amyloïdes cérébrales: Effets du peptide amyloïde $A\beta_{1-40}$ sur les cellules musculaire lisses et cellules endothéliales". Conférencier invité.

2 Mars 2011 : **IRPF - Pierre Fabre Innovation, Toulouse.** "Impact des acides gras sur les changements phénotypiques que subissent les cellules pariétales au cours du développement de la maladie d'Alzheimer et des pathologies apparentées"

9 Février 2011 : **Institut des Maladies Neuro-dégénératives IMN (UMR 5293), Talence.** "Deciphering Amyloid Beta-induced cell death in Vascular Smooth Muscle Cells". Conférencier invité.

23 Juin 2010 : **UMR S956 Génétique Pharmacologie et Physiopathologie des Maladies Cardiovasculaires, Faculté de médecine Pitié Salpetrière, Paris.** "Angiopathies amyloïdes cérébrales: Effets du peptide amyloïde $A\beta_{1-40}$ sur les cellules musculaire lisses et cellules endothéliales"

25 Mai 2010 : **UR4, Vieillissement, Stress et inflammation. UPMC, Paris.** "Effet des acides gras oméga-3 sur le changement phénotypique que subissent les cellules pariétales au cours de la maladie d'Alzheimer et des pathologies apparentées"

28 Octobre 2010 : **Institut de la Mémoire et de la Maladie d'Alzheimer, GH Pitié Salpêtrière, Paris.** "Deciphering molecular mechanisms of Amyloid Beta-induced cell death in Vascular Smooth Muscle Cells.

Formation à la recherche

Encadrement d'étudiants en Master 2ème année et en thèse (*) dans le laboratoire actuel et co-signature de publications.

8. Emilie Wong Chong , Stagiaire Master B.I.P 2ème année (Sorbonne Université) de janvier à juin 2019.
« L'adenylyl Cyclase E : une nouvelle cible thérapeutique dans l'athérosclérose ».

7. Eda Selam , Stagiaire Master B.I.P 2ème année (Sorbonne Université) de janvier à juin 2018.
« Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'expression et l'épissage alternatif de l'adénylyl cyclase 8 dans les cellules musculaires lisses vasculaires trans-différenciées »

6. Yohan Legueux-Cajgfinger (*), Stagiaire Master B.I.P 2ème année (UPMC) de janvier à juin 2017.
« L'adénylyl cyclase 8 : caractérisation de son expression et de ses isoformes dans les cellules musculaires lisses vasculaires trans-différenciées » Co-encadrement de Thèse (2017-2020).

5. Justine Hur (*), Stagiaire Master B.I.P 2ème année (UPMC) de janvier à juin 2014.
« Altérations vasculaires dans la maladie d'Alzheimer et les angiopathies amyloïdes cérébrales : rôle de l'inflammation ». Co-directeur de Thèse (2014-2017).

4. Benjamin Vallin (*), Stagiaire Master B.I.P 2ème année (UPMC) de janvier à juin 2013.
Co-direction de thèse (2013-2017).
« L'adénylyl cyclase 8 : caractérisation de son expression et de ses isoformes dans les cellules musculaires lisses vasculaires trans-différenciées ». Co-directeur de Thèse (2013-2017)

3. Nesrine Trabelsi, Stagiaire Master B.I.P 2ème année (UPMC) de janvier à juin 2012.
« Etude de la réponse inflammatoire des cellules endothéliales induite par le peptide amyloïde Aβ1-40 et son impact sur les cellules musculaires lisses vasculaires. »

2. Amélie Vromman (*), Stagiaire Master B.I.P 2ème année (UPMC) janvier-juin 2011.
« Effets des acides gras ω-3 sur l'acquisition d'un phénotype inflammatoire par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses exposées au peptide $A\beta_{1-40}$ ». Co-encadrement de Thèse (2011-2014) sur la partie Angiopathies Amyloïdes Cérébrales.

1. Jeroen de Baaj, Stagiaire Master B.I.P 2ème année (UPMC) co-encadrement janvier-juin 2010.
« Regulation of Adenylyl Cyclase 8 Expression in Pathological Vascular Smooth Muscle Cell Trans-Differentiation ».

Publications co-signées avec les étudiants sur les travaux cites ci-dessus:

Vallin B, **Legueux-Cajgfinger Y**, Clément N, Glorian M, Duca L, Vincent P*, Limon I* and **Blaise R***. Novel

short isoforms of adenylyl cyclase as negative regulators of cAMP production. Biochim Biophys Acta Mol Cell Research. 2018 Sep; 1865(9):1326-1340. * *co-last authors.*

Hur JC, Mateo V, Babiak M, Béréziat G, Kanoni-Truc C, Clerc T, **Blaise R*** and Limon I*. A DHA-enriched diet reduces cerebrovascular β-amyloid deposition and associated microhaemorrages in Tg2576-Alzheimer mouse model. FASEB J. 2018 Sep; 32(9):4972-4983. * *co-last authors.*

Hur JC, **Blaise R**, Limon I. Protocol for Isolating the Mouse Circle of Willis. J Vis Exp. 2016 Oct 22;(116).

Gueguen M, **Vallin B**, Glorian M, **Blaise R**, Limon I. Adénylyl cyclases et transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires: rôle dans le remodelage vasculaire pathologique. Biol Aujourdhui. 2016;210(3):153-166.

Vromman A, **Trabelsi N**, Rouxel C, Béréziat G, Limon I and **Blaise R.** β-amyloid context intensifies vascular smooth muscle cells induced-inflammatory response and de-differentiation. Aging Cell. 2013 Jun;12(3):358-69

Keuylian Z, **de Baaij J**, Glorian M, Rouxel C, Merlet E, Lipskaia L, **Blaise R**, Mateo V and Limon I. Implication of the Notch pathway in the regulation of Adenlyl Cyclase 8 expression marking vascular smooth muscle cell trans-differentiation. J Biol Chem. 2012 Jul 20;287(30):24978-89

Encadrement d'étudiants en Master 1ème année dans le laboratoire actuel.

Mon travail d'encadrement des stagiaires de M1 a consisté en une formation scientifique et technique ainsi qu'à la supervision de la réalisation d'un poster et de la présentation orale associée

4. Saskia Flamand, Stagiaire Master B.I 1ère année (UPMC) mai-juin 2016.
« Modulation de la réponse b-adrénergique des cellules Musculaires Lisses Vasculaires par le peptide amyloïde $A\beta_{1-40}$ ».

3. Marion Millerand, Stagiaire Master B.I 1ère année (UPMC) mai-juin 2015.
« Caractérisation des altérations cérébro-vasculaires dans la maladie d'Alzheimer et les Angiopathies Amyloïdes cérébrales: Rôle des acides gras oméga-3 ».

2. Myrian Batoul Moumni, Stagiaire Master B.I.P 1ère année (UPMC) avril-juin 2014.
« Etude des phosphodiesterases exprimées dans les cellules musculaires lisses vasculaires pathologiques ».

1. François Zaccarini, Stagiaire Master B.I.P 1ère année (UPMC) avril-juin 2010.
« Etude de l'effet des peptides beta-amyloïdes sur le phénotype des CML de la paroi des vaisseaux : modèle d'étude de la composante cérébro-vasculaire de la maladie d'Alzheimer ».

Blaise R, Mateo V, Rouxel C**, Zaccarini F**, Glorian M, Béréziat G, Golubkov VS, Limon I. Wild-type amyloid beta 1-40 peptide induces vascular smooth muscle cell death independently from matrix metalloprotease activity. Aging Cell. 2012 Jun;11(3):384-93

Autres encadrements.

Juliette Brichet, Stagiaire BTS (Ecole Ingénieurs Bio-Industrie) juin-juillet 2016.
Cora Xydas, Stagiaire L2 (I.C.L. Imperial College of London) mars-avril 2012.
Cynthia Julieno, Stagiaire L3. Licence professionnelle Métiers de la biotechnologie (UPMC) nov-déc 2011.

Formation encadrement doctorant.

Management d'un projet doctoral. *(A-Enc2)*
11 et 12 décembre 2018. Institut de Formation Doctorale, Sorbonne Université, Paris.

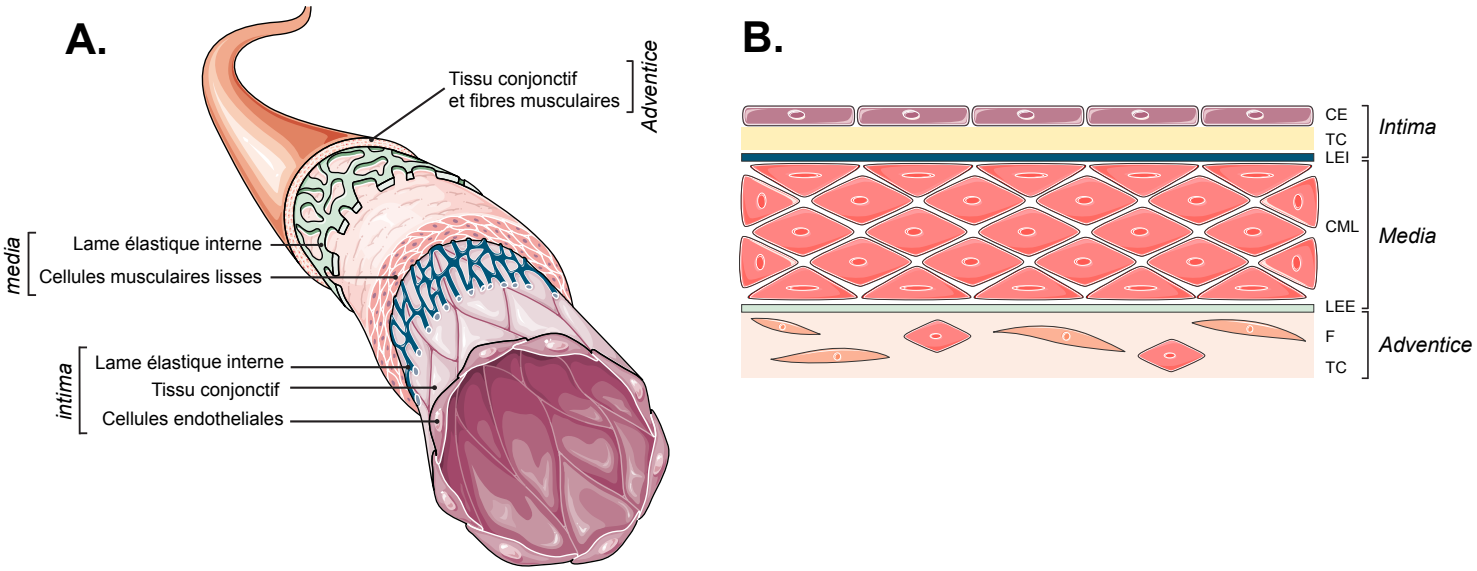

Figure 1. Représentation schématique de la paroi arterielle.

Les artères sont organisées en trois couches concentriques: l'*intima*, constituée d'un endothélium formé de cellules pavimenteuses et d'une couche sous-endothéliale correspondant à un tissu conjonctif lâche; *la média*, composée principalement de cellules musculaires lisses contenues dans une matrice extracellulaire riche en collagène, élastine et protéoglycanes, et *l'adventice*, constituée d'adipocytes, de fibres de collagène et de quelques fibres musculaires lisses. CE, cellules endothéliales; CML, cellules musculaires lisses F, fibroblastes; LEE, lame élastique externe; LEI, lame élastique interne; TC, tissu conjonctif.

Avant-Propos

Les travaux de recherche que j'ai menés suite à ma thèse, se sont concentrés sur l'étude de l'implication de voies de signalisation dans la transition phénotypique que subissent des cellules spécialisées au cours du développement de certaines pathologies. En effet, je me suis intéressé au cours de mes trois derniers stages post-doctoraux, i) à la voie de signalisation NF-κB dans les leucémies et lymphomes (Institut Pasteur) ii) à la voie de signalisation Notch dans la différenciation chondrocytaire au cours de l'arthrose (UPMC, UMR7079), et iii) à l'étude de différentes voies de signalisation dans la transition phénotypique des cellules musculaires lisses dans diverses pathologies vasculaires (UR4 et UMR8256). Recruté en 2013 dans l'équipe du Pr Isabelle Limon en tant que Maître de Conférences, j'ai poursuivi les travaux que j'avais initiés en 2009 dans cette même équipe. L'ensemble de ces travaux menés depuis 2009 va être au cœur de ce manuscrit.

Les cellules musculaires lisses vasculaires ou CMLV, sont au centre de nos thématiques de recherche au sein de l'équipe. Ces cellules sont abondamment présentes dans les artères (élastiques ou musculaires), et dans une moindre mesure dans les artérioles, et constituent la couche médiane de la paroi vasculaire ou *media* (*Figure 1*). Dans la media, les CMLV sont empilées en couches concentriques structurées dans une matrice extracellulaire riche en collagène, élastine et protéoglycanes. Les CMLV assurent la solidité et la tonicité de la paroi vasculaire, notamment au travers de diverses protéines contractiles, comme l'α-actine, la calponine, SM22 (Smooth muscle protein, 22kDa), la smootheline et SM-MHC (Smooth Muscle Myosine Heavy chain). Ces cellules quiescentes et contractiles, sont dotées d'une grande plasticité phénotypique en contexte physiologique ou physiopathologique à l'origine des remodelages vasculaires. Les CMLV quiescentes et contractiles peuvent proliférer, migrer et sécréter des molécules de la matrice extracellulaire, mécanismes indispensables au développement du système vasculaire et à la réparation de lésions, mais également impliqués dans le développement de pathologiques comme l'athérosclérose et ses complications post-opératoires, certains cancer et l'hypertension artérielle [1, 2]. Si les altérations des CMLV sont au centre de la compréhension des mécanismes de mise en place de l'athérosclérose, ces cellules tiennent également un rôle important dans d'autres pathologies. Dans le cas des maladies neurodégénératives où l'inflammation joue un rôle central, cette inflammation affecte également le système cérébro-vasculaire et altère l'intégrité des CMLV conduisant à des épisodes hémorragiques et/ou à des hypoperfusions cérébrales.

Lors de mon arrivée au laboratoire en septembre 2009, j'ai eu la charge de débuter un projet afin d'étudier les altérations vasculaires liées aux peptides β-amyloïdes dans le contexte de la maladie d'Alzheimer (**Projet 1**), une thématique complètement nouvelle dans l'équipe qui se consacrait jusqu'alors exclusivement à l'athérosclérose. A partir de 2013, tout en poursuivant cette étude sur la maladie d'Alzheimer, je me suis intéressé à l'adénylyl cylase 8 (AC8) sur laquelle travaillait l'équipe depuis plusieurs années dans le cadre de l'athérosclérose, et j'ai pu mettre en évidence que l'AC8 exprimée dans les CMLV était différente de celle décrite dans la littérature

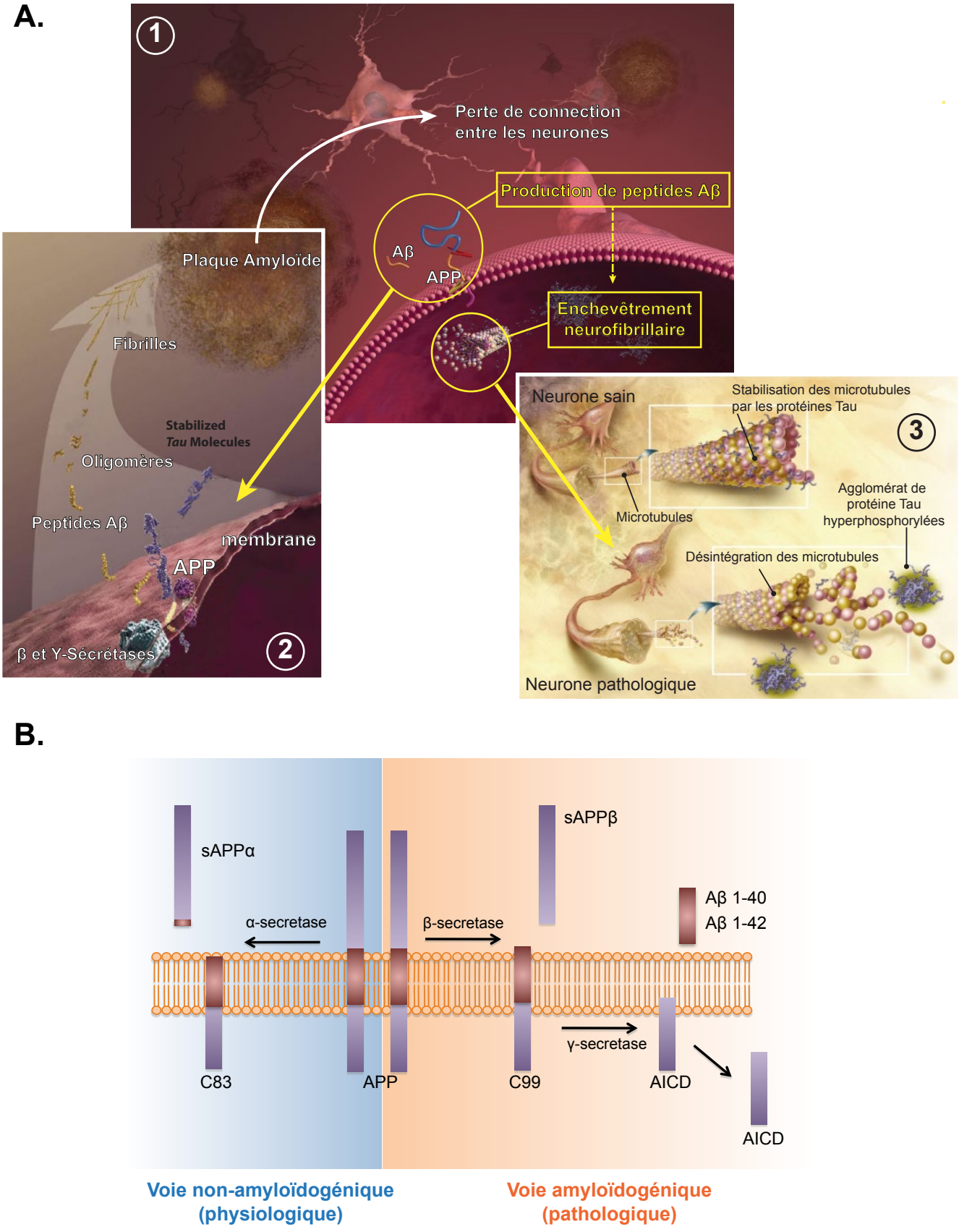

Figure 2. Pathogenèse de la maladie d'Alzheimer

A. 1). Evènements moléculaires et cellulaires à l'origine de la maladie d'Alzheimer. 2). Production des peptides amyloïdes à partir de la protéine APP (pour détails, voir figure 1B). 3). Mécanismes de dégénérescence neurofibrillaire associée à l'hyperphosphorylation de Tau.

B. La protéine APP est une protéine transmembranaire de 770 aa qui peut subir une série de clivages protéolytiques par diverses sécrétases. Quand APP est clivée par l'α-sécrétase en position 687 au milieu du domaine β-amyloïde, la protéine sAPPα, non pathogénique et impliquée dans la plasticité et la protection neuronale, va être générée. Lorsque APP est clivée par la β-sécrétase en position 671, la protéine transmembranaire ainsi générée (C99) va subir un deuxième clivage protéolytique par la γ-sécrétase, en position 711 ou 713, générant ainsi les peptides amyloïdes de 40 ($A\beta_{1-40}$) et de 42 ($A\beta_{1-42}$) acides aminés respectivement. Ces peptides neurotoxiques vont s'oligomériser puis s'agréger sous forme de fibrilles, principaux constituants de la plaque amyloïde.

(**Projet 2**). A partir de ce moment, j'ai mené deux projets de recherche en parallèle dont les principaux résultats sont présentés dans ce manuscrit.

Afin de faciliter la lecture, les résultats présentés dans ce manuscrit sont illustrés par des figures synthétiques « (*Figure X*) » en vis à vis du texte, présentant les résultats majeurs, mais font parfois également référence à des résultats plus complets présentés dans les quatre articles en annexe, qui seront appelés dans le texte sous la forme «(*Article X, Figure Y*) ».

Projet 1 : « Maladie d'Alzheimer et Altérations Vasculaires ».

1. Introduction

1.1. Contexte et problématique.

Découverte au début du XX^{ème} siècle par le psychiatre Alois Alzheimer qui lui donnera son nom (Allgemeine Zeitschrift fur Psyciatrie und Psychisch-Gerichtliche Medizin 64, 3, 1907) article traduit [3], la maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative, altérant les capacités cognitives au-delà de ce qui est imputable à un vieillissement naturel. D'un point de vue histopathologique, la maladie d'Alzheimer se caractérise par la présence de plaques amyloïdes ou « plaques séniles » constituées principalement de peptides beta-amyloïdes (Aβ) et d'un enchevêtrement intracellulaire de neurofibrilles (NFT pour *NeuroFibrillary Tangles*), constituées de protéines « tau » hyperphosphorylées (*Figure 2A*).

Le postulat de l'hypothèse amyloïde

Les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables de la maladie d'Alzheimer ont été identifiés dans les années 80 [4, 5] et ont donné naissance à l'hypothèse de la « cascade amyloïde » exposée par D.J Selkoe [6], proposant un enchainement d'évènements pathogéniques (*Figure 3*) conduisant au développement de la maladie d'Alzheimer [7]. Cette hypothèse met en avant l'accumulation de peptides amyloïdes Aβ, générés par clivages protéolytiques de la protéine APP (*Figure 2B*). Cette accumulation de peptides Aβ peut être la conséquence d'une altération de leur clairance (formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer) ou la conséquence de mutations, soit dans le gène APP, soit dans les gènes codant les enzymes impliquées dans le clivages de APP (formes génétiques de la maladie d'Alzheimer). Dans « l'hypothèse amyloïde », cette accumulation de peptide amyloïde est considérée comme étant à l'origine des dégénérescences neuronales et synaptiques, de la neuro-inflammation et de l'enchevêtrement neurofibrillaire, conduisant à la démence.

Cette hypothèse amyloïde est à l'origine de diverses stratégies immuno-thérapeutiques actives et passives, visant à empêcher la production ou l'oligomérisation des peptides Aβ ou des protéines tau hyperphosphorylées (voir revue [8]).

Au début des années 2000, une première immunothérapie chez l'homme (essai AN1792 phase I et II) a permis de diminuer la charge amyloïde et l'hyperphosphorylation de Tau [9, 10], mais avec peu ou pas d'amélioration des fonctions cognitives sur le court ou long terme [11, 12], parfois

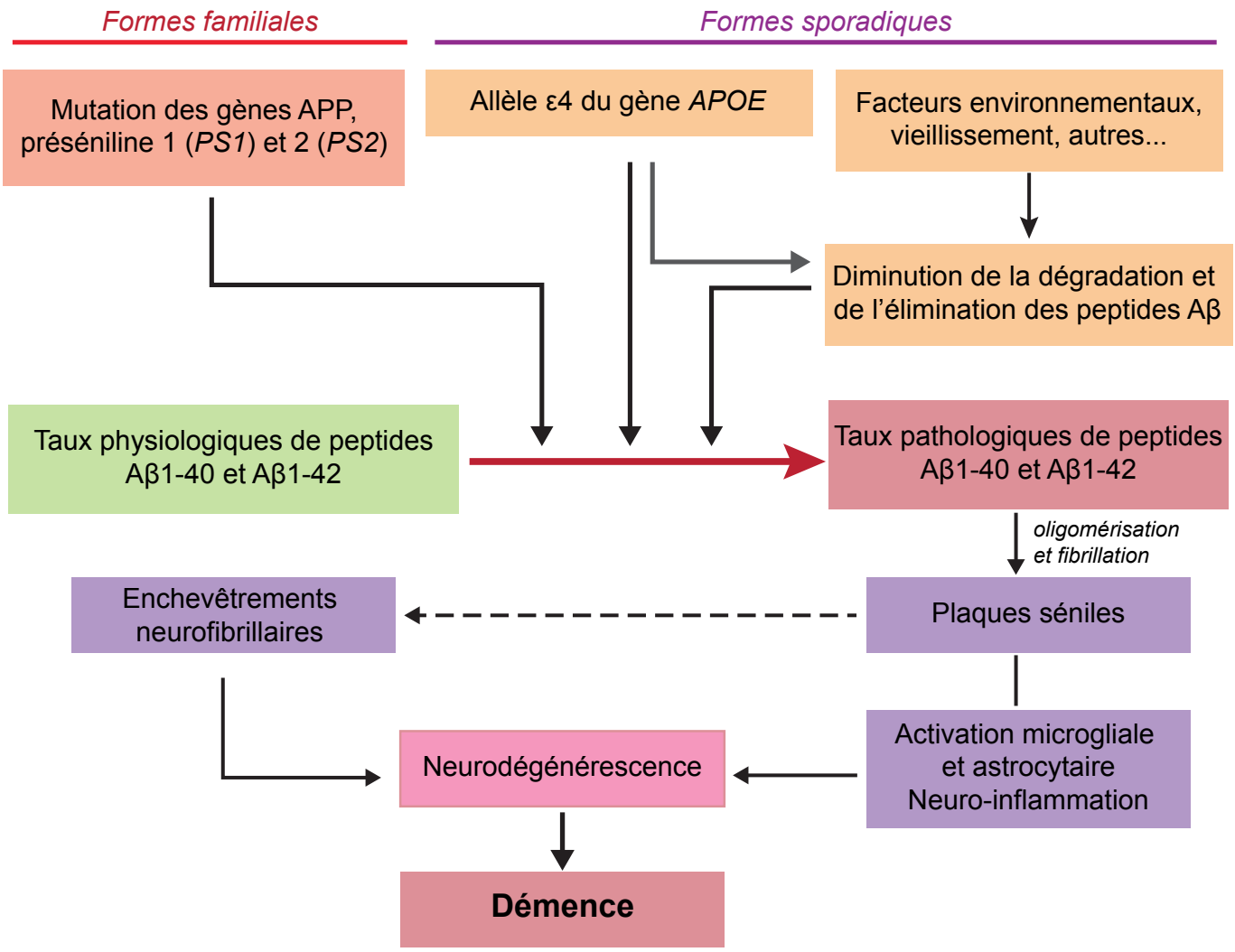

Figure 3. L'hypothèse amyloïde, postulat de la genèse de la maladie d'Alzheimer.

Selon la théorie amyloïde défendue par D.J Selkoe, la maladie d'Alzheimer se développerait suite à une accumulation de peptides amyloïdes Aβ, conséquence d'une altération dans la production et/ou la dégradation de ces peptides, d'origine familiale ou sporadique. Ces peptides vont s'oligomériser et fibriller pour donner naissance aux plaques séniles, conduisat à une activation microgliale et astrocytaire à l'origine de la neuro-inflammation. Cette neuro-inflammation, associée aux enchevêtrements neurofibrillaires va induire une neurodégénérescence, responsable de la démence.

associée au développement de méningo-encéphalites. Si ces premiers essais se sont avérés peu concluants, de nouveaux essais ciblant les formes solubles des peptides Aβ et les protéines tau sont encore développés. En 2017, la « Alzheimer's Drug Discovery Fundation » (ADDF) a publié un rapport sur les 126 essais cliniques en cours, révélant que sur les 25 essais en phase III, quatorze ciblaient les protéines Aβ ou tau (56%), trois l'inflammation (12%), quatre l'activité synaptique et les neurotransmetteurs (16%), trois les fonctions métaboliques et mitochondriales et seulement deux ciblaient les vaisseaux (8%).
Ce rapport révèle également que la recherche sur la maladie d'Alzheimer s'oriente encore aujourd'hui vers la découverte d'une thérapie « unique » alors que sa complexité et son étiologie suggèrent d'envisager une combinatoire de cibles.

Vers une nouvelle compréhension de la maladie d'Alzheimer pour appréhender de nouvelles cibles thérapeutiques.

Si les processus biologiques associés à la formation des plaques amyloïdes et de la dégénérescence neurofibrillaire ont fait l'objet d'une multitude de publications, les dysfonctionnements qui en sont à l'origine demeurent peu étudiés.

Il est aujourd'hui évident que la maladie d'Alzheimer est une pathologie complexe impliquant divers mécanismes pathogéniques distincts et interconnectés. Un nouveau concept de stratégie thérapeutique multi-cibles émerge depuis quelques années, suggérant des multi-thérapies ciblant à la fois des dysfonctionnements communs au vieillissement et à la maladie d'Alzheimer comme l'inflammation, l'autophagie et le métabolisme amyloïde, les altérations mitochondriales et métaboliques, les dysfonctionnements synaptiques, l'épigénétique ainsi que les altérations vasculaires [13, 14].
Comme le souligne très pertinemment Sidney Strickland dans une récente revue [15] « (…) *une meilleure compréhension de la MA nécessite une reconceptualisation de la pathologie comme un amalgame de plusieurs dysfonctionnements plutôt qu'une seule maladie* ». Comme l'argumente Strickland, parmi ces dysfonctionnements, les dérégulations vasculaires ont été très largement sous-estimées, alors que de nombreuses études associent les dérégulations vasculaires avec le déclin de fonction cognitives [16]. Si on part du postulat que la maladie d'Alzheimer est un dysfonctionnement neuronal conduisant à des altérations cognitives, ce schéma peut être accéléré par de nombreux autres dysfonctionnements. Les plus sceptiques argumenteront sur le fait que ces dysfonctionnements ne sont pas des causes mais des conséquences de la maladie d'Alzheimer. Cependant, la chronologie de ces altérations précède pour beaucoup l'apparition des signes caractéristiques de la maladie.

1.2. Neuro-inflammation dans la maladie d'Alzheimer et cibles thérapeutiques

De nombreuses études *post-mortem* de cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer et de modèles de souris transgéniques ont révélé l'existence d'une inflammation chronique. Si l'inflammation aigue est un mécanisme protecteur, le déséquilibre entre médiateurs

pro- et anti-inflammatoires conduit à la mise en place d'une neuro-inflammation chronique, caractérisée par une activation de la microglie et des astrocytes et la production accrue de médiateurs de l'inflammation neurotoxiques [17]. Les mécanismes de la neuro-inflammations liés aux peptides Aβ sont nombreux et complexes, on citera les études suivantes qui démontrent que :

- Les cellules microgliales activées par les peptides Aβ [18–20] déclenchent la libération de molécules inflammatoires directement toxiques pour les neurones, incluant l'oxyde nitrique (NO) associé à l'anion superoxyde [21], les espèces réactives de l'oxygène [22], le facteur de nécrose tumorale α (TNF-α) [23], l'IL-1β [24], les protéines du complément [25] et la cathepsine B [26].
- Les cellules microgliales activées, recrutent des astrocytes promouvant la réponse inflammatoire initiée par les dépôts de peptides Aβ, entrainant une réponse inflammatoire aigüe associée à la sur-activation de systèmes enzymatiques inflammatoires tels que la iNOS [27], la cyclooxygénase-2 (COX2) et la prostaglandine E2 (PGE2) [28] et au recrutement de cellules immunitaires [29, 30]. Tous ces facteurs pouvant contribuer au dysfonctionnement neuronal, à la toxicité microgliale et à la mort cellulaire, seuls ou de concert.
- De nombreuses cytokines telles que l'IL-1β, le TNFα seul ou combiné à l'IFNγ favorisent la production de peptides Aβ en modulant l'activité de la γ-sécrétase dans les neurones [31, 32] ou en augmentation les niveaux endogènes de BACE1 (enzyme-1 de clivage du site- β de APP, enzyme centrale du complexe β-sécrétase) [33].

L'inflammation a donc été proposée soit comme « moteur de la maladie d'Alzheimer », soit du moins comme « troisième composante importante de la maladie », après les dépôts amyloïdes et les tauopathies [29] et constitue aujourd'hui une des principales cibles thérapeutiques.

Il est clairement établi que la neuro-inflammation chronique est dépendante de la production de prostaglandines [34]. En conséquence, les stratégies d'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) se sont focalisées notamment sur des inhibiteurs de COX2, afin de réduire la production de PGE2 [35, 36]. Cependant de très nombreuses études ont révélé l'absence ou de faibles bénéfices liés à l'utilisation d'AINS [34, 37–40] et parfois même des effets secondaires très importants [41].

D'une façon générale, il est aujourd'hui admis que l'utilisation de molécules thérapeutiques à cibles uniques (anti-inflammatoires ou autres) n'est plus pertinent et de très nombreux laboratoires développent des ligands à cibles multiples (multi-target directed ligands ou MTDL) permettant à la fois de cibler les mécanismes propres à la maladie d'Alzheimer (dépôts amyloïdes et dégénérescence neurofibrillaire), mais aussi de cibler simultanément d'autres mécanismes pathologiques qui lui sont associés [42], parmi lesquels l'inflammation [43].
Le peu d'efficacité des ANSI suggère donc de cibler d'autres acteurs de l'inflammation cérébrale et comme Farooqui et ses collaborateurs l'ont souligné : « *pour le traitement de la neuro-inflammation, il faut regarder au-delà du traitement avec des anti-inflammatoires habituels* » [44].
Parmi ces autres anti-inflammatoires, on trouve les médiateurs lipidiques pro-résolutifs spécialisés ou SPM (voir chapitre 1.4 sur les PUFA).

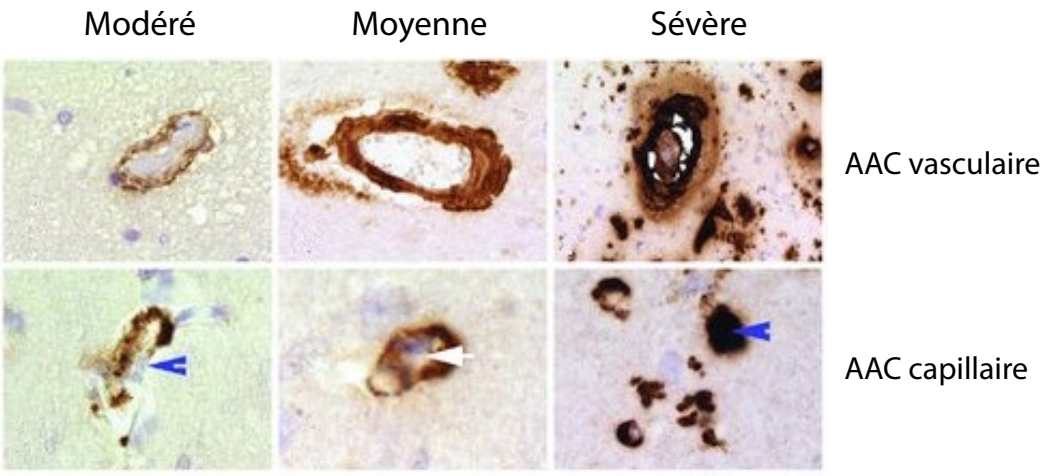

Figure 4. Les différents types d'Angiopathies Amyloïdes Cérébrales (AAC)

a-c. AAC de type-2 affectant les artères cérébrales. **d-f**. AAC de type-1 affectant les capillaires cérébraux. Dépôts modérés à sévères. (Histopathology of cerebral microbleeds, Sebastian Brandner, Cambridge Univerity Press)

1.3. Altérations vasculaires et maladie d'Alzheimer.

1.3.1. Généralités

De récentes études basées sur l'autopsie de patients Alzheimer ont révélé que les altérations vasculaires sont très fréquentes et corrèlent avec les altérations cognitives [45, 46]. La maladie d'Alzheimer est généralement associée dans plus de 80% des cas à une angiopathie amyloïde cérébrale (AAC) qui se caractérise par des dépôts de peptides β-amyloïdes dans la paroi des vaisseaux cérébraux de petits et moyens calibres avec une atteinte préférentielle des artères leptoméningées et corticales, ainsi que des capillaires [47]. On distingue deux principales formes d'AAC (*Figure 4*): une AAC dite « capillaire » conséquence d'une accumulation de peptides Aβ autour des capillaires cérébraux et une AAC dite « vasculaire » qui se distingue par des dépôts de peptides Aβ au sein de la paroi des grosses et moyennes artères, localisés plus particulièrement dans la média. Ces dépôts conduisent à une altération de l'intégrité de la paroi due à une dégénérescence des cellules pariétales et plus particulièrement des CMLV [48], ayant pour conséquence une modification du flux sanguins (hypoperfusion), des accidents vasculaires de type micro-hémorragiques tous deux impliqués dans l'altération des fonctions cognitives [49, 50]. Ces deux types d'AAC se distinguent également par la composition des dépôts amyloïdes. En effet, si les dépôts amyloïdes parenchymateux ainsi que ceux présents au niveau des capillaires cérébraux sont principalement constitués de peptides Aβ de 42 acides aminés ($A\beta_{1-42}$), les dépôts retrouvés dans les AAC vasculaire concernent principalement des peptides Aβ de 40 acides amines ($A\beta_{1-40}$) [51].

Ces AAC, bien que très fréquemment associées à la maladie d'Alzheimer (chez 50 à 80% des patients, la fréquence augmentant avec l'âge et l'avancement de la maladie), se retrouvent également chez 10 à 50% des personnes âgées, sans maladie d'Alzheimer associée [52].

Effets des peptides amyloïdes sur les cellules de la paroi vasculaire.

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* se sont intéressées aux effets des peptides amyloïdes Aβ sur les cellules de la paroi vasculaire : les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires.

Au niveau des cellules endothéliales, les peptides Aβ peuvent induire des modifications morphologiques et se révèlent toxiques *in vitro* [53, 54], augmentant leur perméabilité [55], induisant la sécrétion de médiateurs inflammatoires [56, 57] et l'expression de molécules d'adhésion, favorisant ainsi l'infiltration de monocytes/macrophages [58, 59] et affectant globalement la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique [60].

Au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires, les peptides Aβ induisent une dégénérescence des cellules associée à une perte d'adhérence [61] ainsi qu'une apoptose dépendante des caspases 8 et 9 [62]. Les travaux de Suo ainsi que d'autres ont suggéré un rôle central des peptides Aβ sur la réponse inflammatoire des cellules vasculaires, initiée par les cellules endothéliales et affectant les cellules musculaires lisses vasculaires [56, 57].

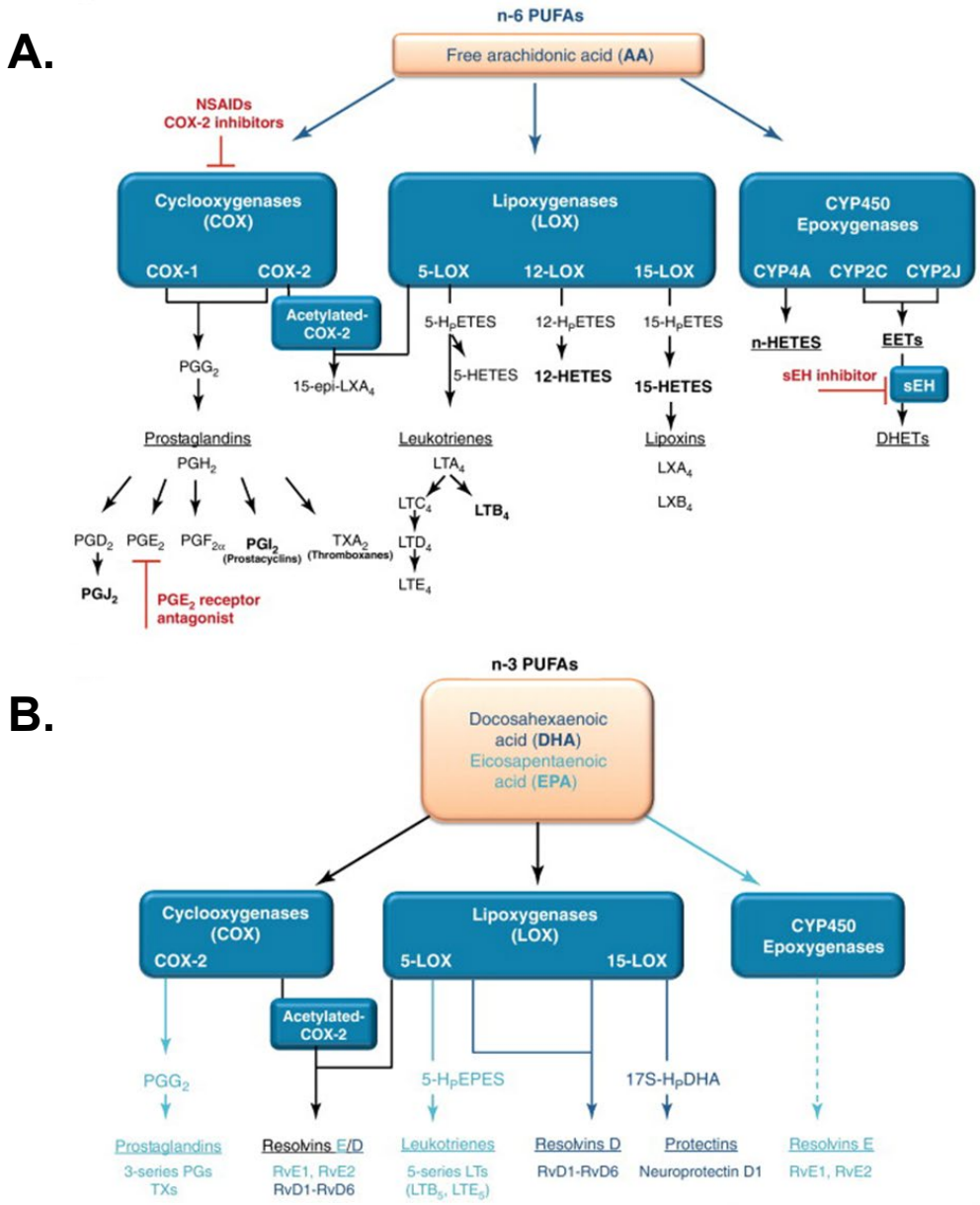

Figure 5. Médiateurs lipidiques de l'inflammation

A. Médiateurs lipidiques de l'inflammation dérivés de l'acide arachidonique (AA) générés par l'action des cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenass. Ces dérivés sont généralement pro-inflammatoires à l'exception des lipoxines. **B.** Médiateurs résolutifs de l'inflammation dérivés du DHA et de l'EPA sous l'action des cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenase CYP450. Ces dérivés sont généralement anti-inflammatoires.

Walter Wahli et Liliane Michalik, Trends in Endocrinology abd Metabolism, 23(7), 2012.

1.3.2. Inflammation et AAC.

Vers la fin des années 90, il a été proposé que la dégénérescence du système cérébro-vasculaire et les hémorragies qui en découlent, pourraient être induites par l'inflammation du système vasculaire. Cette hypothèse s'appuie sur plusieurs observations :

- La présence de monocytes/macrophages qui co-localisent avec les dépôts amyloïdes artériels de la forme familiale Dutch d'angiopathie amyloïde cérébrale [63].
- Dans les AAC sporadiques, les dépôts amyloïdes cérébro-vasculaires sont associés à un recrutement ou à une activation accrue des cellules monocytaires/macrophagiques [64].
- Plus récemment, des données obtenues dans des modèles murins et chez des patients suggéraient une rôle critique des interactions entre les cellules endothéliales, les macrophages et les lymphocytes T $CD4^+$ dans la modulation des dépôt cérébro-vasculaires de peptides Aβ et dans le développement de l'AAC [65, 66].
- *In vitro*, les peptides Aβ induisent l'expression de CD40, favorise l'interaction CD40/CD40-Ligand (CD40-L), augmentent la sécrétion d'IL1β et d'interféron-gamma par les cellules endothéliales vasculaires [56], suggérant que les peptides Aβ fonctionnent également comme des stimulateurs inflammatoires directs sur les cellules pariétales vasculaires, bien que des cytokines pro-inflammatoires puissent être produites par les cellules T et les macrophages recrutés.

1.4. Les médiateurs lipidiques, acteurs clés de l'inflammation

Il est établi depuis longtemps que les acides gras de type Ω3 et Ω6 (acides gras poly-insaturés ou PUFA) possèdent des effets antagonistes sur l'inflammation. Ces effets pro- et anti-inflammatoires sont le fait de métabolites dérivés de ces PUFA (*Figure 5*), et principalement de l'acide arachidonique (PUFA-Ω3 C20:4 (n-6)) et des PUFA-Ω6 : l'acide eicosapentaénoïque (EPA C20:5 (n-3)) et de l'acide docosahexaénoïque (DHA C22:6 (n-3)).

Les médiateurs lipidiques pro-résolutifs spécialisés ou SPM [67, 68], comme les résolvines, marésines et neuroprotectines dérivés de l'EPA et du DHA, s'opposent aux effets pro-inflammatoires des prostaglandines, leucotriènes et hydroxyeicosatetraénoïques (HETE), dérivés principalement de l'acide arachidonique (AA), et impliqués dans la neuro-inflammation associée à la maladie d'Alzheimer [69–71].

1.5. Neuro-inflammation et inflammation vasculaire : médiateurs lipidiques pro-inflammatoires et pro-résolutifs.

Durant la phase d'initiation de l'inflammation aigüe, la production de prostaglandines et leucotriènes à partir de l'acide arachidonique est un processus essentiel à l'infiltration leucocytaire. Durant la phase de résolution, la production de médiateurs lipidiques pro-résolutifs ou SPM (Lipoxines à partir de l'acide arachidonique et résolvines, marésines et protectines à partir de l'EPA et du DHA) va permettre de limiter la réponse inflammatoire aigüe en agissant en opposition aux médiateurs pro-inflammatoires et en régulant les cellules immunitaires

(lymphocytes, monocytes et macrophages [72]). La persistance d'une réponse inflammatoire non contrôlée et donc non résolue va conduire au développement d'une inflammation chronique, délétère et pathogénique, dans laquelle les médiateurs lipidiques pro-inflammatoires jouent également un rôle primordial [73]. Ainsi, les médiateurs lipidiques pro-inflammatoires sont des acteurs centraux dans la compréhension de l'inflammation chronique associée aux maladies neurodégénératives ou cardiovasculaires, et les SPM, une piste thérapeutique dans la résolution de cette inflammation [74, 75].

1.5.1 DHA et Alzheimer

Le DHA, provenant exclusivement de l'alimentation, est le principal acide gras ω3 présent dans le cerveau [76]. Des carences en cet acide gras essentiel seraient associées à un dysfonctionnement neuronal et à une inflammation.

Si de nombreuses études associent un effet bénéfique du DHA sur la maladie d'Alzheimer, peu d'études en ont identifié les mécanismes. Parmi ces études, certaines menées chez des modèles de rongeurs ont démontré que le DHA diminuait la neuro-inflammation, la charge amyloïde, l'hyperphosphorylation de Tau ou les fonctions cognitives, avec des doses ou des durées de traitement différentes (voir pour revue [77]). Chez l'Homme, de nombreuses études pré-cliniques et cliniques ont montré que les PUFA de type Ω3, à l'origine des SPM, jouent un rôle significatif dans la prévention des maladies vasculaires et de la maladie d'Alzheimer. Une méta-analyse récente a révélé que parmi les nutriments les moins abondants (dans le cerveau, le liquide céphalo-rachidien et le sang) chez les patients Alzheimer en comparaison de contrôles, on trouve le DHA [78]. Pour illustrer l'effet des acides gras poly-insaturés de type Ω3 sur la maladie d'Alzheimer, on citera par exemple les travaux de Freund-Levi et al., (2006) qui montrent que l'administration à des patients Alzheimer de sévérité moyenne à modérée de DHA ralentit la progression de la maladie [79]; ainsi que les études de Lim et al., (2005), Cole et al, (2006) et de Green et al., (2007) qui révèlent qu'une consommation importante de DHA est associée à un risque moindre de développer cette pathologie [80–82].

1.5.2 DHA et système cardiovasculaire.

La littérature est très abondante quand aux effets bénéfiques des acides gras oméga3 sur le système cardiovasculaire [83]

En plus de ses effets hypolipidémiques [84], le DHA possède des effets bénéfiques sur la pression artérielle et l'inflammation vasculaire via ses actions sur les cellules endothéliales et sur les cellules musculaires lisses vasculaires [85–87]. Le DHA agit également sur la prolifération et la migration des CMLV, deux processus centraux dans les remodelages vasculaires pathologiques [88, 89].

1.6. Objectifs de l'étude

De plus en plus d'études soutiennent l'existence d'un axe neuro-vasculaire dans la maladie d'Alzheimer, maladie qui partage des facteurs de risque avec les maladies cardiovasculaires. Il a même été suggéré de requalifier la maladie d'Alzheimer en « vasocognopathie » sur la base d'arguments épidémiologiques, pharmacologiques et cliniques [90, 91]. L'inflammation chronique, un phénomène impliqué depuis longtemps dans les maladies cardiovasculaires, est également étroitement associée à un large panel de maladies neuro-dégénératives à évolution lente et associées au vieillissement comme la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la sclérose en plaques ou la maladie d'Alzheimer (pour revue voir [92]).
Notre objectif était de rechercher si l'effet bénéfique du DHA sur le développement de la maladie d'Alzheimer proviendrait de son effet bénéfique sur les CMLV et ainsi mettre en relation les altérations vasculaires avec la maladie d'Alzheimer.

Lors de mon arrivée à l'UR4 en septembre 2009 dans l'équipe du Pr. Isabelle Limon, j'ai été en charge de mener un nouveau projet, financé par les laboratoires Pierre Fabre, visant à étudier les **effets bénéfiques potentiels du DHA sur les altérations vasculaires retrouvées dans la maladie d'Alzheimer**. Sur ce projet, j'ai encadré deux étudiants de Master 2 (**Amélie Vromman** en 2011 et **Nesrine Trabelsi** en 2012). **Amélie Vromman** a poursuivi en thèse dans le laboratoire, mais principalement sur une thématique athérosclérose, tout en participant à l'achèvement du projet inflammation *in vitro*.
Ce premier projet *in vitro* achevé en 2012, a été poursuivi par un projet *in vivo* que nous avons imaginé et mené avec le Pr. Isabelle Limon de 2013 à 2017. Sur ce projet, j'ai encadré **Justine Hur** en M2 (2014) et codirigé sa thèse (2014-2017).

Pour plus de lisibilité, j'ai choisi de diviser ce travail en deux axes :
Premier axe de recherche (2009-2012): Dégénérescence et réponse inflammatoire des cellules musculaires lisses vasculaires induites par le peptide $A\beta_{1-40}$ et effets du DHA.
Deuxième axe de recherche (2013-2017): Effets du DHA sur l'inflammation cérébrovascualaire associée à la maladie d'Alzheimer et aux angiopathies amyloïdes cérébrales : étude *in vivo*.
Les publications issues de ces travaux, et dont les principaux résultats sont abordés dans les chapitres suivants, sont en annexe de ce document (*Article 1, 2,* et *3*). Un quatrième article de méthodologie a également été publié sur cette thématique, mais ne sera pas mentionné dans ce manuscrit [93].

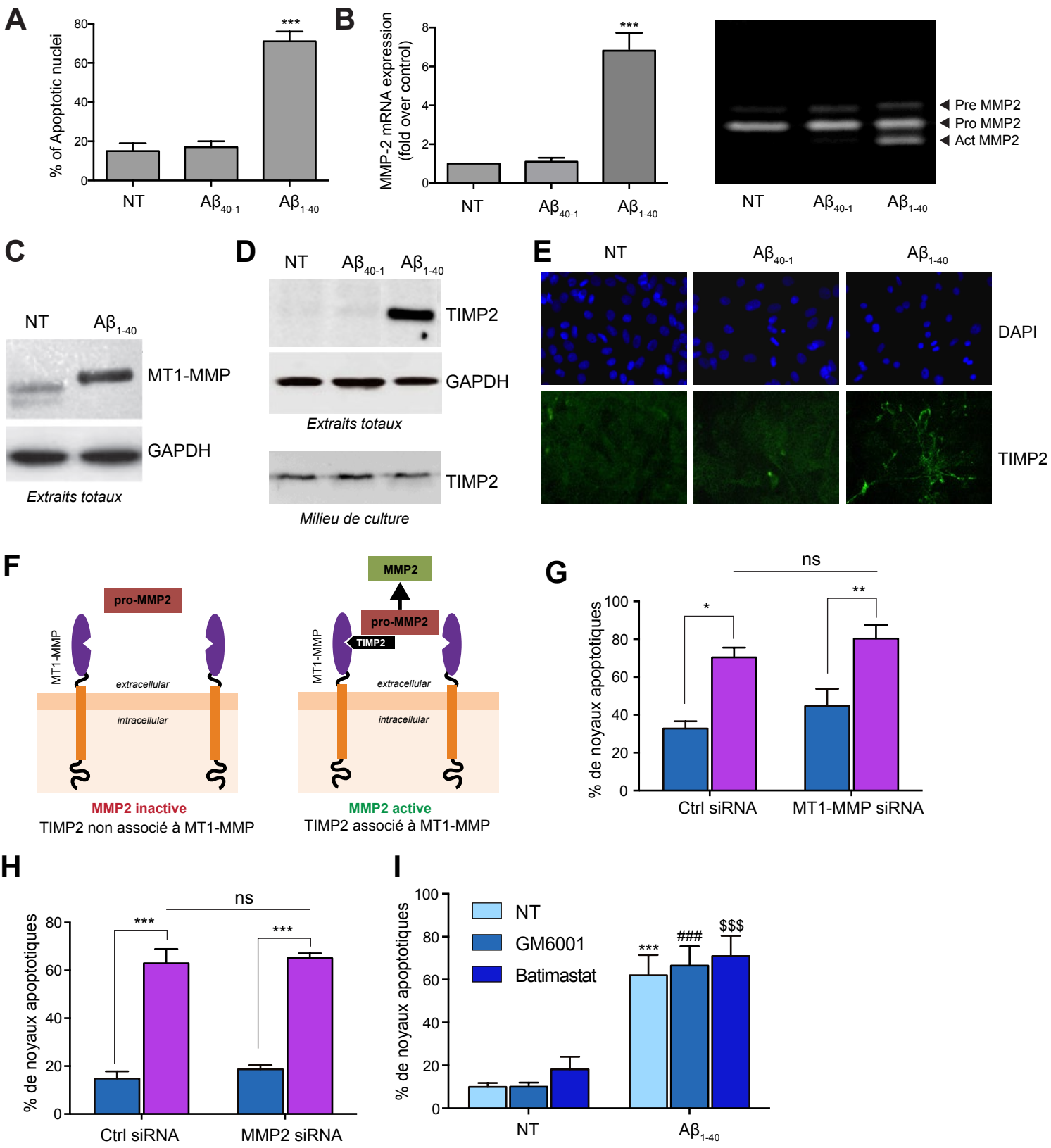

Figure 6. Dégénérescence des CMLV induite par le peptide $A\beta_{1-40}$.

Dans chaque expérience, les CMLV d'aorte de rat ont été traitées 48 à 72h par 50µM de peptide $A\beta_{1-40}$. Les autres traitements sont précisés pour chaque partie de la figure. **A.** L'apoptose a été mesurée par un marquage au iodure de propridium et le % de noyaux hypodiploïdiques a été déterminé par cytométrie de flux. **B.** L'expression des messagers MMP-2 a été réalisée par PCR semi-quantitative (Roche LightCycler 480) et normalisée par l'expression du gène de ménage HPRT. Les résultats sont exprimés par rapport à la condition contrôle. **B.** L'activé gélatinase de la MMP2 a été déterminée par zymographie sur les surnageants de culture. La forme active de la MMP2 est notée «Act. MMP2». **C** et **D**. Expression par Western-Blot de MT1-MMP et TIMP2 sur des extraits protéiques totaux. L'expression de TIMP2 a également été évaluée sur les milieux de culture. **E**. Marquage de TIMP2 par immunofluorescence illustrant son recrutement à la membrane plasmique suite à un traitement au peptide $A\beta_{1-40}$. **F**. Représentation des mécanismes moléculaires d'activation de MMP2 par TIMP2 et MT1-MMP. **G** et **H**. Apoptose induite par le peptide $A\beta_{1-40}$ après invalidation de l'expression de MT1-MMP et MMP-2 à l'aide de siRNA. **I**. Apoptose induite par le peptide $A\beta_{1-40}$ en présence d'inhibiteurs larges spectres de métalloprotéases, le GM6001 (25µM) et le batimastat (2.5µM). L'apoptose des panneau G, H et Ia été mesurée comme décrit pour le panneau A. Les données sont représentatives d'au moins trois (Western Blot et zymmographie) ou quatre (qPCR et apoptose) expériences indépendantes. Les données représentées correspondent à la moyenne ± SD ###, $$$, *** P<0.001, ** P<0.01, *P≤0.05. Test statistique t-test non appareillé avec correction de Welsh.

2. Résultats

2.1. Dégénérescence et réponse inflammatoire des cellules musculaires lisses vasculaires induites par le peptide $A\beta_{1-40}$.

2.1.1 Dégénérescence des CMLV induite par le peptide $A\beta_{1-40}$.

La perte de l'intégrité de la paroi vasculaire est associée à une altération de l'adhésion des CMLV à la matrice extracellulaire. Cette altération est la résultante de deux phénomènes distincts, la dégradation des glycoprotéines constituant la matrice extracellulaire et une protéolyse des protéines d'adhésion péri-cellulaires, impliquant principalement la famille des métalloprotéases ou MMPs [94]. En 2003, l'équipe de Van Nostrand associe la dégénérescence des CMLV induite par le peptide $A\beta_{1-40}$Dutch ($A\beta_{1-40}$D, peptide présentant une mutation E22Q responsable de la forme d'AAC familiale la plus sévère, mais extrêmement rare) à l'augmentation de la sécrétion et de l'activation de MMP2 [95]. Cependant, plus de 95% des AAC et de la maladie d'Alzheimer ne sont pas d'origine familiale et n'impliquent pas la présence de peptides mutés. C'est pourquoi nous avions choisi de déterminer si et comment le peptide $A\beta_{1-40}$ sauvage ($A\beta_{1-40}$), et non une forme mutée, induit la dégénérescence des CMLV, et si un traitement au DHA pouvait limiter ces effets délétères.

Nous avons pu mettre en évidence au cours de cette première étude que le peptide $A\beta_{1-40}$ induisait la mort des CMLV en culture (*Figure 6A* ou *Article 1 Figure 1*) ainsi qu'une augmentation de l'expression/activation de la MMP-2 (*Figure 6B* ou *Article 1 Figure 2*). Cette augmentation de l'activation de MMP-2 s'opère par l'intermédiaire d'une augmentation de l'expression de MT1-MMP (*Figure 6C* ou *Article 1 Figure 3*) et une relocalisation membranaire de TIMP-2 (*Figure 6D et E* ou *Article 1 Figure 4*), toutes deux impliquées dans le processus de maturation (*Figure 6F*) de la forme pro-MMP-2 en MMP-2 active [96, 97]. Ces résultats étaient en accord avec ce qui avait été précédemment démontré par l'équipe de Van Nostrand pour le peptide mutant $A\beta_{1-40}$Dutch [95]. Cependant, l'invalidation de l'expression de MMP-2, de MT1-MMP, ou l'inhibition des activités MMP des cellules, n'a aucun effet sur l'apoptose induite par le peptide $A\beta_{1-40}$, (*Figure 6G, H et I* ou *Article 1 Figures 5 et 6*). Ces résultats suggéraient, et ce pour la première fois, l'existence de mécanismes moléculaires distincts dans la pathogenèse des AAC sporadiques et familiales. Ces résultats remettaient également en question de nombreuses études sur les AAC, où il était fait systématiquement usage du peptide mutant $A\beta_{1-40}$Dutch, dont les effets cellulaires sont très marqués mais dont les mécanismes d'action semblent être éloignés de ceux induits par le peptide amyloïde sauvage $A\beta_{1-40}$, retrouvé dans toutes les formes d'AAC non familiales.

2.1.2. Inflammation vasculaire induite par le peptide Aβ1-40.

Si l'inflammation est un évènement clé dans le développement de la maladie d'Alzheimer et des AAC, les principales études au niveau vasculaire se sont concentrées sur l'effet pro-inflammatoire du peptides Aβ sur les cellules endothéliales, mais très peu de données sont

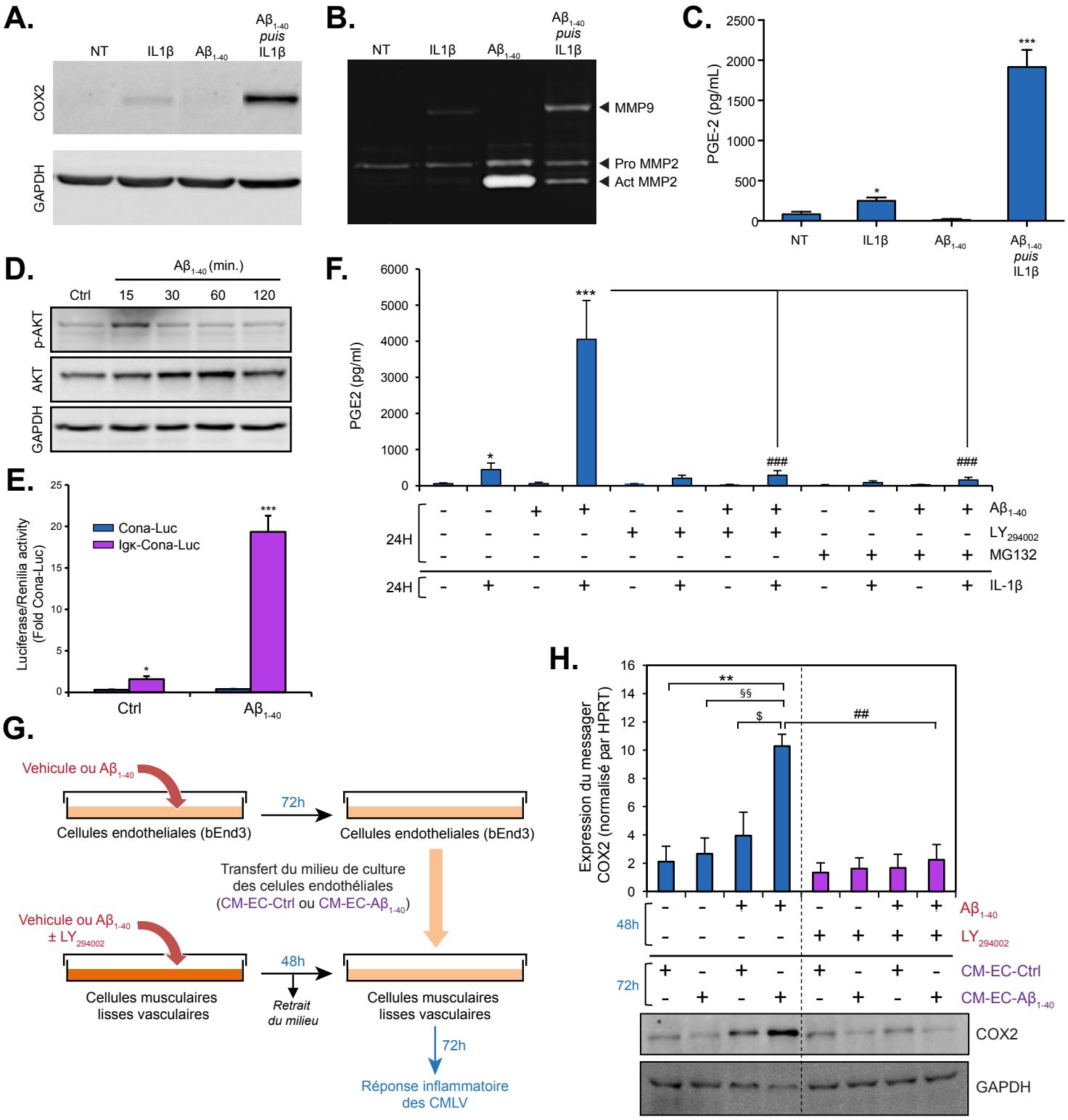

Figure 7. Réponses inflammatoires des CMLV en contexte amyloïde.

A, B, C et **F** Les CMLV ont été traitées 24h avec soit du peptide $A\beta_{1-40}$ (50µM), soit de l'IL1β (2ng/mL), soit 24h avec du peptide $A\beta_{1-40}$ (50µM) suivi de 24h de traitement à l'IL1β (2ng/mL). **A.** Expression de la protéine COX2 par western-blot. **B.** Activité gélatinase (MMP2 et MMP9) par zymographie sur milieu de culture. **C.** Sécrétion de la PGE-2 par EIA sur milieu de culture. **D.** Cinétique d'activation de la voie AKT par le peptide $A\beta_{1-40}$ (50µM) par western blot. **E.** Activation de la voie NF-kB par le peptide $A\beta_{1-40}$ (50µM). Les CMLV ont été transfectées par des constructions promoteur/gène-rapporteur (luciférase) répondant (IgK-CONA-LUC) ou non (CONA-LUC) à une activation de la voie NF-kB. Après traitement des cellules au peptide $A\beta_{1-40}$, l'activité luciférase a été mesurée (et normalisée par une activité Renillia portée par un vecteur pRL-TK co-transfecté), reflet de l'activation de la voie NF-kB. **F.** Sécrétion de PGE2 par EIA dans le milieu de culture de CMLV dans des conditions expérimentales identiques au panel **C**, en présence ou non d'un inhibiteur de la voie AKT (LY294002) ou d'un inhibiteur de la voie NF-kB (MG132). **G.** Protocole de traitement des CMLV (prétraitées avec le peptide $A\beta_{1-40}$ (50µM) en présence ou non de LY294002, inhibiteur de la voie PI3K) avec le milieu de culture de cellules endothéliales murines (bEnd3), préalablement exposées ou non au peptide $A\beta_{1-40}$ (50µM). **H.** Expression des messager (histogramme du haut) et de la protéine COX2 dans les différentes conditions expérimentales décrites dans le panel **G.** par PCR semi-quantitative et western blot respectivement.

Les données sont représentatives d'au moins trois (Western Blot, zymographie et EIA) ou quatre (qPCR) expériences indépendantes. Les données représentées correspondent à la moyenne ± SD ###, *** P<0.001; ##, §§,** P<0.01; $, * P≤0.05. Test statistique t-test non appareillé avec correction de Welsh.

disponibles sur les CMLV et ces études ont été principalement réalisées avec le peptide $A\beta_{1-40}$Dutch [56, 98].

C'est pourquoi, l'effet direct et indirect du peptide $A\beta_{1-40}$ sur le statut inflammatoire des CMLV a été évalué. Nous avons démontré que contrairement à une cytokine pro-inflammatoire de référence, l'IL1β, le peptide $A\beta_{1-40}$ seul n'induit pas l'apparition de marqueurs inflammatoires comme COX2, PGE2 et MMP-9. Cependant, la réponse inflammatoire des CMLV est exacerbée lorsque les CMLV ont été préalablement exposées au peptide $A\beta_{1-40}$ (*Figure 7A, B et C* ou *Article 2 figure 1 et 2*), suggérant ainsi que si le peptide n'est pas à l'origine de la réponse inflammatoire, il en potentialise l'effet, notamment par la pré-activation des voies de signalisation NF-κB et PI_3K/AKT (*Figure 7D, E et F* ou *Article 2 figure 3, 4 et 5*). L'origine de l'inflammation vasculaire cérébrale est sujette à controverse dans la littérature. Certains suggèrent qu'elle pourrait avoir pour origine l'unité neurovasculaire (microglie et astrocytes), ou plus directement impliquer les cellules endothéliales exposées aux peptides Aβ [56, 57]. Afin de déterminer si le peptide $A\beta_{1-40}$ pourrait être à l'origine de l'inflammation vasculaire, nous avons recueilli les milieux conditionnés issus d'une lignée murine de cellules endothéliales cérébrales (bEnd3) incubées en présence de peptide $A\beta_{1-40}$. Ces milieux ont été utilisés pour traiter des CMLV, préalablement exposées ou non au peptide $A\beta_{1-40}$ (*Figure 7G* ou *article 2 figure 6A*). Ainsi, nous avons pu démontrer que les cellules endothéliales secrétaient différentes cytokines pro-inflammatoires (*Article2 Figure supplémentaire S5*) induisant une réponse inflammatoire des CMLV, réponse inflammatoire exacerbée lorsque les CMLV sont préalablement traitées par le peptide $A\beta_{1-40}$ (*Figure 7H* ou *Article 2 Figure 6*).

L'ensemble de ces résultats i) est en accord avec les données précédemment publiées montrant que les cellules endothéliales exposées à un contexte amyloïde génèrent par elles-mêmes une forte réponse inflammatoire [56, 57] et ii) renforce l'hypothèse selon laquelle le contexte pro-inflammatoire, généré par les cellules endothéliales exposées aux peptides β-amyloïdes, conduit à l'amplification de la réponse inflammatoire des CMLV amyloïdes. Cette amplification aurait pour conséquence une altération phénotypique accrue des CMLV.

L'ensemble des résultats présentés dans les *articles 1* et *2* met en évidence des mécanismes qui pourraient être à l'origine de l'inflammation et de la dégénérescence vasculaire retrouvés dans les angiopathies amyloïdes cérébrales et la maladie d'Alzheimer (*Figure 8* en vis à vis de la page 20).

2.1.3. Effets du DHA *in vitro* sur la dégénérescence et l'inflammation des CMLV en contexte amyloïde (résultats non publiés).

La consommation régulière d'acides gras polyinsaturés de type oméga-3, comme l'EPA ou le DHA, diminue l'incidence des maladies cardiovasculaires. Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, plusieurs études ont démontré chez l'homme comme sur des modèles animaux, des effets bénéfiques du DHA sur la neuro-inflammation, le métabolisme amyloïde et les fonctions cognitives [44, 99–101]. Afin d'évaluer si le DHA pourrait moduler les changements cérébro-vasculaires observés dans la maladie d'Alzheimer, et étudiés dans les *articles 1* et *2*, nous avons revisité l'ensemble de ces expériences en présence de DHA. (*Figure 9 et 10*). Nous avons pu démontrer que :

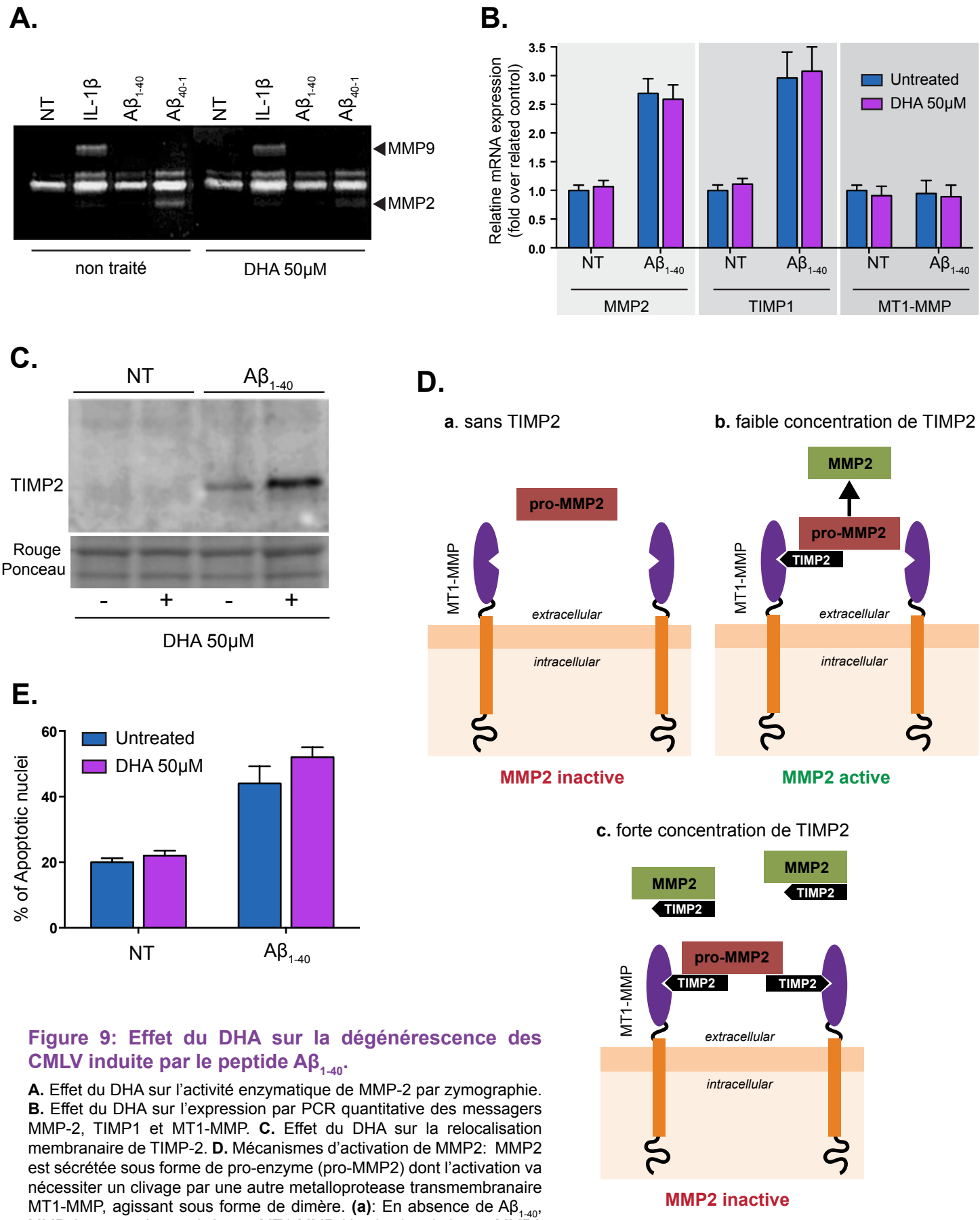

Figure 9: Effet du DHA sur la dégénérescence des CMLV induite par le peptide $A\beta_{1-40}$.

A. Effet du DHA sur l'activité enzymatique de MMP-2 par zymographie. **B.** Effet du DHA sur l'expression par PCR quantitative des messagers MMP-2, TIMP1 et MT1-MMP. **C.** Effet du DHA sur la relocalisation membranaire de TIMP-2. **D.** Mécanismes d'activation de MMP2: MMP2 est sécrétée sous forme de pro-enzyme (pro-MMP2) dont l'activation va nécessiter un clivage par une autre metalloprotease transmembranaire MT1-MMP, agissant sous forme de dimère. **(a)**: En absence de $A\beta_{1-40}$, MMP-2 ne peut être activée par MT1-MMP. L'activation de la pro-MMP2 nécessitant sa relocalisation à la membrane. (b) En présence de $A\beta_{1-40}$, TIMP-2 va être exprimée et interagir à la fois avec MMP2 et MT1-MMP, agissant comme une protéine adaptatrice. Une fois le complexe MT1-MMP/TIMP2/MMP-2 formé, la protéine MT1-MMP du dimère MT1-MMP/MT1-MMP qui n'est pas engagée dans le complexe MT1-MMP/TIMP2/MMP-2 va cliver la pro-MMP2 en MMP2, catalytiquement active **(c)**. En présence de DHA, l'expression de TIMP2 augmente. TIMP-2 se comporte alors non pas comme un activateur de MMP-2, mais comme un inhibiteur. En effet, les dimères MT1-MMP seront systématiquement associés aux protéines TIMP-2, masquant ainsi leurs sites catalytiques et les rendant inactifs. D'autre part, TIMP2 est également capable d'interagir avec les protéines MMP2 actives présentes dans le milieu extracellulaire, l'activité enzymatique de ces derniers est alors inhibée. **E.** Effet du DHA sur l'apoptose des CMLV induite par le peptide $A\beta_{1-40}$.

• Concernant l'activation de MMP-2 et la dégénérescence des CMLV (*Figure 6*), nous avons tout d'abord montré que le traitement des CMLV au DHA inhibe l'activation de MMP2 induite par le peptide $A\beta_{1-40}$, visualisable sur la zymographie présentée (*Figure 9A*). Le DHA n'affecte cependant ni l'expression de MMP2 ni celle de ses partenaires d'activation MT1-MMP et TIMP2 (*Figure 9B*), mais augmente la relocalisation de TIMP-2 à la membrane (*Figure 9C*), se comportant alors comme un inhibiteur de l'activation de la MMP2 (*Figure 9D*). Si le DHA inhibe l'activité MMP2, il n'affecte cependant pas l'apoptose induite par le peptide amyloïde $A\beta_{1-40}$ (*Figure 9E*), renforçant ainsi l'idée que l'activation des MMP et l'apoptose induite par le peptide $A\beta_{1-40}$, sont, dans notre modèle, deux mécanismes indépendants.

• Concernant l'inflammation vasculaire (*Figure 10*), de nombreuses mises au point ont été nécessaires pour visualiser un effet du DHA sur l'effet potentialisateur du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la réponse inflammatoire induite par l'IL1β. Parmi ces conditions, le traitement simultané des CMLV par le peptide $A\beta_{1-40}$ et le DHA, diminue l'expression de COX2 (*Figure 10B* Cox 2 piste 4 *versus* 3 et piste 8 *versus* 7). Cependant, un prétraitement des CMLV au DHA augmente l'effet potentialisateur du peptide $A\beta_{1-40}$ sur l'expression de COX2 (*Figure 10B* piste 3 versus 7). Nous n'avons pas observé d'effet du DHA sur l'expression d'autres marqueurs inflammatoires, comme la MMP9 (résultats non présentés).

En résumé, si nous avons pu caractériser *in vitro* la dégénérescence et l'acquisition d'un phénotype inflammatoire des CMLV en contexte amyloïde, nous n'avons pas pu clairement mettre en évidence un effet bénéfique du DHA sur ces mécanismes, en dehors d'un traitement simultané avec le DHA et le peptide $A\beta_{1-40}$. Cependant, l'effet obtenu par ce traitement simultané peut s'expliquer par une interaction directe entre le DHA et le peptide, empêchant l'oligomérisation et la fibrillation de ce dernier [102].

Plusieurs raison peuvent expliquer l'absence d'effet du DHA, ou ses effets paradoxaux, sur notre étude *in vitro*. Le DHA, comme beaucoup d'acides gras polyinsaturés, peut facilement s'oxyder par l'action de radicaux libres générant des produits d'oxydation bioactifs qui peuvent avoir à la fois des effets pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires [103, 104]. D'autre part, le DHA à des doses similaires à celles utilisées dans notre étude (25-50µM), peut induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et altérer la viabilité de cellules endothéliales [105] comme d'autres types cellulaires [106], en favorisant la peroxydation des lipides membranaires [107]. Les acides gras poly-insaturés présentent également des effets délétères *in vitro*, en fonction du type cellulaire ou de la composition du milieu de culture [108].

L'absence d'effet probants *in vitro* du DHA sur les altérations vasculaires induite par le peptide $A\beta_{1-40}$, nous a donc conduit à développer un projet *in vivo*, financé par les laboratoires Pierre Fabre (2013-2017).

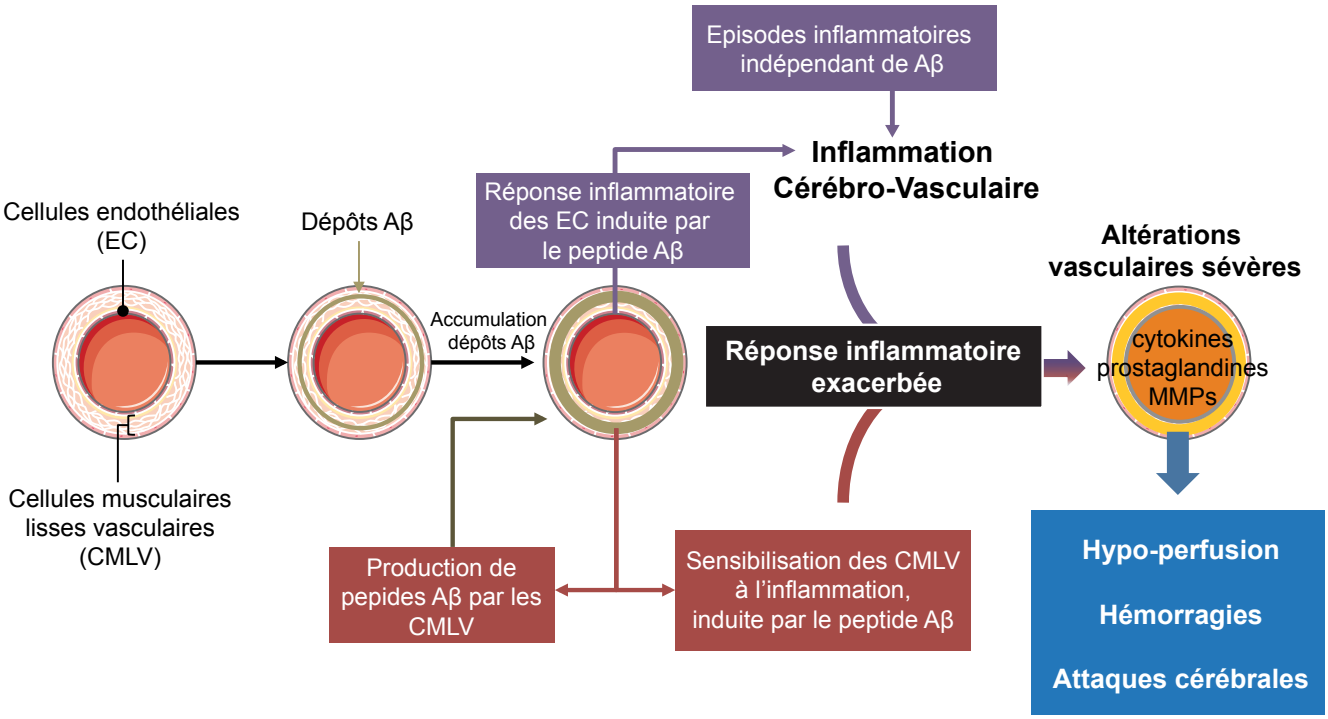

Figure 8. Effets du peptide amyloïde $A\beta_{1-40}$ sur l'inflammation vasculaire.

Mécanismes de la mise en place et du développement d'une inflammation vasculaire exacerbée dans la maladie d'Alzheimer et dans les AAC, conduisant à des altérations vasculaires sévères.

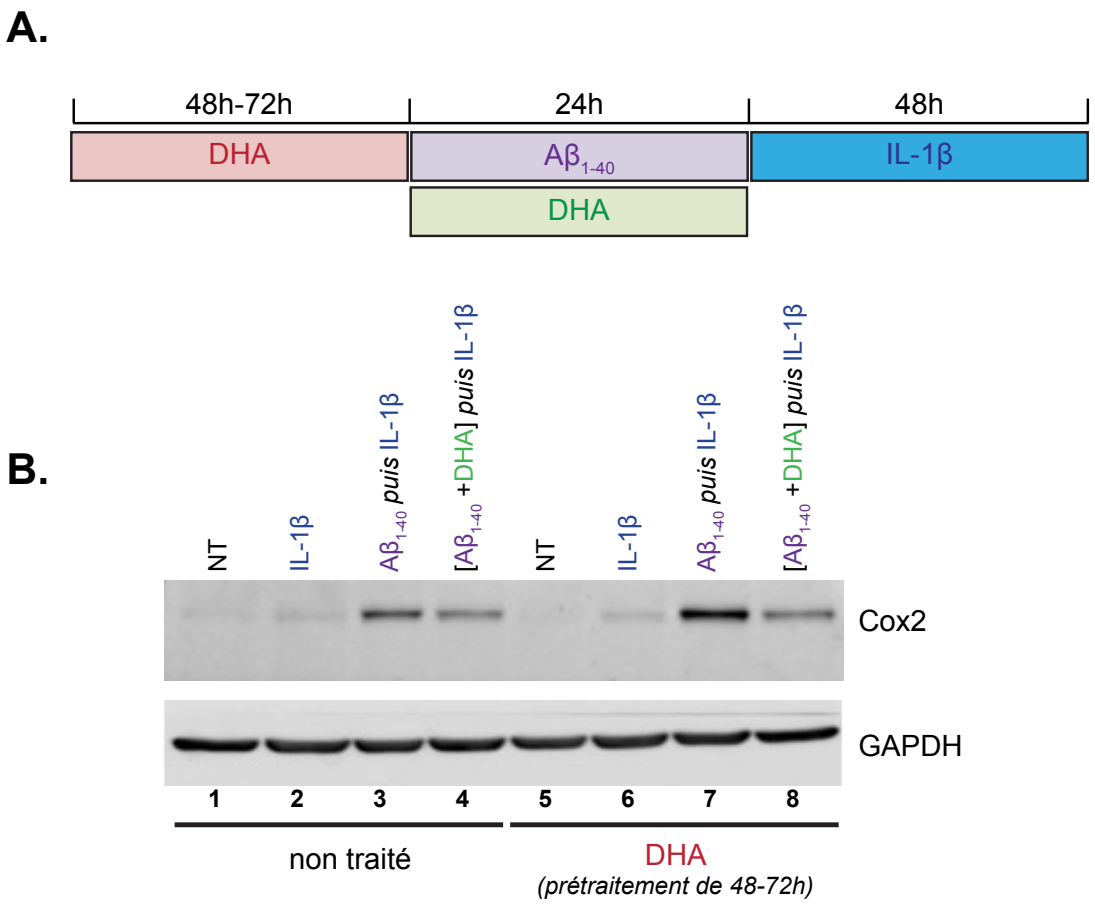

Figure 10. Effet du DHA sur la potentialisation par le peptide $A\beta_{1-40}$ de la réponse inflammatoire induite par l'IL-1β.

A. Les CMLV ont été prétraitée (piste 5-8) ou non (pistes 1-4) pendant 48 à 72h par 50µM de DHA. Les CMLV ont alors été traitée par 50µM de peptide $A\beta_{1-40}$ pendant 24h en présence (pistes 4 et 8) ou non (pistes 3 et 7) de 50µM de DHA, puis les cellules ont été traitées 48h avec 10ng/mL d'IL-1β. **B.** Expression de la protéine Cox2 et GAPDH par Western blot.

2.2 Effets du DHA sur l'inflammation cérébrovasculaire associée à la maladie d'Alzheimer et aux angiopathies amyloïdes cérébrales : étude in vivo.

L'objectif de ce projet *in vivo* était de caractériser l'effet d'une supplémentation nutritionnelle en acides gras ω3 (élaborée à partir d'huile de poisson enrichie en DHA) sur le réseau cérébro-vasculaire de souris transgéniques modèle Alzheimer (souris Tg2576) présentant des dépôts amyloïdes dans la paroi des vaisseaux.

2.2.1. Descriptif de l'étude

a. Modèle de souris

Après études des différents modèles de souris transgéniques Alzheimer disponibles, nous nous sommes orientés vers les souris transgéniques Tg2576, exprimant le gène APP humain portant la mutation Swedish (L670N, M671L). Ces deux mutations sont situées au site de clivage de la protéine APP par la β-sécretase, augmentant ainsi les niveaux de production des peptides Aβ, mais ne touchant pas la séquence des peptides Aβ générés [109]. Ces souris présentent les altérations suivantes :

- Des dépôts amyloïdes dans le parenchyme cérébral (à partir de 10 mois)
- Des dépôts amyloïdes sur les vaisseaux cérébraux (à partir de 10 mois)
- Des microhémorragies cérébrales (non systématiques, 18 mois)
- Des altérations cognitives (variables en fonction des tests réalisées)

Des fondateurs mâles hétérozygotes Tg2576 (Taconic Inc, USA) ont été croisés avec des femelles C57BL/6 pour obtenir des souris hétérozygotes Tg2576 ou sauvages (WT) issues de la même portée. Seules les femelles ont été gardées pour l'étude, pour des questions de coût d'hébergement.

b. Régime alimentaire.

A l'âge de 2 mois, les souris WT et Tg2576 ont été séparées en deux lots de deux groupes : un lot de souris recevant une alimentation enrichie en DHA (groupe WT-DHA et groupe Tg2576-DHA) et un lot recevant une alimentation placebo (groupe WT-Placebo et WT-DHA).
Le régime de base utilisé correspond à un régime de croquettes de composition classique (C1000 Altromin, Allemagne), cependant dépourvu d'acide gras polyinsaturés ω3 DHA et EPA (composition donnée dans l'*article 3, supplementary table 2*)
Le régime DHA correspond aux croquettes de base dans lesquelles a été incorporé, lors de la fabrication, de l'huile de poisson enrichie à 70% en DHA (composition relative en acide gras donnée dans l'*article 3, supplementary table 3*). L'objectif était de donner aux souris une quantité quotidienne de DHA, similaire à celle donnée dans une étude menée par les hôpitaux de Toulouse chez l'Homme pendant trois ans (étude « Multidomain Alzheimer Preventive Trial » ou MAPT [110]). Dans l'étude MAPT, les sujets recevaient 800mg de DHA par jour sous forme de gélules,

Figure 11. Protocole de l'étude in vivo.

Des mâles fondateurs Tg2576 (APP [L670N, M671L]) hétérozygotes ont été croisées avec des femelles C57Bl/6. La descendance (WT et Tg2576) a été soumise à une periode d'adaptation de 1 mois au moment du sevrage avec une alimentation de base C1000 modifiée (déplétée en EPA et DHA) et additionnée progressivement d'un arôme «goût poisson». Au deuxième mois, les souris WT et Tg2576 ont été divisées en deux lots, un lot de souris recevant un régime C1000 additioné d'une huile de poisson enrichie en DHA (Régime DHA) et un lot recevant le régime C1000 modifié avec l'arôme «goût de poisson» (Régime Placébo). Les souris ont été sacrifiées à 10 mois, 14 mois et 18 mois pour quantifier les dépôts amyloïdes vasculaires et parenchymateux, ainsi que les hémorragies cérébrales. Le sang de ces souris a été récupéré et envoyé à la société Synelvia pour dosages. Une partie des souris a été envoyée à la société Key-Obs pour subir des tests cognitifs à 10 mois, 14 mois et 18 mois, puis sacrifiées.

correspondant à environ 2,5 mg de DHA par jour chez la souris, en tenant compte du rapport de poids et du coefficient allométrique Homme-> souris [111].

Le régime placébo correspond aux mêmes croquettes de base (C1000), sans ajout d'huile de poisson enrichie en DHA. Cependant l'huile de poisson enrichie en DHA possède une odeur particulière qui aurait pu induire un biais dans la consommation des croquettes entre les animaux DHA et placébo. C'est pourquoi les croquettes du régime placébo ont été additionnées d'un arôme « goût poisson », donnant ainsi à l'alimentation placébo, les mêmes propriétés organoleptiques que l'alimentation DHA.

Afin d'habituer les animaux à ces croquettes (DHA ou placebo) présentant une odeur particulière, tous les animaux sont passés, lors du sevrage, par une période d'adaptation de trois semaines pendant laquelle les animaux ont reçu une alimentation progressivement additionnée en arôme gout poisson (Placébo). A compter de la quatrième semaine, les animaux ont reçu l'alimentation finale d'huile de poisson enrichie en DHA (lot DHA) où le régime à 100% de la teneur en arôme goût poisson (lot Placébo).

c. Etudes menées sur les animaux

Les animaux ont été sacrifiés à 10 mois, 14 mois et 18 mois pour réaliser les analyses présentées sur la *Figure 11*, à l'exception des tests cognitifs, réalisés sur les mêmes souris à 10, 14 et 18 mois.

Caractérisation des dépôts amyloïdes vasculaires et parenchymateux

Les cerveaux des souris sacrifiées aux différents âges ont été fixés à la PFA et 74 coupes sériées de 30µm ont été réalisées par souris, centrées sur l'hippocampe (bregma −0.94 mm à bregma −3.1 mm). Ces 74 coupes pour chaque souris ont été distribuées de façon successive dans une plaque 24 puits et stockées en milieu cryoprotecteur. Ainsi dans chaque puits se trouvent 3 coupes espacées de 720µm correspondant aux mêmes régions pour chaque souris (*Figure 12*).

Les marquages réalisés ont été les suivants :

- Les dépôts amyloïdes ont été marqués avec l'anticorps Bam10. Afin de distinguer les dépôts amyloïdes vasculaires des dépôts parenchymateux, un co-marquage des CMLV avec un anticorps anti-SM22 a été réalisé. Les dépôts amyloïdes parenchymateux ($Bam10^+/SM22^-$) et vasculaires ($Bam10^+/SM22^+$) ont été quantifiés à l'aide d'une macro développée sous image-J (Jean-François Gilles, Plateforme d'imagerie IBPS) selon la méthodologie décrite dans l'*article 3*.
- Les micro-hémorragies ont été déterminées par une détection de l'hemosidérine au ferrocyanure de potassium (marquage de Perls), et quantifiées à l'aide d'une macro image-J.

Nous avons ainsi pu générer une banque de coupe de cerveau de souris WT et Tg2576, en régime placébo ou DHA.

Etude exploratoire sur les médiateurs lipidiques bioactifs.

Au moment du sacrifice, le sang des souris a été récupéré et seule une partie a pu être utilisée pour ces analyses en raison de problèmes de conservations.

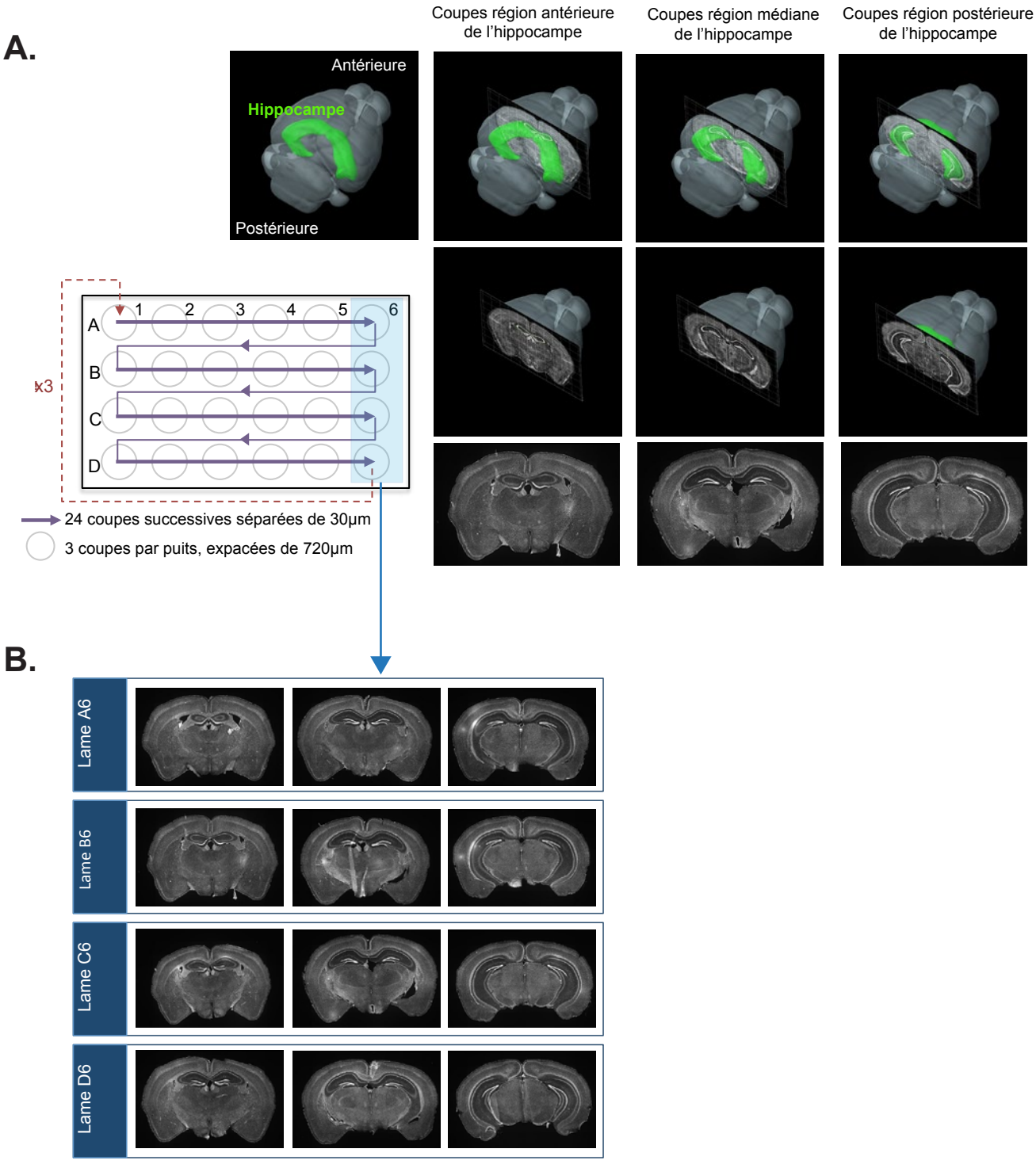

Figure 12. Constitution de la banque de coupes de cerveaux de souris Tg2576

A. Chaque cerveau de souris a été coupé à partir de la même région (bregma -0.94mm) en 72 coupes de 30µm d'épaisseur. Les coupes ont ensuite été distribuées successivement dans une plaque 24 puits avec cryprotecteur de façon ordonnée. **B.** Exemple d'un jeu de coupe pour réaliser un marquage. Une colonne de puits est utilisée par marquage correspondant à un jeu de 4 lames comprenant 12 coupes. La colonnes 6 a été utilisée pour les marquages Abeta et SM22, la colonne 5 pour les marquages de Perls, la colonnes 4 pour les marquages au rouge Congo. Les quantifications de chaque marquage correspondent à une moyenne des 12 coupes d'une colonne. Ce système de classement des coupes permet d'avoir les même régions analysées pour chaque souris.

Les analyses par chromatographie et spectrométrie de masse ont été réalisées par la société Synelvia (Labède, France).
Deux types d'analyses ont été effectués :

•Par chromatographie liquide/spectrométrie de masse (LC/ESI-MS): permettant le dosage des médiateurs lipidiques suivants, dans des échantillons de plasma de souris : les prostaglandines, les leucotriènes (LTB4, LTC4 et LTE4), certains acides hydroxyeicosatétraénoïque (5-HETE, 8-HETE, 11-HETE, 12-HETE et 15-HETE), des Lipoxines (LXA4 et LXB4), la résolvine D1 (RvD1), la Maresine 1 (MAR1), les Protectines DX (PDX) ou 10 (S), 17 (S).

•Par chromatographie gazeuse/spectrométrie de masse (GC/MS) : permettant l'analyse quantitative du DHA, de l'EPA et de l'acide arachidonique dans les globules rouges.

Test Cognitifs.

Une partie des souris a été destinée à des tests cognitifs, réalisés par la société Key-Obs (Orléans, France). Ces tests ne sont pas présentés dans l'article publié sur cette étude, c'est pourquoi ils seront résumés dans ce manuscrit. Vingt souris de chaque groupe (WT-Placebo, WT-DHA, Tg2576-Placébo et Tg2576-DHA) ont été transférées dans les locaux de Key-Obs à l'âge de 9 mois. Tout en poursuivant leur régime alimentaire (Placébo ou DHA), les souris ont été soumises à des tests cognitifs à 10 mois, 14 mois et 18 mois afin d'évaluer :
•La mémoire spatiale : Piscine de Morris.
•La mémoire de travail spatiale : Labyrinthe Y
•La mémoire de travail non spatiale : Reconnaissance d'objets
•La mémoire à long terme : Reconnaissance de reconnaissance de place et évitement passif

Remarque importante : Le nombre d'animaux utilisé dans l'étude a été impacté par la grande mortalité (60 à 40% en fonction de l'âge) des souris Tg2576 au cours du vieillissement en comparaison des souris WT (<10%) et par des erreurs de génotypage des services de zootechnie du site d'hébergement de la lignée (Service l'exploration fonctionnelle, Hôpital Charles Foix, Ivry sur Seine). Au terme du projet, 193 souris WT et 113 souris Tg2576 ont été sacrifiées pour réaliser les différentes analyses. Cependant, dans la publication issue de l'étude (*article 3*) le nombre d'animaux présenté est restreint suite à une demande des reviewers de n'intégrer que les animaux sur lesquels nous avions caractérisé simultanément les dépôts amyloïdes et hémorragies, et réalisé les dosages sériques, limitant ainsi le nombre d'animaux publiés. Les résultats obtenus sur l'intégralité des animaux analysés ou sur le nombre restreint de la publication sont identiques, mais les valeurs statistiques diffèrent.

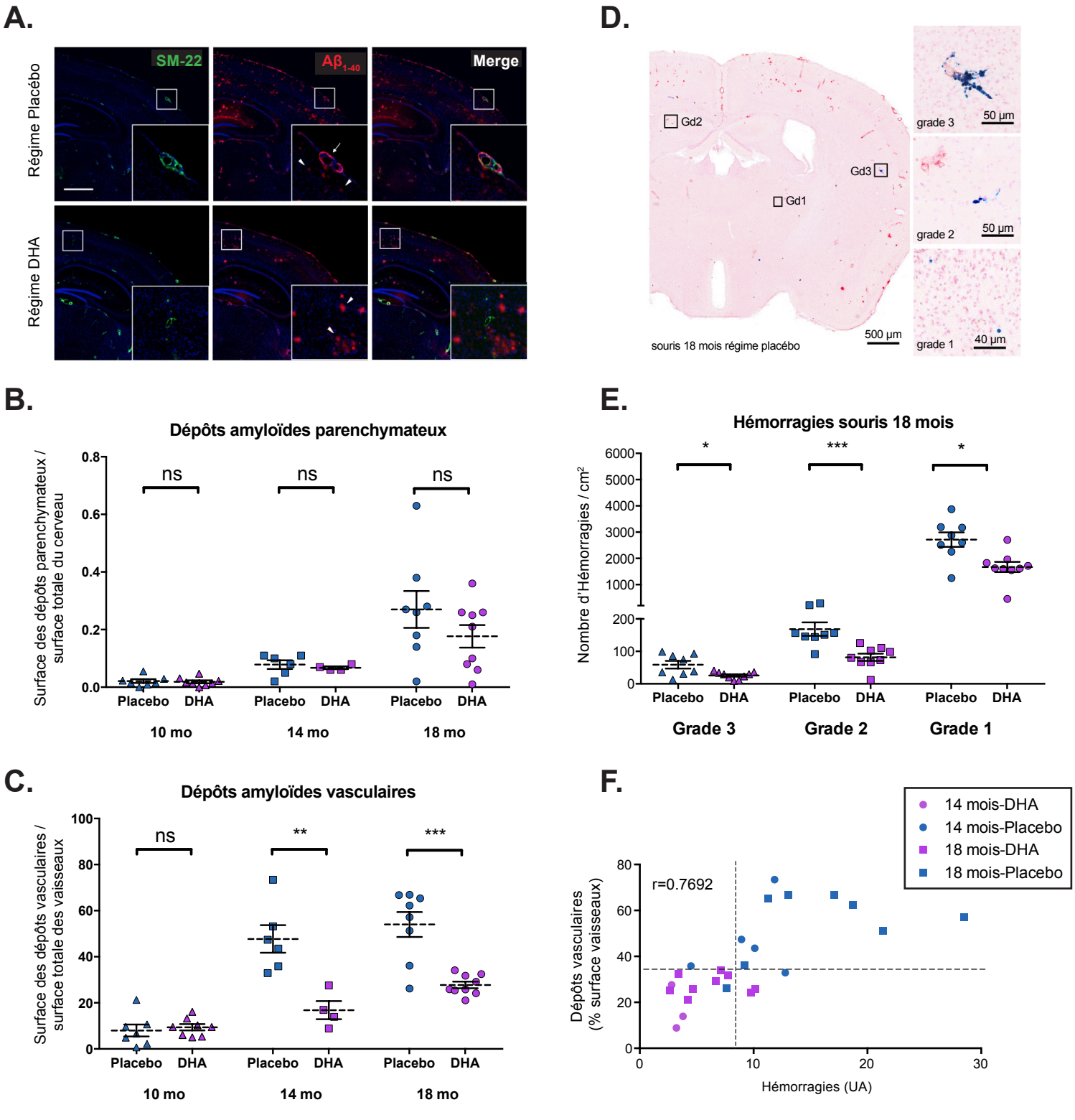

Figure 13. Dépôts amyloïdes et hémorragies cérébrales chez les souris Tg2576 en régime DHA ou placébo.

A. Illustration d'un marquage sur coupe de cerveau de 30µm d'une souris Tg2576 âgée de 18 mois. Les dépôts amyloïdes sont marqués à l'aide d'un anticorps anti-Aβ (bam10). Les vaisseaux sont marqués avec un anticorps anti-SM22 **B.** Quantification des dépôts parenchymateux des souris à 10, 14 et 18 mois. **C.** Quantification des dépôts cérébro-vasculaires des souris à 10, 14 et 18 mois. **D.** Illustration d'un marquage hémorragique de Pearl sur un cerveau de souris Tg2576 âgée de 18 mois en régime placébo. Les noyaux sont colorés au fast-Red, les dépôts amyloïdes sont marqués au rouge congo. **E.** Quantification des hémorragies cérébrales par grade, chez les souris Tg2576 à 18 mois en régime DHA et placébo. **F.** Corrélation entre les dépôts amyloïdes vasculaires et les hémorragies chez les souris de 14 et 18 mois en régime et placébo.

Les données représentent les moyennes des quantifications de l'intégralité de 10 à 12 coupes de cerveau par souris. Les groupes sont comparés par une analyse de variance bi-directionnelle (2-way ANOVA) suivi d'un post test de Bonferroni. *** P<0.001; ** P<0.01; * P≤0.05. Pour la corrélation, la valeur r de spearman est donnée sur la figure.

2.2.2 Résultats.

a. Le régime DHA diminue les dépôts amyloïdes vasculaires et les hémorragies cérébrales, mais pas les dépôts amyloïdes parenchymateux.

La quantification des dépôts amyloïdes vasculaires et parenchymateux (*Figue 13A, B et C* ou *Article 3 Figure 2*), révèle que si le régime en DHA affecte peu les dépôts au niveau du cortex, les dépôts vasculaires sont eux significativement diminués dès 14 mois. La diminution de ces dépôts vasculaires s'accompagne d'une diminution des microhémorragies (de grade 1,2 et 3), révélée par la coloration de Perls (*Figue 13D* et *E* ou *Article 3 Figure 3*). En reportant la quantification des dépôts vasculaires avec celle des microhémorragies pour chaque souris analysée, on remarque qu'il existe une forte corrélation entre ces deux paramètres (coefficient de *Spearman*=0,7692 P<0.001), suggérant une relation de cause à effet entre dépôts amyloïdes vasculaires et microhémorragies cérébrales (*Figure 13F* ou *Article 3 Figure 3*).

b. Les souris en régime DHA présentent une diminution de médiateurs lipides pro-inflammatoires et une vraisemblable augmentation de certains SPM.

Le régime alimentaire des souris DHA versus placebo entraine une modification des taux sériques et érythrocytaires des PUFA ω3 et ω6. Les souris en régime enrichie en DHA présentent des taux de DHA supérieurs aux souris Placébo, ainsi que des taux d'acide arachidonique inferieur (*Figue 14A et B* ou *Article 3 Figure 1*). La prise alimentaire des animaux et leur poids au moment du sacrifice n'étant pas modifié entre régime DHA *versus* Placebo (*Article 3 Figure supplémentaire 1*). L'analyse par LC/MS révèle une diminution de métabolites pro-inflammatoires issus de l'acide arachidonique comme le 8/12-HETE (*Figue 14C* ou *Article 3 Figure 1*), 11-HETE, 15-HETE (*Article 3 Figure 1*) et un dosage sérique de la PGE2 révèle une diminution de PGE2 à 18 mois chez ces mêmes souris (*Figue 14D*). Concernant les SPM issus du DHA, aucunes différences n'ont été observées pour le dosage des SPM de type Lipoxins (LxA4, LxB4), Resolvin D1, Maresin 1 and protectin DX (PDX). Cependant, deux composés non identifiés (unknown-1 et unknown-2) présentent un niveau plasmatique augmenté chez les souris en régime DHA (*Article 3 Figure 1*), les analyses par LC/MS n'ont pas permis de les identifier clairement en raison de l'absence de matrice de référence, mais leur rapport masse/charge (m/z) est identique à celui des lipoxines pour le composé unknown 1 et à celui des Marésines/protectines pour le composé unknown 2 (*Article 3 Figure supplémentaire 3*). Ces deux composés sont très vraisemblablement des métabolites de type lipoxines (dérivé de l'AA) et Maresins/protectines (dérivés du DHA) aux propriétés anti-inflammatoires.

Afin d'établir un lien entre les dosages sériques des médiateurs pro-inflammatoires et la diminution des dépôts amyloïdes vasculaires et microhémorragies, nous avons analysé les corrélations qui pouvaient exister entre ces différents paramètres (*Article 3 Figure 4*). Notamment, il existe une forte corrélation entre le dosage de 8-12 HETE et les dépôts amyloïdes vasculaires (r=0,8442) et les microhémorragies (r=0,8286) (*Figure 14E et F*).

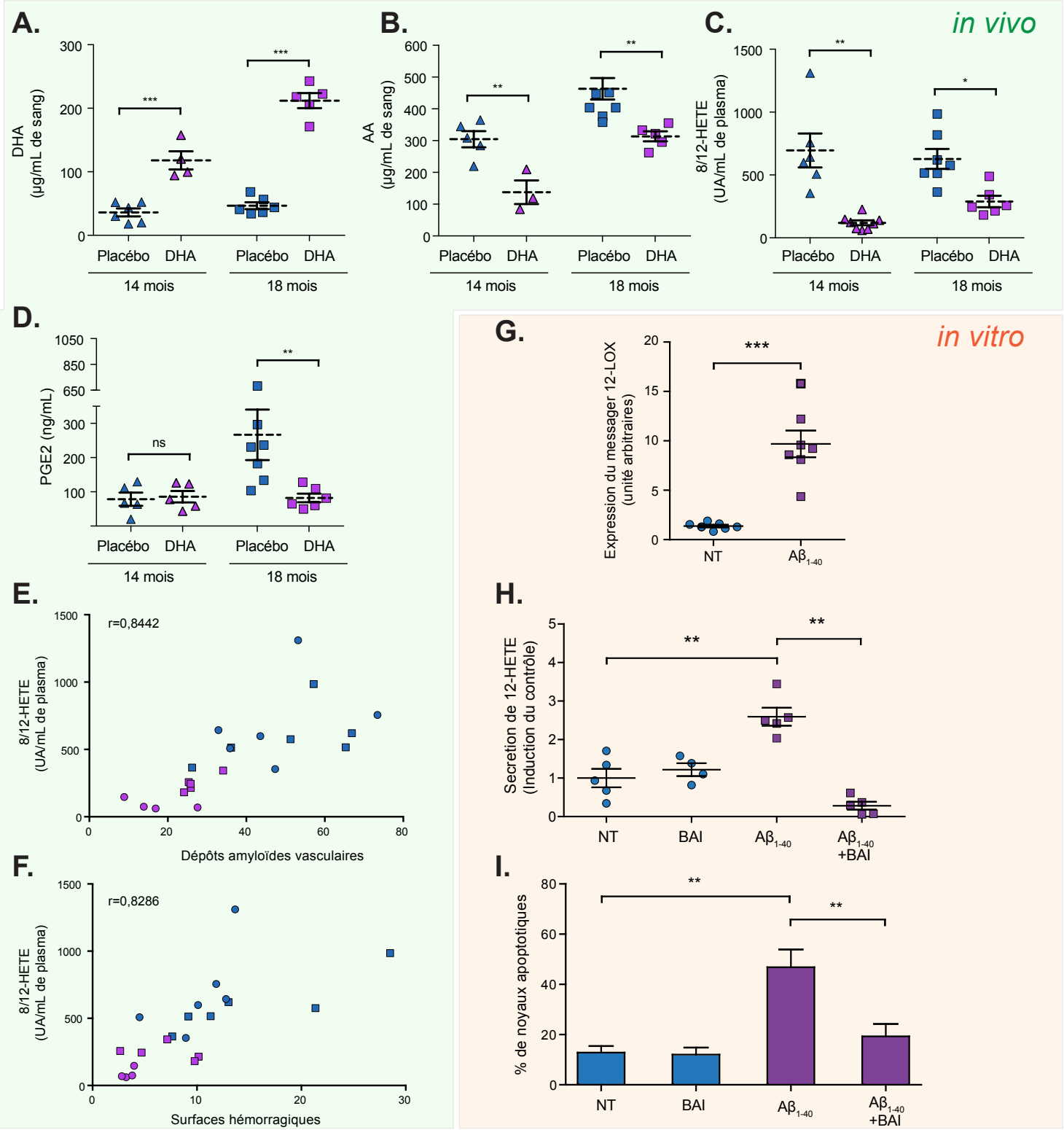

Figure 14. Dosage des médiateurs lipidiques sériques *(panneau vert)* **et effet *in vitro* de la 12-Lox sur l'apoptose induite par le peptide $A\beta_{1-40}$** *(panneau orange).*

(A et B). Analyse des contenus en DHA et acide arachidonique (AA) érythrocytaires des souris Tg2576 en régime placébo ou DHA. **(C et D)**. Analyse des concentrations plasmatiques en 8/12-HETE et PGE2 chez les souris Tg2576 en régime placébo ou DHA. Les valeurs correspondent aux moyennes des dosages individuels par souris. **(E et F)**. Corrélation entre les dosages sériques de 8/12-HETE et la quantité de dépôts amyloïdes vasculaires ou les surfaces hémorragiques. **(G, H et I)**. Des cultures primaires de CMLV de rats ont été traitées pendant 48h avec 50µM de peptide $A\beta_{1-40}$ en présence ou non d'inhibiteur de la 12-Lox (baicalein 100µM). (**G**) Expression relative du messager 12-Lox. (**H**) Dosage de la sécrétion de 12-HETE en EIA. (**I**) Effet de la baicalein sur l'apoptose induite par le peptide $A\beta_{1-40}$ par marquage des noyaux en iodure de propidium et quantification des noyaux apoptotiques en cytométrie de flux.

Les groupes sont comparés par une analyse de variance bi-directionnelle (2-way ANOVA) suivi d'un post test de Bonferroni (**A-D**). Pour la corrélation, les valeurs r de spearman sont données sur les figures (**E et F**). Pour les expériences in vitro (**G-I**) Les groupes sont comparés deux à deux avec un test U de Mann-Whitney pour données non appareillées. *** P<0.001; ** P<0.01; * P≤0.05.

Le 12-HETE, dont les taux sont augmentés dans des modèles de souris et des patients Alzheimer [70, 112] est un métabolite issu de la conversion de l'AA par la 12-lipooxygénase (12-LOX). Les effets cellulaires du 12-HETE demeurent encore aujourd'hui source de débat. Initialement identifié comme un facteur plaquettaire (pour revue voir [113]), le 12-HETE s'avère avoir également des effets pro- et anti-thrombotiques en activant la NADPH oxydase, des effets sur la tonicité vasculaire [113] mais également sur l'inflammation vasculaire [114].

Nous avons donc évalué *in vitro*, sur des cultures primaires de cellules musculaires lisses vasculaires, l'effet du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la production de 12-HETE (*Figure 14E et F* ou *Article 3 Figure 5*). Un traitement des CMLV au peptide $A\beta_{1-40}$ induit une forte augmentation de l'expression du messager codant la lipooxygénase-2, conduisant à une augmentation de la sécrétion de 12-HETE (*Figure 14G et H* ou *Article 3 Figure 5A et B*). L'apoptose induite par le peptide et démontré dans *Article 1*, est fortement diminuée lorsque l'on inhibe l'activité de la 12-LOX et donc la production de 12-HETE (*Figure 14I* ou *Article 3 Figure 5C et D*), suggérant un lien entre les dépôts amyloïdes vasculaires, la production de médiateurs lipidiques pro-inflammatoires de type 12-HETE, une apoptose des CMLV et les microhémorragies cérébrales. Un rôle de la 12-LOX a déjà été mis en évidence dans l'apoptose des neurones corticaux induite par le peptide $A\beta_{25-35}$ [115].

c. Test cognitifs

Deux groupes de 20 souris Tg2576, en régime DHA ou placebo, ont été soumis à des tests cognitifs, ainsi que leurs contrôles WT (également en régime DHA ou placébo) issus des mêmes croissements.

Peu de résultats obtenus sur l'ensemble des tests cognitifs ont été concluants, et plus important, aucunes différences significatives -seulement des tendances- n'ont été observées entre les souris WT et les souris Tg2576 en régime placébo, remettant en question l'ensemble de l'étude cognitive.

Concernant l'effet du régime DHA sur les fonctions cognitives des souris Tg2576 (sans tenir compte donc des scores des souris WT), nous nous sommes également heurtés à des problèmes de significativité, de reproductibilité et de variabilité entre les souris.

Plusieurs raisons peuvent expliquer ces résultats :

- Les animaux présentaient des signes importants de stress notamment pendant les tests de reconnaissance d'objets et piscine de Morris, plus important et plus fréquemment à 10 mois, qu'à 14 et 18 mois (phénomène d'habituation).
- Les animaux Tg2576 sont connu pour être particulièrement actifs et toniques. Le régime DHA augmente clairement les fonctions locomotrices de ces animaux, paramètres essentiels aux tests piscine de Morris et Labyrinthe Y.
- Les souris à 18 mois deviennent paresseuses (habitude aux tests), se révélant moins performantes.
- En raison de la mortalité importante des Tg2576, surtout à 14 et 18 mois, et des erreurs de génotypages du service de zootechnie, le nombre d'animaux dans le groupe Tg2576 au final était beaucoup trop réduit (8 souris pour le groupe Tg2576-placébo et 9 souris pour le groupe Tg2576-

DHA au lieu des 20 initialement prévues par groupe) pour que les tests statistiques puissent être significatifs (One-way ANOVA sur mesures répétées pour l'effet traitement ou génotype. Statistiques en 2-ways ANOVA sur mesures répétées pour effet régime *versus* génotype).

2.2.3 Conclusion.

Nous avons donc démontré que l'apport de DHA chez les souris dès leur plus jeune âge conduit à une diminution des concentrations plasmatiques en métabolites lipidiques pro-inflammatoires et une augmentation de médiateurs lipidiques pouvant contribuer à la résolution de l'inflammation. Cette modification plasmatique en composés lipidiques est corrélée à une diminution des dépôts amyloïdes cérébrovasculaires ainsi qu'avec le nombre et l'étendue des hémorragies cérébrales [116].

L'ensemble de ces travaux nous a permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les altérations vasculaires associées à la maladie d'Alzheimer et les angiopathies amyloïdes cérébrales ; à savoir la dégénérescence des CMLV et l'inflammation vasculaire. L'inflammation joue clairement un rôle dans ces altérations, dont l'effet est potentialisé par le peptide $A\beta_{1-40}$ [117]. Nous avons démontré *in vitro* que les CMLV exposées au peptide $A\beta_{1-40}$ produisent plus de 12-LOX et donc plus de 12-HETE [116]. Les cytokines pro-inflammatoires comme l'IL1β induisant l'expression de la 12-LOX dans les CMLV [114], l'effet potentialisateur du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la réponse inflammatoire induite par l'IL1β [117] pourrait s'expliquer par leurs effets conjugués sur l'expression de la 12-LOX et de COX2 et l'activation de la voie PI_3K/AKT [117, 118]. Si l'apoptose induite par le peptide $A\beta_{1-40}$ [119] semble clairement être dépendante de l'activité de la 12-LOX [117] , les mécanismes moléculaires restent à être identifiés mais pourraient impliquer la production de ROS par les CMLV en réponse au 12-HETE [120], induisant leur apoptose [121]. L'importance de ces médiateurs lipidiques de l'inflammation se retrouve *in vivo* puisqu'il existe une corrélation entre les taux de 12-HETE, les dépôts amyloïdes vasculaires et les microhémorragies cérébrales dans notre modèle de souris.

3. Contribution personnelle et encadrement sur ce projet.

Le projet ayant conduit à l'*article 1* a été proposé et porté par Isabelle Limon auprès le *Pierre Fabre Innovation*. Avec Isabelle Limon, nous avons imaginé et mis en place la stratégie d'étude. J'ai développé l'ensemble des procédures expérimentales, réalisé la majeure partie des expériences, réalisé l'analyse statistique des résultats et co-écrit l'article avec Isabelle Limon. L'*article 2* est issu d'une réflexion avec Isabelle Limon où nous avons imaginé revisiter les expériences habituellement menées au laboratoire sur la transition phénotypique des CMLV par l'IL1β dans l'athérosclérose (voir introduction du projet 2), mais en présence du peptides $A\beta_{1-40}$. Nous avons imaginé, porté et dirigé ce projet. J'ai développé l'ensemble des procédures et stratégie expérimentales et j'ai formé et encadré deux étudiants de M2 qui ont participé à ce projet (Amélie Vromman et Nesrine Trabelsi). Amélie Vromman a poursuivi sa thèse au laboratoire principalement sur la thématique « athérosclérose », mais a continué à travailler sur ce projet en fonction des besoins. Elle a réalisé l'ensemble des révisions demandées par les reviewers sous

mon encadrement et a soutenue sa thèse pour moitié sur ce projet. Amélie Vromman est aujourd'hui Postdoctorante au Brigham and Women's Hospital Department of Medicine à Boston, dans le laboratoire de Peter Libby.

Concernant le projet *in vivo* de l'*article 3*, nous avons imaginé et porté ce projet avec Isabelle Limon auprès de *Pierre Fabre Innovation* qui l'a financé, et nous avons défini ensemble la stratégie de l'étude. J'ai mis en place et géré l'ensemble de l'élevage et des données, et j'ai coordonné le travail avec les partenaires de l'étude (Altomin pour la fabrication à façon des régimes alimentaires, Synelvia pour l'étude des médiateurs lipidiques, Key-Obs pour les tests cognitifs et l'hôpital Charles-Foix pour l'hébergement et les soins aux animaux). J'ai développé et optimisé la majorité des expériences réalisées dans l'étude, effectué toutes les analyses statistiques, et développé des outils informatiques et logistiques pour la gestion et le suivi du projet. Justine Hur est arrivée en M2 au moment des premiers sacrifices des souris. Je l'ai formée sur l'ensemble des approches expérimentales que j'avais mis au point sur ce projet. Justine Hur a assuré, sous mon encadrement et celui d'Isabelle Limon, la totalité des coupes, prélèvements, marquages, acquisitions des données et analyses des résultats, ce qui représente un travail considérable effectué en trois ans. Justine Hur a mis en place et optimisé la technique du marquage de Perls et a, de façon autonome, développé la technique d'isolement du cercle de Willis [93] et la mise en culture primaire des CMLV cérébrales de rat. Après sa thèse soutenue en 2017, Justine Hur a suivi un MBA « Business Administration and Management » au Collège des Ingénieurs de Paris, et est désormais chef de projet chez GRDF (Gaz Réseau Distribution France).

4. Projet de recherche.

L'équipe d'Isabelle Limon a fusionné avec celle de Pierre Vincent en janvier 2019. L'équipe de Pierre Vincent s'intéresse à la signalisation dopaminergique (et donc AMPc) dans le striatum, dans le contexte de la maladie de Parkinson [122–125]. Les deux équipes collaborent étroitement depuis de nombreuses années, notamment au travers de l'utilisation de biosenseurs sensibles à l'AMPc, second messager au cœur de la signalisation dopaminergique et de la transition phénotypique des cellules musculaires lisses vasculaire étudiée dans l'équipe d'isabelle Limon [126–129].

4.1. Contexte

A l'heure actuelle, les quelques molécules approuvées pour le traitement de la maladie d'Alzheimer n'ont démontré que des effets modestes et de courtes durées sur les symptômes cliniques, et aucun n'a montré d'effet net sur la progression de la maladie. Par conséquent, de nouvelles perspectives sur la maladie d'Alzheimer sont nécessaires pour envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La littérature soutient de plus en plus l'existence d'un axe neuro-vasculaire dans la maladie d'Alzheimer et implique des mécanismes vasculaires dans le développement et/ou la progression de la maladie [130, 131].

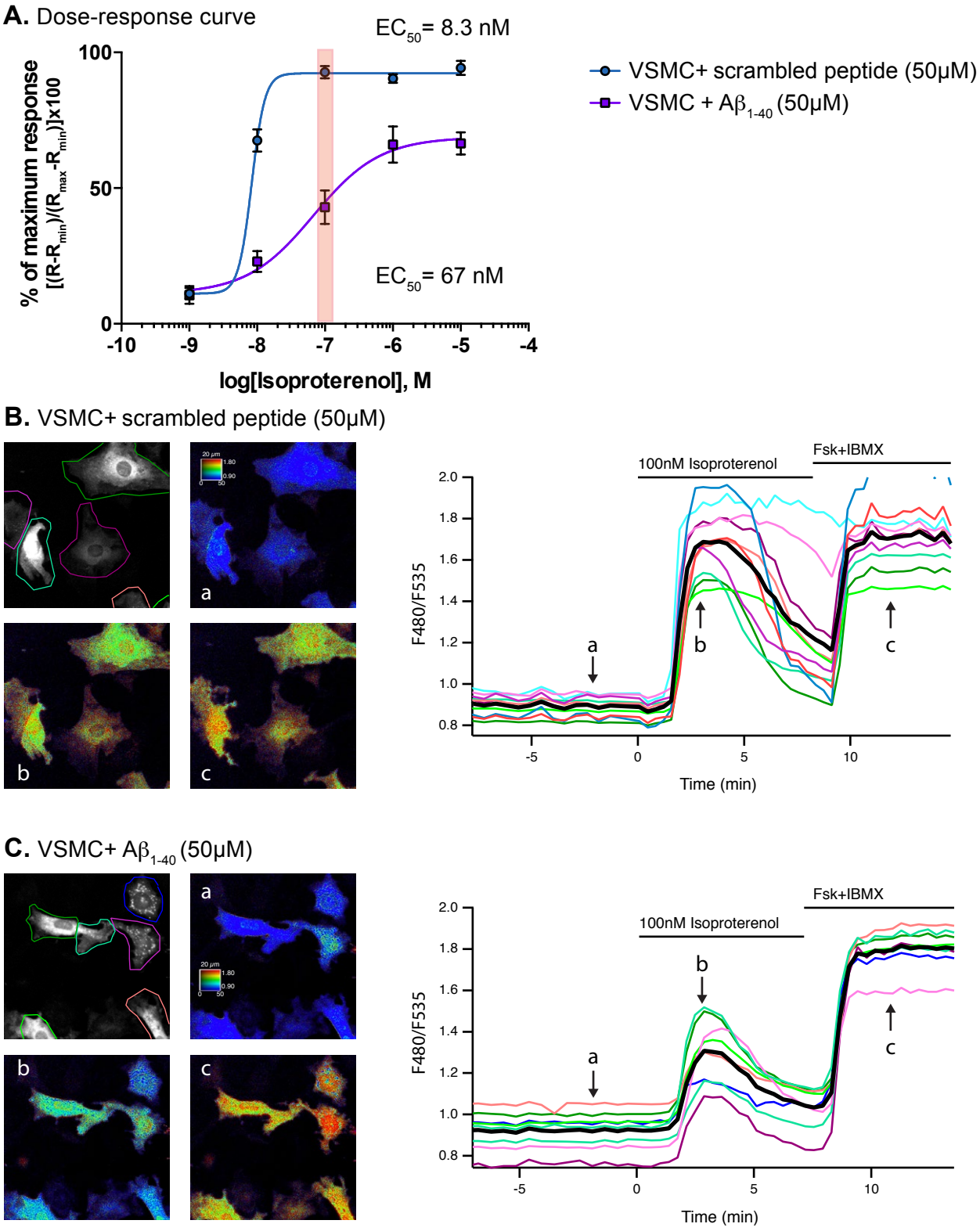

Figure 15. Production d'AMPc par les CMLV naïves et amyloïdes en réponse à l'isoprotérénol .

A. La dose-response de la production d'AMPc en réponse à l'isoprotérénol a été évaluée avec le biosenseur ^{T}EPAC^{VV}, sur des CMLV préalablement traitées pendant 48h par 50µM d'un péptide inversé (Aβ40-1) ou du peptide Aβ1-40. Le pourcentage de la réponse maximale représente le rapport entre la réponse maximale induite par les différentes doses d'isoprotérénol et la réponse maximale (Rmax) du biosenseur obtenue par un traitement final avec 10µM de Forskolin (Fsk) et 200µM d'IBMX. **B, C.** Les modifications des concentrations intracellulaire en AMPc ([cAMP]) on été mesurées avec le bioenseur ^{T}EPAC^{VV} par imagerie à fluorescence sur les VSMC traitées avec le peptide contrôle ou Aβ1-40. Les drogues ont été ajoutées à la solution de perfusion pendant la durée indiquée par les barres sur les graphs. **Panneaux de gauche** : (en haut à gauche) image de microscopie montrant en noir et blanc l'émission de fluorescence à 535 nm. La réponse a été déterminée pour chaque chaque cellule dans les zones de mesure délimitées par les traits de couleur. Le rapport F480/F535, proportionnel à l'activation du biosenseur, a été calculé pour chaque pixel de l'image. Les images en pseudo-couleur représentent le rapport d'émission F480/F535 indicatif de la concentration en AMPC. (a) avant le traitement, (b) en réponse à 100nM d'isoprotérénol, (c) après ajout de 10µM de Fsk et 200µM d'IBMX pour saturer le biosenseur et obtenir le Rmax. Les carrés de calibration (sur les images en haut à droite) indique horizontalement l'intensité de fluorescence (en coup/pixel/sec) et verticalement le rapport F480/F535. **Courbes de droite** : Cinétiques des rapports F480/F535 normalisés pour chaque zone de mesure. Chaque tracé de couleur correspond au rapport d'émission F480/F535 pour chaque cellule au cours du temps. La moyenne des tracés est représentée par le tracé noir épais.

Ces dépôts amyloïdes vasculaires vont altérer les CMLV et conduire à une dérégulation du tonus vasculaire, à une dégénérescence de la paroi des vaisseaux, et en conséquence à des hémorragies intracérébrales [132]. Dans les CMLV, l'équilibre entre les nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) et le calcium détermine leur état fonctionnel ainsi que l'homéostasie vasculaire [133]. La signalisation AMPc joue un rôle central dans la fonction vasculaire et neuronale : dans les CMLV, l'AMPc régule le tonus vasculaire (effet vaso-relaxant) et, dans les neurones, il exerce un rôle clé dans la régulation de l'excitabilité, la plasticité synaptique, ou encore les changements à long terme.

La plupart des artères et des veines, y compris celles du cerveau, sont innervées par des nerfs sympathiques adrénergiques, qui libèrent de la noradrénaline (NE). Certains vaisseaux sanguins sont également innervés par des nerfs cholinergiques sympathiques ou parasympathiques, libérant de l'acétylcholine (ACh). Sur les CMLV, la liaison des neurotransmetteurs aux récepteurs adrénergiques (alpha 1 et 2) provoque une vasoconstriction alors que l'activation des récepteurs cholinergiques ou adrénergiques (beta) induit une relaxation des vaisseaux. Des résultats préliminaires que nous avons obtenus (*Figure 15*), suggèrent que la production d'AMPc par les CMLV en réponse à un agoniste β-adrénergique est diminuée en présence de peptides Aβ. Ce phénomène pourrait être associé à l'hypertension intracrânienne, entraînant un risque accru d'épisodes hémorragiques chez les patients Alzheimer. Cette hypothèse est renforcée par l'étude de Thomas et Coll ayant démontré, sur des aortes de rat exposées au peptides Aβ, que la contractilité des vaisseaux « amyloïdes » en réponse à la noradrénaline ou à l'acétylcholine était modifiée [134].

Les mécanismes moléculaires par lesquels les peptides Aβ conduisent à des altérations vasculaires restent imprécis. Ce projet vise donc à déterminer les modifications adaptatives des voies de signalisation des CMLV résultant d'une exposition chronique au peptide Aβ, conduisant à une altération de l'hémodynamique.

4.2. Objectifs du projet.

- Déterminer *in vitro*, par l'utilisation de biosenseurs, les changements en temps réel dans la dynamique spatio-temporelle d'intégration des signaux AMPc et calciques dans des CMLV cérébrales en culture, exposées au peptide $A\beta_{1\text{-}40}$. Nous évaluerons également la dynamique de ces voies de signalisation *ex vivo*, sur des tranches « vivantes » de cerveau de souris Tg2576.
- Evaluer sur la banque de coupe de cerveau de souris Tg2576 et WT que nous avons générée dans l'étude *in vivo* [116], comment ces changements dans l'intégration des signaux peuvent modifier les éléments clés en aval, cibles du calcium et de l'AMPc.
- Déterminer *ex vivo* comment ces changements de signalisation se traduisent au niveau du tonus vasculaire.
- Restaurer *in vitro* et *ex vivo* l'homéostasie vasculaire par l'utilisation de molécules pharmacologiques ciblant les mécanismes identifiés, visant ainsi à restaurer une signalisation et une tonicité normale.

Ce projet permettra de mieux comprendre les altérations hémodynamiques associées à la maladie d'Alzheimer et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

4.3. Méthodologie.

• Les CMLV cérébrales de rat seront isolées du cercle cérébral artériel de Willis [93] et seront exposées au peptide $A\beta_{1-40}$. La dynamique des voies de signalisation en réponse aux vaso-modulateurs sera évaluée en temps réel à l'aide de biosenseurs optiques. Pour l'imagerie du calcium et de l'AMPc, nous utiliserons respectivement les biosenseurs génétiquement codés Twitch [135] et $^{T}Epac^{VV}$ [136]. Pour le GMPc, Pierre Vincent a développé un nouveau biosenseur avec le laboratoire d'O.Griesbeck. Le bilan de l'activation des voies nucléotidiques (AMPc, GMPc) et calcique, va déterminer l'état de phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC_{20}) et par conséquent le phénotype constricteur ou relaxant des CMLV. Nous suivrons donc l'état de phosphorylation de la MLC_{20} en temps réel à l'aide du biosenseur CRCit [137] .

• Notre banque de tranches de cerveau du modèle de souris Tg2576 (à 10, 14 et 18 mois), générée lors de l'étude in vivo [116], sera utilisée pour détecter l'activation des effecteurs en aval de ces voies de signalisation, éléments clés de la contractilité des CMLV (par exemple, MLC_{20}, ERK, AKT) par immunomarquage.

• Afin d'étudier les conséquences de ces dépôts sur l'hémodynamique cérébrale, la réactivité d'anneaux de 2 mm de l'artère basilaire de rat, isolée et exposés aux peptides $A\beta_{1-40}$, sera mesurée avec un myographe (DMT, 620M Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark) adapté pour la mesure de la contractilité des petites artères [138, 139], en collaboration avec Véronique Leblais et Boris Manoury (UMR-S 1180, « signalisation et physiopathologie cardiovasculaire », Université Paris-Sud). Nous étudierons également les réponses vasculaires à différentes contraintes de flux et de pression (dilatation au flux et tonus myogénique). Les anneaux artériels seront canulés et mis sous pression sur un artériomyographe récemment acquis par Véronique Leblais, ce qui permettra d'étudier les réponses aux vasomodulateurs et établir des courbes dose-réponse.

• Après identification dans les CMLV « amyloïdes », des acteurs clés dans la modulation de la réponse aux vaso-modérateurs, nous évaluerons la capacité d'agonistes sélectifs, d'antagonistes et d'inhibiteurs d'enzymes à restaurer l'état fonctionnel physiologique des CMLV.

En conclusion, ce projet *in vitro* et *ex-vivo* nous permettra i) de déterminer les voies de signalisation activées par les vaso-modulateurs et altérées dans les CMLV en contexte amyloïde, ii) d'évaluer la sévérité des altérations en comparant les paramètres pharmacologiques (E_{max}, EC_{50}) des réponses aux vaso-modulateurs en condition normale et pathologique, iii) de mesurer l'impact du peptide $A\beta_{1-40}$ sur la régulation du tonus vasculaire et iv) de définir une stratégie pharmacologique afin de restaurer les paramètres hémodynamiques physiologiques.

Projet 2 : « Remodelages vasculaires pathologiques et AC8 »

1. Introduction

1.1. Les CMLV au cœur des remodelages vasculaires pathologiques

1.1.1 Les CMLV dans l'athérosclérose

L'athérosclérose est initiée suite à des agressions multifactorielles et complexes de l'endothélium vasculaire [140]. Suite à l'infiltration de lipoprotéines de faible densité ou *LDL* dans l'espace sous-endothélial et à leur oxydation, les cellules endothéliales vont acquérir un phénotype inflammatoire conduisant à l'expression d'un large éventail de molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1) et de facteurs de croissance (MCP-1, M-CSF). Ces molécules vont entrainer le recrutement et l'infiltration de monocytes circulants (diapédèse), qui vont se différencier en macrophages, phagocyter les LDL oxydées et ainsi devenir des cellules spumeuses (cellules chargées en lipides). Les cellules endothéliales et les macrophages infiltrés vont ainsi produire de nombreux facteurs de croissance (PDGF, TGFβ), des cytokines pro-inflammatoires (IL1β, TNFα, IFNγ), des espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'origine de l'installation d'une inflammation à bas bruit et du développement de la plaque athéromateuse. L'accumulation progressive des macrophages spumeux est à l'origine de la formation des stries lipidiques, et leur apoptose va constituer leur cœur « nécrotique » ou « lipidique », retrouvé dans les lésions plus complexes. L'évolution de ces lésions vers des lésions plus complexes implique également les cellules musculaires lisses vasculaires ou CMLV [141]. Sous l'influence des cytokines et facteurs de croissances sécrétés dans l'espace sous-endothélial, les CMLV vont migrer de la média vers l'intima, et y subir de profondes modifications phénotypiques [2, 142] participant ainsi au développement de lésions athéromateuses plus complexes (Figure 16) :

- Les CMLV peuvent phagocyter les LDL-ox et se transformer en cellules spumeuses, à l'instar des macrophages, participant ainsi à la formation du cœur nécrotique de la plaque.
- D'autres CMLV vont acquérir un phénotype matrigénique sécrétant des protéines constituantes de la matrice extracellulaire (collagène, élastines, protéoglycanes) élaborant ainsi la chape fibreuse consolidant le cœur lipidique.
- Les CMLV peuvent également acquérir un phénotype pro-inflammatoire, sécrétant ainsi divers cytokines (IL-1, IL-6, IL-8), chimiokines (MCP1, CCL3, CCL5,CXCL2) et médiateurs lipidiques pro-inflammatoires (PGE2), amplifiant ainsi l'inflammation chronique.
- A des stades plus avancés de l'athérogenèse, les CMLV peuvent acquérir un phénotype ostéoblastique ou chondrogénique, contribuant à la calcification de la plaque, mais peuvent également sécréter des métalloprotéases matricielles, deux phénomènes impliqués dans la déstabilisation et la rupture de la plaque.

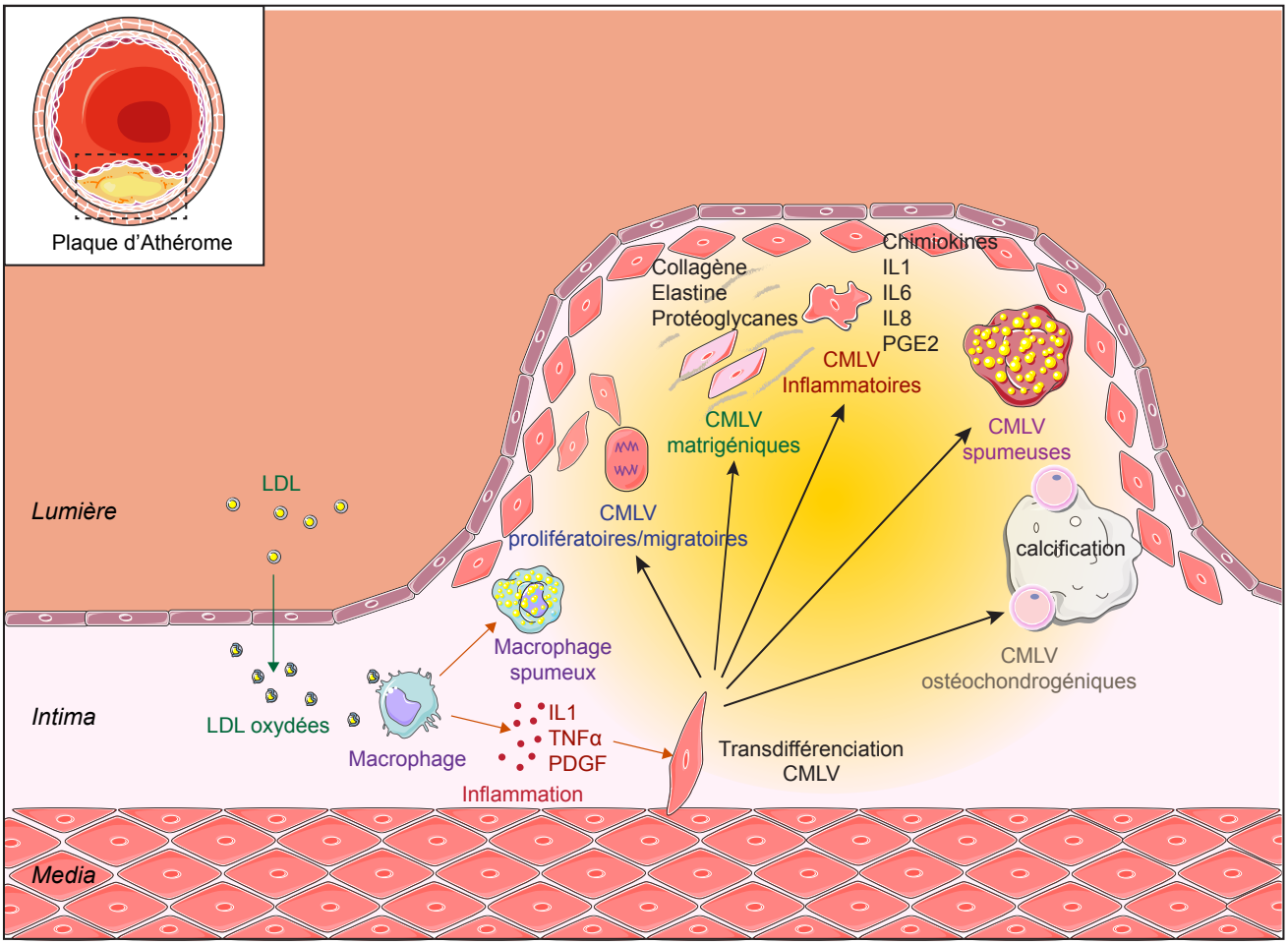

Figure 16. Phénotypes des cellules musculaires lisses vasculaires au cours de l'athérogenèse.

CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires, LDL, Lipoprotéines de basse densité ; IL1, interleukine-1; IL6 , interleukine-6 ; IL8, interleukine-8 ; PGE2, prostaglandines de type E2 ; TNFα, facteur de nécrose tumorale α .

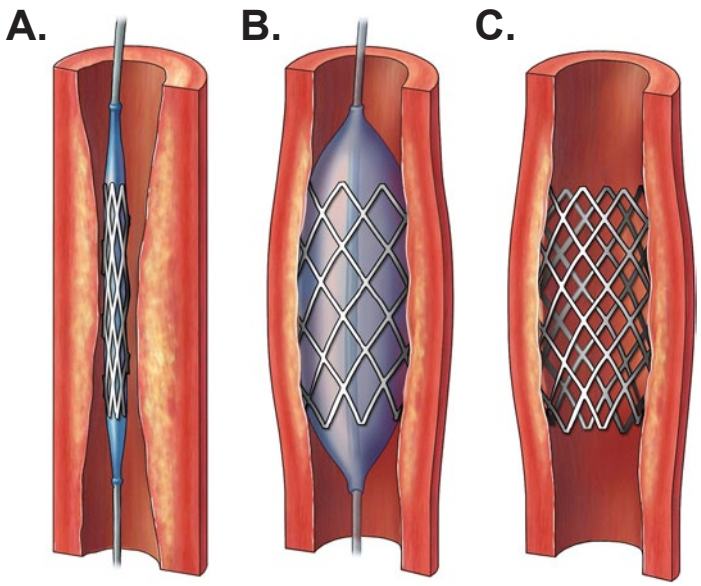

Figure 17. Angioplastie au ballonnet avec pose d'endoprothèse

Représentation schématique d'une angioplastie à ballonnet (ou percutanée). **A.** Un cathéter muni d'un ballonnet gonflable et serti d'une endoprothèse grillagée et rétractée est introduit dans l'artère lésée. **B.** Le ballonnet est gonflé et écrase la plaque d'athérome contre la paroi, réduisant ainsi la sténose de l'artère. **C.** Le gonflement du ballonnet permet de déployer l'endoprothèse qui va rester en place après le retrait du cathéter, prévenant ainsi le risque de resténose précoce.

1.1.2 Les CMLV au cœur de la resténose post-angioplastie.

Lorsque l'athérosclérose devient symptomatique, une intervention est pratiquée afin de réduire la lésion (écrasement de la lésion à l'aide d'un ballonnet gonflable) et de restaurer la circulation (*Figure 17*). Cette angioplastie à ballonnet s'accompagne dans 90% des cas de la pose d'une endoprothèse (ou stent) afin de maintenir l'artère ouverte. Dans le mois qui suit l'intervention, un thrombus intra-luminal mineur apparait, ainsi qu'une infiltration de cellules inflammatoires et l'on observe une prolifération et une migration de cellules musculaires lisses, qui vont former une néo-intima. Cette néo-intima correspond à un tissu cicatriciel physiologique qui va permettre la re-endothélisation nécessaire à la restauration des fonctions anti-inflammatoires, anticoagulantes et antithrombotiques de l'endothélium. Cependant, dans environ 20% des cas, ce tissu cicatriciel devient excessif et un re-rétrécissement du vaisseau apparait, c'est la resténose intra-stent [143]. Cette resténose correspond à une hyperplasie néo-intimale, conséquence d'une prolifération et d'une migration excessive des CMLV [144] en réponse à la réaction inflammatoire liée à la présence du stent mais également aux contraintes mécaniques qu'il impose, ainsi qu'à une activation plaquettaire. Cette inflammation et cette activation plaquettaire vont être à l'origine de la sécrétion de facteurs antithrombotiques et de facteurs mitogènes (PDGF, thromboxane A2), puissants inducteurs de la prolifération et de la migration des CMLV [145]. C'est pourquoi il est aujourd'hui recommandé l'utilisation de stents actifs (ou drug-eluting stents) qui délivrent des molécules antiprolifératives évitant ainsi les risques de resténoses, associés à des traitements antiagrégants plaquettaires [146]. Cependant, les traitements antiplaquettaires augmentent les risques hémorragiques et les agents antiprolifératifs empêchent une ré-endothélisation complète et altèrent les fonctions endothéliales [147], la cicatrisation physiologique incomplète du vaisseau favorisant ainsi l'apparition de thrombose intra-stent aux conséquences dramatiques.

Aujourd'hui, la recherche sur les stents s'oriente vers l'utilisation de nouveaux polymères ou de stents bio-résorbables [148], mais également des stents pro-cicatrisants, afin d'éviter les risques de thrombose et de réduire la durée des traitements antiplaquettaires. Une autre stratégie consisterait cibler les mécanismes prolifératifs et migratoires spécifiques des CMLV, sans affecter la ré-endothélisation, comme cela est le cas avec les stents actuels.

Dans cette optique, le laboratoire d'Isabelle Limon s'intéresse depuis une quinzaine d'année à identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la transition phénotypique des CMLV et ainsi mettre en lumière de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

1.2. Importance de l'AMPc dans des CMLV.

Dans les CMLV comme dans beaucoup d'autres types cellulaires, l'AMPc joue un rôle central dans l'intégration et la réponse des signaux extracellulaires. La spécificité des signaux transduits tient dans la compartimentalisation spatiotemporelle de L'AMPc, impliquant différents acteurs modulants sa production ou sa dégradation [149]. L'AMPc est produit à partir de l'ATP grâce à des enzymes membranaires complexes, les adénylyl cyclases (AC), dont l'activité va être

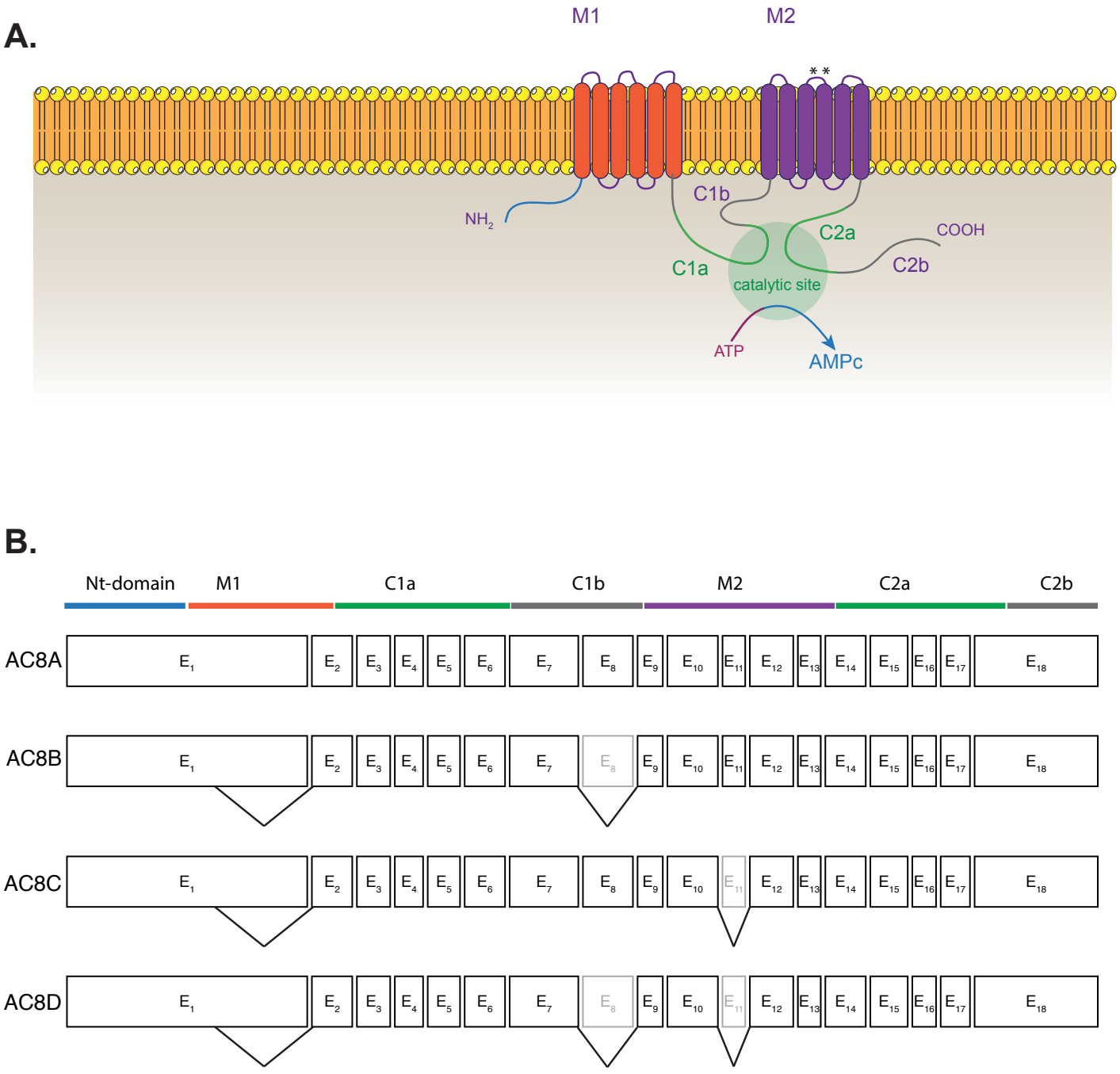

Figure 18. Représentation schématique de l'AC8 pleine taille (AC8A) et de ses variants.

A. Représentation schématique de l'AC8A, composée de deux cassettes M1 et M2, chacune comprenant 6 domaines transmembranaires. Le site catalytique est formé par l'association des domaines C1a et C1b. La région N-terminale est impliquée dans la régulation de l'activité de l'AC8A, positivement par la complexe Ca^{2+}/Calmoduline et négativement par la PKA associée à AKAP79.

B. Représentation des exons codant les quatre variants de l'AC8, la correspondance entre les exons et les domaines protéiques est donné par les barres colorées. Le variant B est délété de l'exon 8, codant une portion du domaine C1b. Le variant C est délété de l'exon 11 codant la deuxième boucle extracellulaire de la cassette M2. Le variant D possède les deux délétions.

modulée principalement par l'activation de récepteurs à sept domaines trans-membranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (RCPG), mais aussi par le calcium ou différentes protéines kinases [150].

Les principales AC exprimées dans les CMLV contractiles et quiescentes sont les AC3, 5 et 6 [151]. L'AMPc va activer directement trois principaux effecteurs, la protéine kinase A (PKA), les facteurs d'échange des nucléotides guanyliques activés par l'AMPc (EPAC1 et EPAC2) et les canaux ioniques activés par les nucléotides cycliques (CNG). L'activation de ces effecteurs va moduler de façon directe ou indirecte (cross-talk) de très nombreuses voies de signalisation impliquées dans les réponses physiologiques et physiopathologiques des cellules à leur environnement. L'interruption des signaux des nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) est assurée par les phosphodiestérases (PDE) qui vont hydrolyser l'AMPc et le GMPc en AMP et GMP respectivement [152], alors que les transporteurs MRP assurent l'export de l'AMPc et du GMPc hors de la cellule [153]. Si la signalisation AMPc joue un rôle majeur dans la régulation du tonus vasculaire [133], Il a aussi un rôle de premier ordre dans le maintien du phenotype contractile et quiescent (voir chapitre 1.3.2).

1.3. L'Adenylyl cyclase 8, un acteur clé de la transition phénotypique des CMLV.

1.3.1 Données générales sur l'AC8

L'AC8 est une protéine de 1248 acides aminés chez le rat (*Figure 18A*). Elle est constituée de deux cassettes à six domaines transmembranaires, les cassettes M1 et M2. L'activité catalytique de l'AC8 est assurée par l'hétérodimérisation des domaines C1a et C2a, tandis que les régions C1b, C2b ainsi que la région N terminale, sont impliquées dans la régulation de son activité. L'AC8 n'est pas une cyclase sensible aux protéines G hétérotrimériques [154, 155] mais est très sensible au complexe Ca^{2+}-Calmoduline qui l'active [156]. Initialement identifiée dans le cerveau de rat [157], cette AC8 pleine taille a été nommée AC8A et est codée par 18 exons sur le chromosome 7 chez le rat. Trois variants d'épissage ont été identifiés et nommés AC8B, C et D (*Figure 18B*). Ces variants sont délétés de l'exon 11, de l'exon 8 ou des deux, respectivement [157, 158].

Les rares études menées sur l'expression de l'AC8 chez l'homme, cantonne son expression principalement dans le cerveau, mais aussi dans le testicule [159]. Chez les rongeurs, outre son expression dans le cerveau, l'AC8 est retrouvée dans les cellules β-pancréatiques et est impliquée dans les mécanismes de sécrétion de l'insuline [160].

1.3.2 L'AC8 impliquée dans la transition phénotypique des CMLV

Lors de travaux ayant précédé mon arrivée au laboratoire, l'équipe d'Isabelle Limon avait démontré *in vitro*, que la transdifférenciation des CMLV de rat induite par l'IL1β, vers un phénotype migratoire et inflammatoire, s'accompagnait de l'expression de l'adénylyl cyclase 8 [127]. Absente dans les CMLV quiescentes et contractiles, son expression induite par l'IL1β est dépendante de l'inhibition de la voie Notch [161]. Le laboratoire a démontré *in vivo*, l'implication de l'AC8 dans les remodelages vasculaires pathologiques chez l'homme, la souris et le rat [128, 141]

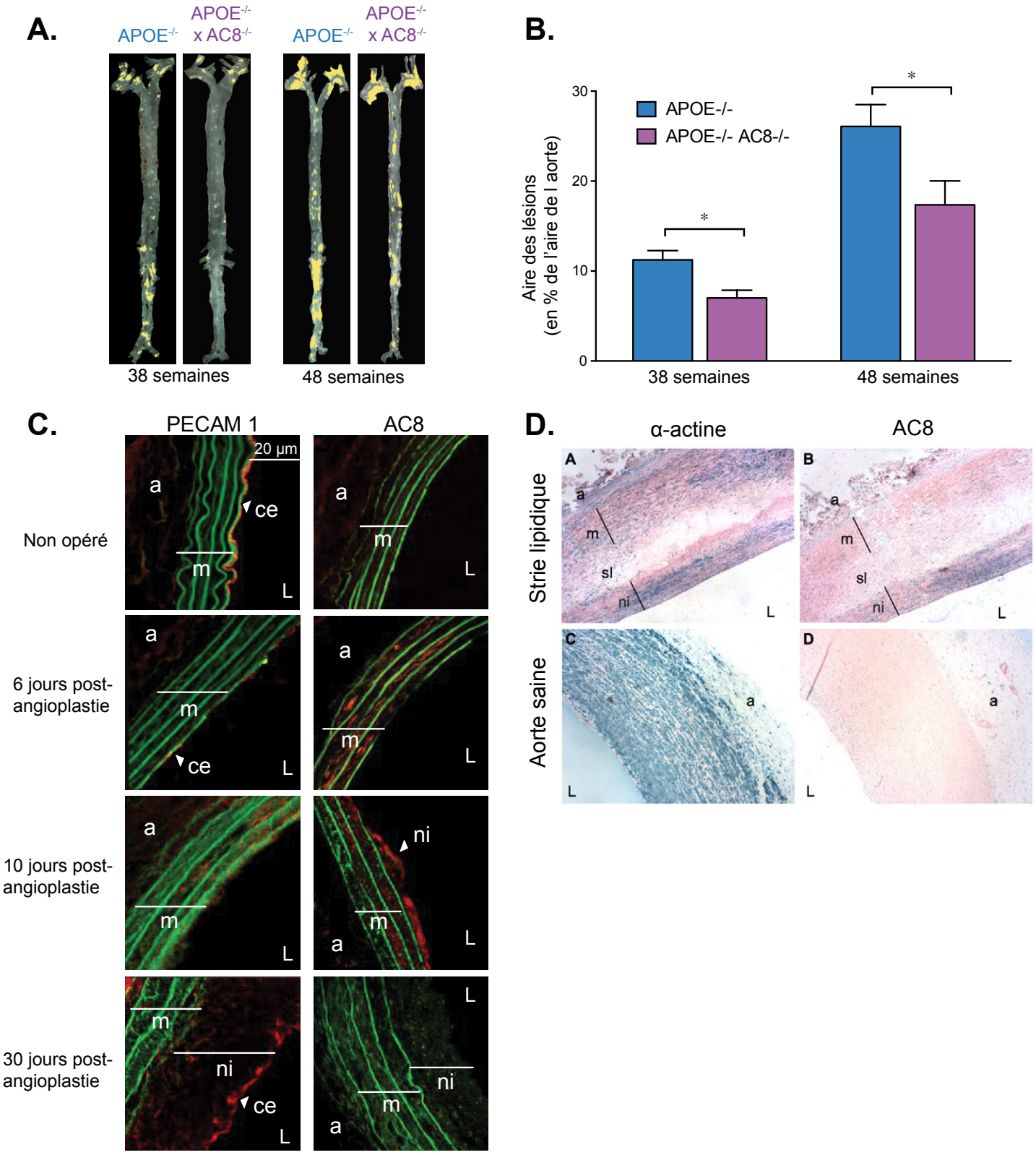

Figure 19. Evidences de l'implication *in vivo* de l'AC8 dans les remodelages vasculaires pathologiques chez la souris, le rat et l'Homme.

(A, B) Lésions athérosclérotiques (en jaune, **A**) chez les souris ApoE$^{-/-}$ et ApoE$^{-/-}$/AC8$^{-/-}$ âgées de 38 et 48 semaines, dans les aortes en faces ouvertes (**B**) Quantification de l'aire lésée en pourcentage de l'aire totale. Les données correspondent aux moyennes des aires lésées +/- SEM pour chaque groupe (n = 8 à 12). *P < 0,05 par rapport aux souris ApoE-/-.

(C) Immunofluorescences réalisées sur des coupes de carotides de rats non opérés ou 6, 10 et 30 jours après angioplastie au ballonnet. Marquage de PECAM1 (marqueur endothélial) et de l'AC8. L'autofluorescence de l'élastine est observée en vert. Abréviations : a, adventice ; m, média ; ni,néointima. L, lumen ; ce, cellules endothéliales.

(D) Immunohistochimie sur coupes sériées d'aortes humaines présentant des lésions athérosclérotiques précoces (stries lipidiques ou dites de type II selon la classification de Stary, 1992) et saines à l'aide d'un anticorps anti-actine-α et anti-AC8. Abréviations : a, adventice ; m, média ; ni,néointima. L, lumen ; sl, strie lipidique.

Illustrations tirées de Gueguen et al., J Pathol 2010 et Gueguen et al., Biol Aujourd'hui 2016.

(*Figure 19*). Dans un modèle transgénique murin d'athérosclérose (souris ApoE$^{-/-}$), l'invalidation de l'AC8 (souris ApoE$^{-/-}$ x AC8$^{-/-}$) diminue l'étendue des lésions athérosclérotiques (*Figure 19A et B*). Dans un modèle de resténose post-angioplastie chez le rat (rat balloon-injured), l'AC8 est exprimée de façon transitoire dans les CMLV néointiales, mais demeure absente dans les carotides saines (*Figure 19C*). Chez l'homme, un marquage positif à l'AC8 est retrouvé au niveau des CMLV néointimales d'aorte présentant des lésions athérosclérotiques (*Figure 19D*). *In vitro*, les travaux de l'équipe ont démontré que l'invalidation de l'AC8 inhibe la migration des CMLV induite par l'IL1β [128].

De très nombreuses études associent la production d'AMPc à un mécanisme athéro-protecteur et contribue au maintien de l'état différencié des CMLV, par exemple :

- En favorisant l'expression des marqueurs contractiles [162],
- En inhibant la synthèse de la cytokine pro-inflammatoire TNFα [163],
- En inhibant la captation du cholestérol, élément clé de l'acquisition du phénotype spumeux [164],
- En inhibant *in vitro* la prolifération [165] et la migration [166], mais également *in vivo* [167].

De ce fait, nous nous sommes heurtés à un **paradoxe** : comment rendre compatible l'expression d'une adénylyl cyclase au cours de la transition phénotypique des CMLV avec le rôle protecteur de l'AMPc.

1.4. Historique et objectif du projets.

Afin d'appréhender ce paradoxe, il était donc nécessaire de comprendre de quelle façon l'AC8 était régulée au niveau de son expression et de son activité, et comment elle pouvait impacter la production d'AMPc au cours de la transdifférenciation.

A la fin du projet *in vitro* sur la maladie d'Alzheimer et pendant la mise en place du projet *in vivo* sur les souris Tg2576, j'ai commencé à étudier les mécanismes de régulation de l'expression de l'AC8 dans les CMLV traitées à l'IL1β. En me basant sur les travaux de deux équipes [168, 169], j'ai cloné 4,4kb du promoteur de l'AC8 de rat en amont de la luciférase afin d'évaluer l'activité de ce promoteur « minimum » dans les CMLV contractiles et transdifférenciées à l'IL1β (CMLVtd). De façon attendue, ce promoteur était parfaitement fonctionnel dans des cellules neuronales (PC12) comme cela avait été précédemment décrit [168], mais ne l' était pas, ni dans les CMLV contractiles, ni dans les CMLVtd (R.Blaise et I.Limon, résultats non publiés). Ce résultat pouvait s'expliquer soit par la nécessité de région(s) régulatrice(s) suitée(s) en amont de ces 4,4kb de promoteur, soit par l'existence d'un promoteur alternatif. En effet, de nombreux gènes exprimés dans le cerveau et les testicules (comme l'AC8), utilisent des promoteurs alternatifs dans ces deux tissus [170–172]. Aussi, si le promoteur que nous testions n'était pas le bon, alors la région 5'UTR du transcrit AC8 devait être différente entre le cerveau et les CMLVtd.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé un clonage de la région 5' UTR par RACE-PCR[1] sur les transcrits AC8 exprimés dans les PC12 et les CMLVtd. Nous avons obtenu des produits de PCR dans les deux types cellulaires, indiquant ainsi que la région 5'UTR des messagers AC8 dans le cerveau et les CMLVtd était identique. Cependant, nous observions une taille du produit de PCR très légèrement inférieure dans les CMLVtd, suggérant l'existence d'un variant AC8 particulier exprimé dans les CMLV.

Nous avons donc développé avec isabelle Limon, un projet visant **à identifier et à caractériser cette nouvelle AC8** dans les CMLVtd, et à comprendre **son implication dans les transitions phénotypiques** que subissent les CMLV dans les remodelages vasculaires pathologiques. Sur ce projet, j'ai encadré quatre étudiants de Master 2 (**Benjamin Vallin** en 2013, **Yohan Legueux-Cajgfinger** en 2017, **Eda Saylam** en 2018 et **Emilie Wong Chong** en 2019). **Benjamin Vallin** a poursuivi en thèse dans le laboratoire (2013-2017), thèse que j'ai co-dirigé avec Isabelle Limon, et dont le travail constitue la majeure partie des résultats présentés sur cette thématique dans ce manuscrit. **Yohan Legueux-Cajgfinger** réalise son doctorat sur la suite de cette thématique (soutenance prévue fin 2020) sous la direction d'Isabelle Limon, avec qui je co-encadre son travail. Le travail de **Yohan Legueux-Cajgfinger** constitue une importante partie du projet de recherche présenté à la suite des résultats.

La principale publication issue de cette étude est en annexe du document (*article 4*). Comme pour la partie précédente, les principaux résultats de ce travail sont présentés sous la forme de *figures* synthétiques en vis à vis du texte, mais font référence à des résultats plus complets présentés dans l'*article 4* et ses figures supplémentaires.

2. Principaux résultats

2.1. Identification et clonage des AC8 exprimées dans les CMLVtd.

Le clonage et le séquençage des cDNA AC8 exprimés dans les CMLVtd ont révélé l'existence de quatre nouveaux variants de l'AC8, nommés AC8-E, F, G et H (*Article 4 Figure 1A*). Tous ces variants, absents des CMLV contractiles ou du cerveau, présentent en commun une délétion de 414 pb entre l'exon 1 et l'exon 2, due à un épissage alternatif, qui conserve le cadre de lecture de la protéine (*Article 4 Figure 1B*). L'AC8E ne présente que la délétion de 414pb et reste parfaitement identique à l'AC8A sur le reste de sa séquence. L'AC8F et G possèdent en plus une délétion de l'exon 8 et 11 respectivement, comme dans pour AC8C et l'AC8B. L'AC8H présente la double délétion exon 8 / Exon 11 comme décrit dans l'AC8D (*Article 4 Figure 1C* et *Figure supplémentaire S1*).

[1] La RACE-PCR consiste à greffer en 5' d'un messager, un oligonucléotide simple brin de séquence universelle. Après la reverse transcription des ARNm, Deux PCR classiques sont réalisées, une avec une amorce sens spécifique de la séquence oligonucléotidique ajoutée, l'autre avec une amorce sens spécifique de la région 5'UTR publiée de l'AC8. Les deux PCR se font avec une amorce anti-sens spécifique de l'AC8. Les produits de PCR obtenus contiennent donc l'intégralité ou une partie de la séquence 5'UTR des transcrits étudiés.

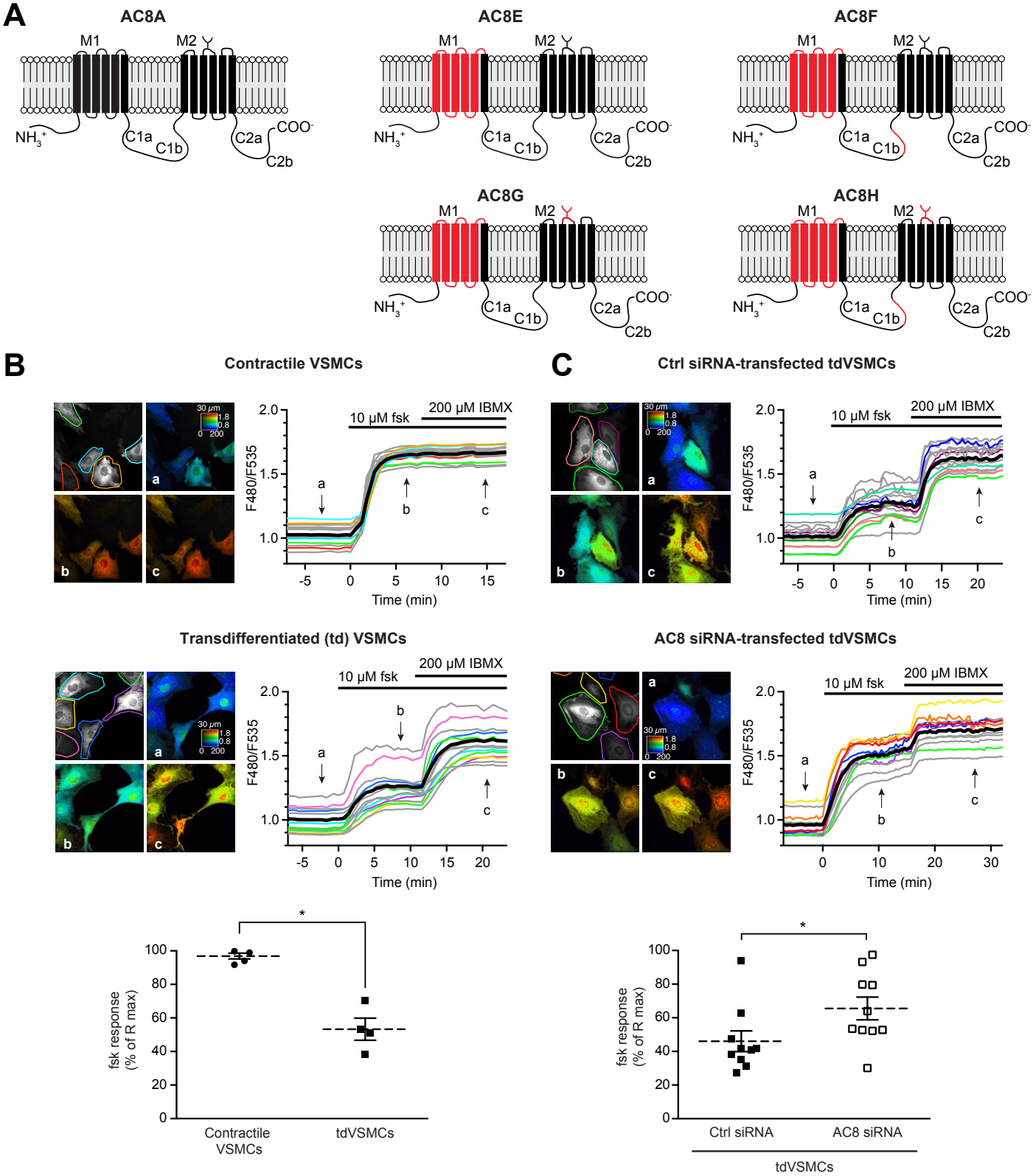

Figure 20. Représentation schématique de l'AC8 pleine taille (AC8A) et de ses variants et conséquence de leur expression sur la dynamique de production d'AMPc

A. Représentation schématique des domaines protéiques des AC8E, F, G et H en comparaison de l'AC8A. Toutes les AC8E-H présentent une délétion de 414 pb à la fin de l'exon 1, correspondant à la délétion des 5 premiers domaines trans-membranaires de la cassette M1 (en rouge). Le variant AC8F possède également une délétion (en rouge) dans le domaine C1b correspondant à l'exon 8, l'AC8G présente également une délétion de l'exon 11, codant la deuxième boucle extracellulaire de l'AC8, contenant deux sites de myristylation. Le variant AC8G possède en plus de la délétion partielle de l'exon 1, les délétion des exons 8 et 11.

B, C. Modification des concentrations intracellulaires en AMPc dans des CMLV contractiles *versus* tdCMLV (**B**) et dans des tdCMLV exprimant un siRNA contrôle *versus* un sRNA ciblant l'AC8. **Panneaux de gauche** : image de microscopie montrant en noir et blanc l'émission de fluorescence à 535 nm. Le rapport F480/F535 (proprotionnel à la concentration en AMPc) a été déterminée pour chaque chaque cellule dans les zones de mesure délimitées par les traits de couleur. Les images en pseudo-couleur représentent le rapport d'émission F480/F535. (a) avant le traitement, (b) en réponse à 10µM de forskoline, (c) après ajout de 10µM de fsk et 200µM d'IBMX. **Courbes de droite** : Cinétique des rapports F480/F535 normalisés pour chaque zone de mesure. Chaque tracé de couleur correspond au rapport d'émission F480/F535 pour chaque cellule au cours du temps. La moyenne des tracés est représentée par le tracé noir épais.Dot plot: Quantification de la réponse moyenne des cellules à la forskoline en % de la réponse maximale de 4 à 10 expériences indépendantes. Test non paprmétrique de Mann-Whitney, *P<0.05

Cette délétion se traduit au niveau protéique par une délétion des 5 premiers domaines trans-membranaires de la cassette M1 (*Figure 20A* et voir *l'Article 4 Figure supplémentaire S3*) pour les séquences protéiques).

2.2. Implication des AC8E-H dans la dynamique de production d'AMPc.

Afin d'étudier la dynamique de production d'AMPc dans les CMLV, nous avons choisi d'utiliser le biosenseur ^{T}EPAC^{VV} dont le fonctionnement repose sur le principe du FRET [136], exprimé à l'aide d'un adénovirus de type 5 dans les CMLV [126]. La dynamique de production d'AMPc est altérée dans les CMLVtd par rapport aux CMLV contractiles. En effet la réponse à la forskoline, un activateur non sélectif des adenylyl cyclases, est diminuée dans les CMLVtd (*Figure 20B* et *Article 4 Figure 2A*) et implique clairement les AC8E-F puisqu'une invalidation de l'expression des AC8 dans les CMLVtd restaure une réponse quasi-normale à la forskoline (*Figure 20C* et *Article 4 Figure 2B*). Ce résultat confirme d'une part la diminution de la production d'AMPc dans la transition phénotypique des CMLV, et incrimine d'autre part des adénylyl cyclases (AC8E-H) dans ce processus, confirmant ainsi le paradoxe présenté plus haut.

2.3. Caractérisation des AC8E-H.

Pour étudier chacune de ces nouvelles isoformes d'AC8, nous avons utilisé le modèle cellulaire HEK293A pour générer des clones stables exprimant individuellement chacune des AC8E-H ainsi que l'AC8A. Les AC8A, AC8E et AC8F sont bien exprimées dans différents clones et l'AC8E et l'AC8F diminuent la réponse à la forskoline des HEK en comparaison aux HEK contrôles (*Figure 21A* et *B* ou *Article 4 Figure 3A* et *Figure 4A*). Les AC8G et AC8H sont quant à elles peu exprimées et ont donc peu d'impact sur la production d'AMPc dans ces cellules. La très faible expression des AC8G et AC8H s'explique par leur instabilité. En effet, ces deux isoformes sont délétées de l'exon 11, codant la 5ème boucle extracellulaire dans le domaine M2 et contenant deux sites de N-glycosylation [173] pouvant être nécessaires à une maturation conformationnelle correcte des protéines et à leur stabilité. La localisation subcellulaire des AC8E-H par fractionnement révèle la présence de ces protéines dans des compartiments qualifiés de « membranes lourdes », incluant les membranes plasmiques, mitochondriales ainsi que les membranes du réticulum endoplasmique (*Figure 21A* ou *Article 4 Figure 3B*). Les expériences d'immunofluorescence nous ont permis de mettre en évidence que si l'AC8 pleine taille (AC8A) est clairement exprimée à la membrane plasmique, les AC8E-H étaient localisées dans une zone péri-nucléaire dans le réticulum endoplasmique (*Figure 21C* ou *Article 4 Figure 3C*). Dans la suite de l'étude, nous nous sommes exclusivement intéressés aux propriétés de l'AC8E par rapport à l'AC8A pleine taille. En effet, ces deux AC8 ne différent que par la délétion dans l'exon 1, permettant ainsi de mieux comprendre les conséquences de cette délétion sur les fonctions des AC8E-H.

Si l'expression de l'AC8E dans les HEK permet à elle seule, de limiter la production d'AMPc en réponse à la forskoline, son effet sur la dynamique de production d'AMPC n'est pas liée à une quelconque activité catalytique. En effet, nous avons démontré que contrairement à l'AC8A,

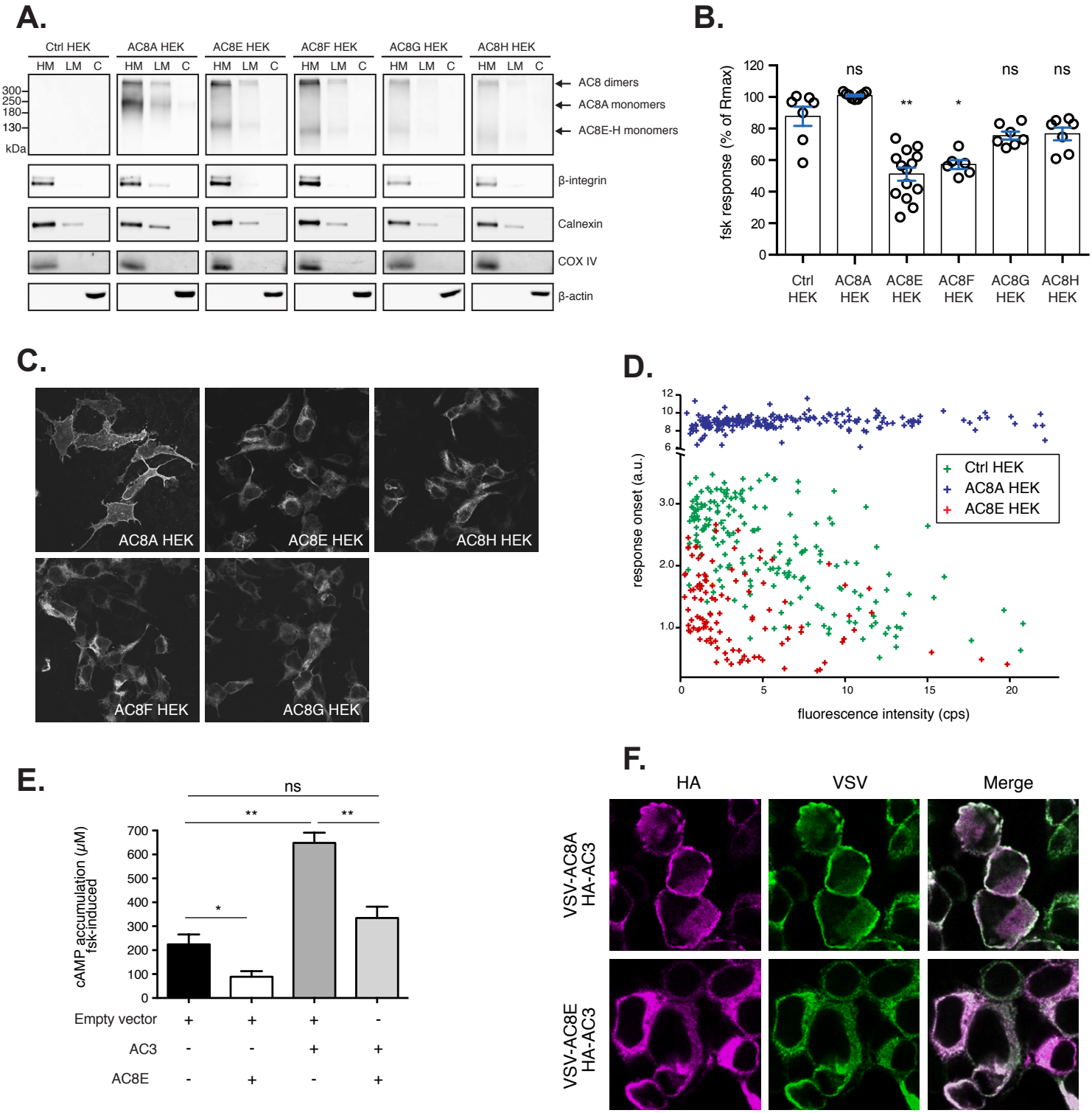

Figure 21. Etude biochimique et fonctionnelle des AC8E-H dans les HEK293A.

Des clones stables exprimant individuellement les AC8E-H ont été générés dans des HEK293A. **A.** Expression des AC8E-H dans les clones stables par fractionnement cellulaire et Wesertn Blot. *HM*: Heavy membranes, *LM*: light membranes, *C*: Cytoplasm. **B.** Production d'AMPc dans les clones HEK. Quantification des expériences de biosenseur (voir article 4 figure 4) correspondant à la mesure moyenne de la réponse des clones HEK à la forskoline en % de la réponse maximale obtenue en forskolin+IBMX (Rmax). (N=7 à 15 expériences indépendantes). **C.** Immunofluorescence montrant la localisation subcellulaire de l'AC8A et des AC8E-H dans les clones HEK. **D.**Réduction de l'activité cyclase globale par l'AC8E. Pour chaque cellule individuellement, les vitesses (pentes) de montée en réponse à 1µM de forskoline+200µM d'IBMX ont été mesurées dans des clones HEK contrôles (vert), exprimant l'AC8A (bleu) ou l'AC8E (rouge). Ces pentes mesurées ont été reportées sur le graphique présenté, en fonction de l'intensité (niveau d'expression) du biosenseur pour chaque cellule individuelle (pour plus de détails, voir le texte se référant à la figure ou la figure 5 de l'article 4). Pour chaque intensité de biosenseur identique, on peut donc comparer l'activité cyclase entre les cellules en comparant la pente des réponses. **E.** Mesure de la production d'AMPc cumulée dans des HEK sur-exprimant l'AC3, co-exprimée ou non avec l'AC8E par le kit dosage cAMP-GS HiRange sur extraits totaux. **F.** Immunofluorescence sur des cellules HEK transfectées transitoirement avec l'AC3 (étiquetées HA) et co-transfectées avec l'AC8A ou l'AC8E (étiquetées VsV). Test non paramétrique de Mann-Whitney, ** P<0.01; *P<0.05

l'AC8E ne présente pas d'activité cyclase induite par une entrée massive de calcium dans la cellule (*Article 4 Figure 4B*).

2.4. L'AC8E se comporte comme un dominant négatif

Nous avons donc émis l'hypothèse que l'AC8E pourrait diminuer l'activité des autres cyclases dans la cellule. Pour valider cette hypothèse, nous avons mesuré la pente de la réponse à la forskoline des cellules en inhibant toute activité PDE avec de l'IBMX, de façon à ce que cette pente soit exclusivement le reflet de l'activité cyclase des cellules. Cette réponse à la forskoline étant mesurée avec le biosenseur $^{T}EPAC^{VV}$, le niveau d'expression du biosenseur va donc influer sur la vitesse de la réponse[2]. Comme illustré sur la *Figure 21D* et sur l'*Article 4 Figure 5A*, pour des cellules d'intensité de fluorescence similaires, la pente de réponse à la forskoline +IBMX est plus faible dans les cellules exprimant l'AC8E par rapport aux cellules contrôles, alors qu'elle est plus forte dans les cellules exprimant l'AC8A, qui est parfaitement fonctionnelle. Ce résultat démontre que l'expression de l'AC8E va diminuer la capacité de production d'AMPc en diminuant l'activité des autres cyclases ; ce qui se traduit lors d'un dosage d'accumulation d'AMPc par une diminution de la quantité d'AMPc (*Article 4 Figure 5B*). Les cyclases agissant sous formes d'homo- ou d'hétérodimères, nous avons évalué la capacité de l'AC8E à interagir avec des cyclases fonctionnelles, comme l'AC3, cyclase majoritairement exprimée dans les CMLV [174]. Nous avons coexprimé l'AC3 avec l'AC8E dans des HEK et démontré par co-immunoprécipitation, qu'elles interagissaient ensemble (*Article 4 Figure 6B*). Cette co-expression de l'AC3 avec l'AC8E a pour conséquence de diminuer la concentration en AMPc dans la cellule, par rapport à l'expression de l'AC3 seule ou par rapport à des HEK contrôles (*Figure 21E* ou *Article 4 Figure 6C*). Au niveau de la localisation cellulaire, l'AC3 qui est membranaire quand elle est exprimée avec une AC8 fonctionnelle (l'AC8A), est séquestrée dans le réticulum quand elle est exprimée avec l'AC8E (*Figure 21F* ou *Article 4 Figure 6D*). L'ensemble de ces données démontre que l'AC8E se comporte comme un dominant négatif en interagissant avec des cyclases fonctionnelles (nous avons obtenu des résultats similaires avec l'AC6 et l'AC8E), en les séquestrant dans le réticulum endoplasmique et empêchant ainsi leur adressage correct à la membrane.

De nombreuses études par co-immunoprécipitation ou FRET, ont démontré que la formation d'homo- et hétérodimères de cyclases régule leur activité [175, 176]. La régulation négative de l'activité des cyclases fonctionnelles par l'AC8E pourrait donc être la conséquence de leur séquestration dans le réticulum endoplasmique (RE) par l'AC8E, qui ne peut être correctement adressée à la membrane plasmique. L'absence quasi complète de la cassette M1 dans l'AC8E pourrait expliquer cette séquestration des hétérodimères AC8E/AC3. En effet, l'équipe de Dermot Cooper a démontré que les cassettes M2 de l'AC8 assuraient la formation de dimères d'AC8

[2] Plus il y a de biosenseur dans la cellule et plus il faudra de temps pour le saturer. De ce fait, la vitesse de montée de la réponse à la forskoline +IBMX sera plus lente dans les cellules qui expriment fortement le biosenseur. C'est pourquoi nous avons reporté pour chaque cellule, la valeur de la pente mesurée en réponse à la forskoline +IBMX, en fonction de l'intensité de fluorescence, de façon à pouvoir comparer entre elles, des cellules d'intensité identique exprimant l'AC8E ou l'AC8A.

(interaction M2-M2), mais que l'interaction M1-M2 était nécessaire à l'adressage des dimères à la membrane [177]

Ainsi, nous avons pu comprendre le paradoxe de l'expression d'une adénylyl cyclase au cours de la transition phénotypique des CMLV en réponse à l'IL1β, alors que l'AMPc limite cette transdifférenciation. Cependant beaucoup de questions demeurent quant au mode de fonctionnement de l'AC8E. Est-ce la séquestration des AC fonctionnelles par l'AC8E qui limite cette production d'AMPc en les empêchant d'interagir correctement avec leurs partenaires (protéines G), ou est-ce que l'activité enzymatique de ces cyclases est également inhibée dans les hétérodimères avec l'AC8E ?

De nombreuses études ont mis en évidence des mécanismes destinés à limiter la production d'AMPc au cours de la transdifférenciation des CMLV. Par exemple, l'augmentation de l'activité de certaines PDE, comme la PDE1 [178] ou la PDE4 [179] au cours de la transdifférenciation, vont conduire à une diminution de la production d'AMPc et donc favoriser cette transition phénotypique. Nous avons démontré à travers cette étude l'existence d'un nouveau mécanisme jusqu'alors inconnu, impliquant une adénylyl cyclase dominant-négatif.

Si la caractérisation de cette AC8E a pu être réalisée dans un modèle cellulaire HEK, son étude dans les CMLV est beaucoup plus complexe en raison de l'absence d'anticorps suffisamment spécifiques, mais également de son faible niveau d'expression. Cependant l'invalidation de son expression à l'aide de siRNA suffit à restaurer une production d'AMPc dans les CMLV transdifférenciées (*Article 4 Figure 2B*), et à limiter les capacités migratoires [128] et sécrétoire (*Article 4 Figure supplémentaire S2*) des CMLVtd.

3. Contribution personnelle et encadrement sur ce projet.

Lorsque je travaillais sur le projet Alzheimer, je participais également au projet sur la transdifférenciation des CMLV que menait la doctorante Zela Keuylian, en apportant mon expertise en biologie moléculaire et cellulaire, et notamment sur la voie Notch [161, 180, 181]. L'identification de la forme tronquée d'AC8 en 2012 a réorienté la stratégie d'étude de l'implication de l'AC8 sur la transdifférenciation des CMLV, que nous avons défini avec isabelle Limon. Le projet d'étude sur l'AC8 et la transdifférenciation des CMLV était financé par une ANR (11BSV103401 2012-2015) obtenue par Isabelle Limon. Benjamin Vallin est arrivé en M2 au laboratoire en 2013 et je l'ai encadré avec Isabelle Limon sur l'identification précise de la délétion de l'exon 1, que nous avons pu délimiter par séquençage. Nous avons alors lancé une étude sur l'AC8E, en supprimant dans le cDNA de l'AC8A, la séquence délétée identifié dans l'AC8E mais sans savoir à l'époque si le reste de la protéine était identique et ignorant l'existence des variants AC8F, G et H. Le clonage complet des quatre isoformes ayant été fastidieux et n'ayant été achevé qu'en 2016. Dès lors, en collaboration avec Pierre Vincent, nous nous sommes lancés dans la mise en place et l'optimisation de l'étude de la dynamique de production d'AMPc dans les CMLV. Benjamin Vallin a poursuivi en thèse (2013-2017) sous ma direction et celle d'Isabelle Limon. J'ai formé Benjamin à la biologie moléculaire au travers des nombreuses constructions qui ont été

nécessaires à cette étude, et encadré son projet d'un point de vue conceptuel et méthodologique en étroite collaboration avec Isabelle Limon pendant quatre ans. Les capacités exceptionnelles de travail et de réflexion de Benjamin l'ont amené à être décisif dans ce projet, tant au niveau des nombreuses expériences qu'il a réalisées que de son apport conceptuel et analytique de ce projet. Benjamin Vallin est aujourd'hui en Postdoctorat à l'Université de Cambridge au Royaume-Uni. En 2017, j'ai encadré Yohan Legeux-Cajgfinger lors de son stage de M2 et il a contribué pleinement à l'aboutissement de ce travail sur l'AC8E, et a également assuré une partie importante du travail de révision de *l'article 4*. Yohan est aujourd'hui en thèse dans l'équipe (2017-2020) sous la direction d'Isabelle Limon et sous mon co-encadrement.

Sur cette thématique AC8E, j'ai également encadré deux autres étudiants de M2, sur des aspects différents du projet. Eda Seylam en 2018 sur l'étude des mécanismes d'épissage de l'AC8 dans les CMLVtd et Emilie Wong-Chong sur l'utilisation d'un adénovirus AC8E, que nous avons imaginé et construit avec Benjamin Vallin, pour évaluer les effets directs de l'AC8E sur les transitions phénotypiques des CMLV (voir partie projet ci dessous).

Ce projet AC8E est aujourd'hui au cœur de notre recherche sur l'athérosclérose. Nous menons ce projet avec Isabelle Limon, qui est porteuse d'une demande d'ANR dans laquelle je suis responsable d'une des principales taches et qui est développé ci-dessous.

4. Projet de recherche.

La poursuite de ce travail constitue un projet ambitieux, regroupant plusieurs équipes et faisant l'objet pour une partie d'un financement de la fondation de France (PI : I.Limon) et également d'une demande de financement ANR (PI : I.Limon).

Les stratégies visant à limiter les complications liées à la pause de stents se heurtent aux effets collatéraux des traitements post-opératoires, à la fois sur les CMLV mais aussi sur les cellules endothéliales ou immunitaires. Cibler spécifiquement les CMLV sans affecter la ré-endothélisation est donc une stratégie pertinente pour limiter ces effets. Les AC8E-H jouent un rôle important dans la transition phénotypique des CMLV et sont spécifiquement exprimées dans les CMLVtd mais pas dans les cellules endothéliales ou immunitaires, devenant par conséquent des cibles thérapeutiques potentielles.

Ce projet vise à déterminer si les formes tronquées d'AC8E-H présentent un intérêt potentiel pour le traitement des complications liées à la pose de stents suite à une angioplastie. Ce projet se divise en trois objectifs : **i)** Caractériser les effets des AC8E-H sur l'intégration du signal et sur les propriétés des cellules musculaires lisses transdifférenciées **ii)** à concevoir des peptides capables d'inhiber l'interaction entre les AC8E-H et les AC endogènes, et **iii)** à tester l'efficacité de ces peptides dans les CMLVtd exprimant les AC8E-H et dans un modèle de resténose post-angioplastie et/ou intra-stent chez le rat.

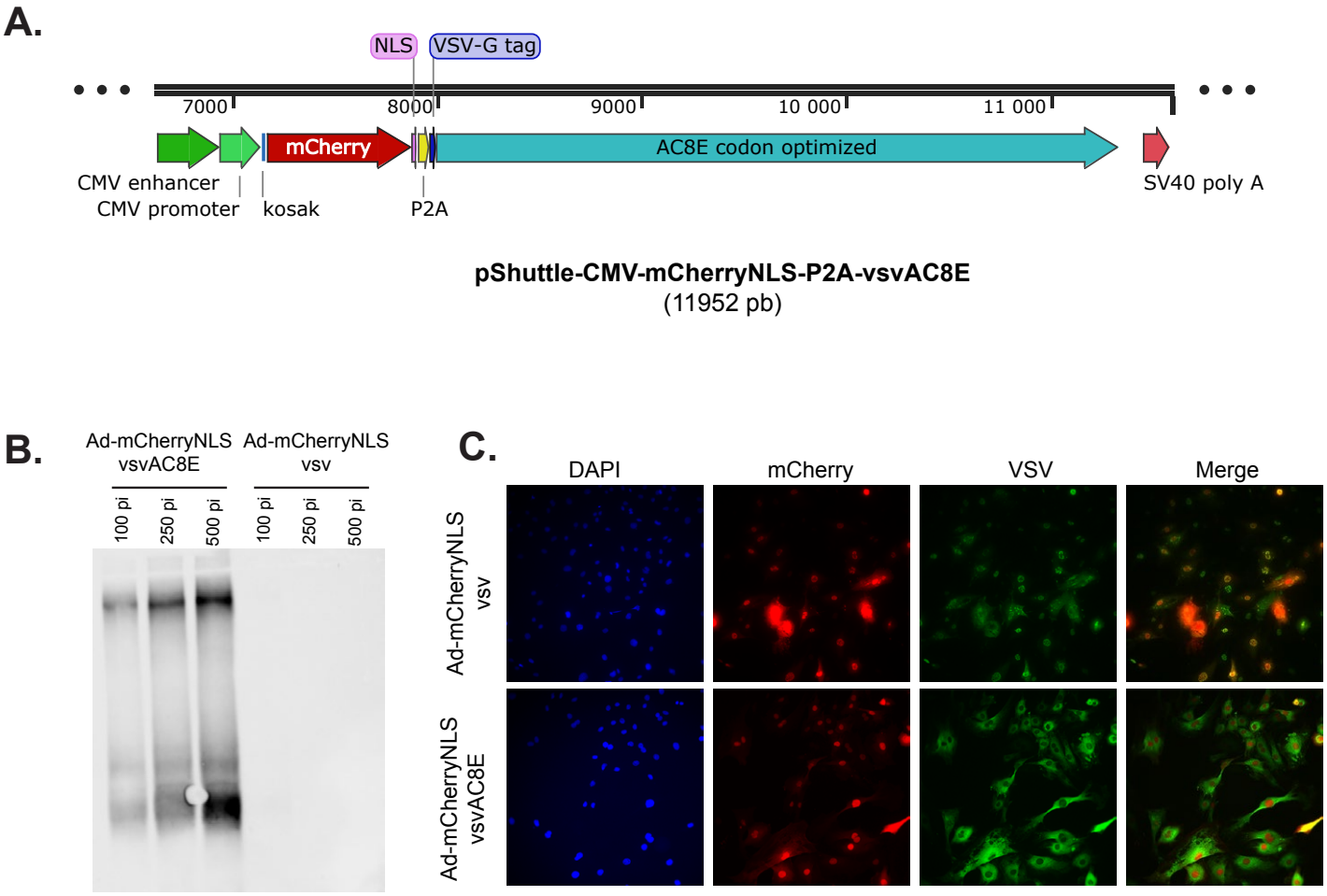

Figure 22. Construction et validation d'un adenovirus serotype V pour l'expression de l'AC8E dans les CMLV.

(A) Design de la construction réalisée. Le cDNA de l'AC8E a été fusionné en N-terminal à un tag VSV-G. La séquence VSV-G est en phase avec un cDNA codant la protéine fluorescente mCherry, fusionnée à un signal de localisation nucléaire (NLS). La protéine de fusion ainsi produite mCherryNLS-vsvAC8E sera clivée en deux protéines distinctes par un autoclivage de la sequence peptidique P2A séparant les deux protéines. Un virus contrôle a également été produit à l'identique, sans la séquence de l'AC8E.
(B) Des cultures primaires de CMLV d'oarte de rat ont été infectées avec 100, 200 ou 500 particules infectieuses (pi) d'adénovirus codant l'AC8E (Ad-mCherryNLS-AC8E) ou d'adénovirus contôle (Ad-mCherryNLS-vsv) par cellule. L'expression de l'AC8E a été validée par western blot avec un anticorps anti-VSV-G.
(C) Immunohistochimie sur des cultures primaires de CMLV infectées avec 200 particules infectieuses d'adénovirus par cellule codant l'AC8E (Ad-mCherryNLS-AC8E) ou d'adénovirus contôle (Ad-mCherryNLS-vsv). Les noyaux sont marqués au DAPI, l'émission dans le rouge de la mCherry est mesurée à 640nm (excitation 560 nm), l'AC8E est marquée avec un anticorps anti-VSV-G couplé à l'Alexa488 (émission dans le vert). L'efficacité d'infection est évaluée à environ 80%.

4.1. Caractérisation des effets de l'AC8E sur l'intégration du signal et sur les propriétés des cellules musculaires lisses.

4.1.1 Effets de l'AC8E sur l'intégration des signaux extracellulaires.

L'AMPc cyclique et le calcium sont au centre de la signalisation dans les CMLV en réponse aux hormones et neurotransmetteurs, au travers de l'activation de leurs récepteurs exprimés à la surface des CMLV. Les catécholamines et les prostaglandines, pour ne citer qu'elles, vont avoir des effets vasoconstricteurs ou vasorelaxants en fonction de la nature et du couplage des récepteurs exprimés, et moduler également le phénotype des CMLV. Dans la mesure où les AC8E-F reconfigurent la dynamique de production d'AMPc, il nous parait essentiel d'étudier l'effet des AC8E-F sur la signalisation calcique et AMPc en réponse aux stimuli endogènes. Nous étudierons les modifications la dynamique de production d'AMPc et de calcium à l'aide de biosenseurs (avec une stratégie similaire à celle présentée dans le projet Alzheimer), dans les CMLV contractiles et transdifférenciées, en réponse à la noradrénaline, l'angiotensine II et la PDGF dont les voies de signalisations sont dépendantes des adénylyl cyclases.

4.1.2 Effet de l'AC8E sur les propriétés des CMLV.

Il nous paraît essentiel de déterminer dans quelle mesure l'AC8E est directement impliquée dans la transdifférenciation des CMLV. En effet, un traitement des CMLV à l'IL1β induit l'expression des AC8E-F mais active également diverses voies de signalisation aux conséquences cellulaires variées. Afin de déterminer l'implication directe de l'AC8E dans l'acquisition d'un phénotype sécrétoire, migratoire ou prolifératif, nous souhaitons sur-exprimer l'AC8E seule dans des CMLV, ou conjointement à un traitement à l'IL1β. Les CMLV étant difficilement transfectables, nous avons généré une construction adénovirale et produit des virus (*Figure 22A*), permettant d'exprimer simultanément l'AC8E étiquetée VsV et la protéine fluorescence mCherry-NLS. Cette construction nous permettra ainsi de suivre les cellules exprimant l'AC8E par visualisation du noyau rouge, liée à l'expression de la mCherry-NLS. Un seul messager codant ces deux protéines sera transcrit et traduit. Cependant, afin que la mCherry n'interfère pas avec l'AC8E, une séquence peptidique P2A a été introduite entre l'AC8E et la mCherry permettant la séparation des deux protéines par auto-clivage protéolytique [182]. Nous avons produit et testé ce virus sur des CMLV et il s'est avéré parfaitement fonctionnel (*Figure 22B*). Le taux d'infection est très élevé (environ 80%), les cellules qui expriment l'AC8E (marquage vert) ont toutes un noyau rouge due à la co-expression du mCherry-NLS (*Figure 22C*), validant ainsi notre stratégie adénovirale. Nous testerons alors l'impact d'une surexpression de l'AC8E sur les propriétés migratoires, sécrétoires et proliférative des CMLV contractiles et transdifférenciées.

4.2. Conception et validation de peptides interférents ciblant les AC8E-H

Les résultats obtenus démontrent que la diminution de la production d'AMPc par l'AC8E dans les CMLVtd est liée à son hétérodimérisation avec des cyclases fonctionnelles, de toute évidence via son domaine M2 [129].

La séquence de peptides interférents ciblant le domaine d'interaction d'une protéine peut être identique à la séquence de la protéine impliquée dans cette interaction [183]. Autrement dit, si nous identifions précisément les séquences peptidiques d'interaction de l'AC8E avec l'AC3, ces séquences pourront être testées individuellement comme peptides interférents. Nous collaborons avec le Dr. Angelita Rebollo (Sorbonne Université, CIMI, UMRS CR7, INSERM U1135, CNRS ERL 8255, Paris) qui a développé une technique PEPscan [184], qui consiste à « spotter » sur une membrane, des peptides de 12 acides aminés, qui dans notre projet, correspondent à l'ensemble de la séquence M2 de l'AC8. Ces peptides de 12 acides aminés chevauchent de 10 acides aminés le peptide précédent et le peptide suivant, mappant ainsi l'ensemble du domaine M2 en 115 peptides. Cette membrane sera ensuite incubée avec la protéine AC3 et AC6 purifiées, et un dot-blot sera alors réalisé. Les signaux ainsi obtenus nous permettrons de définir une ou des séquences peptidiques de l'AC8E impliquée dans son interaction avec l'AC3 et l'AC6, et nous testerons individuellement ces peptides pour leur capacité à inhiber l'interaction de l'AC8E avec ces cyclases, et de restaurer la dynamique de production d'AMPc dans les CMLV transdifférenciées. Ces peptides seront également modélisés et optimisés en collaboration avec le Pr. Manuel Dauchez (MEDyC, Vieillissement Matriciel et Remodelage Vasculaire, Laboratoire de Signalisation et Récepteurs Matriciels, Université de Reims Champagne Ardenne).

4.3. Validation de l'efficacité des peptides sur la resténose post-angioplastie.

L'objectif est de démontrer l'efficacité des peptides interférents sélectionnés, sur la resténose post-angioplastie *in vivo* et leur absence d'effet sur la ré-endothélisation après la pose d'une endoprothèse. L'administration locale des peptides sera réalisée en plaçant des patchs biocompatibles autour de l'artère. Les expériences de chirurgie seront effectuées par le Dr N. Mougenot (Service de Phénotypage du petit animal UMS 28,). L'artère carotide externe gauche de rats adultes subira une lésion par gonflement d'un ballonnet. Les peptides interférant seront délivrés à l'artère via des dispositifs expérimentaux, tels que des fragments d'éponges de gélatine stériles (Bloxang) ou des plaques d'hydrogels à base de chitosan placées autour de l'artère. Le Bloxang a été utilisé avec succès par le Dr M. Laffargue (I2MC, Toulouse, France) pour administrer des peptides bloquant la PI_3Kgamma et étudier leur effet sur la resténose chez la souris (communication personnelle). Les hydrogels à base de chitosane utilisés en patchs sont biocompatibles et pertinents sur le plan médical pour l'administration de médicaments au site d'action pendant 45 jours au maximum [185]. Ces approches d'administration des peptides seront développées en collaboration avec le Dr M. Laffargue (I2MC, Toulouse, France), mais également avec le Pr O. Agbulut (Sorbonne université, IBPS, B2A, Paris), qui utilise actuellement des hydrogels à base de chitosane pour la fabrication de timbres cardiaques dans le traitement de l'infarctus du

myocarde. Après une dizaine de jours, les rats seront sacrifiés, les carotides saines et lésées seront prélevées et l'effet des peptides sera évalué par mesure de la taille de la néo-intima générée à la suite de l'angioplastie à ballonnet [128, 186].

Ce projet nous permettra donc de mieux comprendre le mode de régulation de l'AC8E et son impact sur le phénotype des CMLV. Il nous permettra aussi d'établir une preuve de concept de l'utilisation de l'AC8E comme une nouvelle cible thérapeutique.

Références Bibliographiques

[1] G.K. Owens (1995). Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, 75:487-517.

[2] G.K. Owens, M.S. Kumar, B.R. Wamhoff (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 84:767-801.

[3] A. Alzheimer, R.A. Stelzmann, H.N. Schnitzlein, F.R. Murtagh (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Uber eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat*, 8:429-431.

[4] G.G. Glenner (1980). Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N Engl J Med*, 302:1283-1292.

[5] I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, Y.C. Tung, M. Quinlan, H.M. Wisniewski, L.I. Binder (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83:4913-4917.

[6] D.J. Selkoe (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron*, 6:487-498.

[7] J. Hardy, D.J. Selkoe (2002). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*, 297:353-356.

[8] G. Gallardo, D.M. Holtzman (2017). Antibody Therapeutics Targeting Aβ and Tau. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7

[9] S. Gilman et al. (2005). Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, 64:1553-1562.

[10] E. Masliah, L. Hansen, A. Adame, L. Crews, F. Bard, C. Lee, P. Seubert, D. Games, L. Kirby, D. Schenk (2005). Abeta vaccination effects on plaque pathology in the absence of encephalitis in Alzheimer disease. *Neurology*, 64:129-131.

[11] C. Hock et al. (2003). Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron*, 38:547-554.

[12] C. Holmes et al. (2008). Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet*, 372:216-223.

[13] Y. Hara, N. McKeehan, H.M. Fillit (2019). Translating the biology of aging into novel therapeutics for Alzheimer disease. *Neurology*, 92:84-93.

[14] M.M. Ibrahim, M.T. Gabr (2019). Multitarget therapeutic strategies for Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*, 14:437-440.

[15] S. Strickland (2018). Blood will out: vascular contributions to Alzheimer's disease. *J Clin Invest*, 128:556-563.

[16] S. Ogoh (2017). Relationship between cognitive function and regulation of cerebral blood flow. *J Physiol Sci*, 67:345-351.

[17] M.H. Ahmad, M. Fatima, A.C. Mondal (2019). Influence of microglia and astrocyte activation in the neuroinflammatory pathogenesis of Alzheimer's disease: Rational insights for the therapeutic approaches. *J Clin Neurosci*, 59:6-11.

[18] A.M. Floden, S. Li, C.K. Combs (2005). Beta-amyloid-stimulated microglia induce neuron death via synergistic stimulation of tumor necrosis factor alpha and NMDA receptors. *J Neurosci*, 25:2566-2575.

[19] M.T. Heneka, M.K. O'Banion (2007). Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*, 184:69-91.

[20] J. Tan, T. Town, D. Paris, T. Mori, Z. Suo, F. Crawford, M.P. Mattson, R.A. Flavell, M. Mullan (1999). Microglial activation resulting from CD40-CD40L interaction after beta-amyloid stimulation. *Science*, 286:2352-2355.

[21] J.S. Beckman, J. Chen, J.P. Crow, Y.Z. Ye (1994). Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. *Prog Brain Res*, 103:371-380.

[22] V.D. Bianca, S. Dusi, E. Bianchini, I. Dal Pra, F. Rossi (1999). beta-amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 274:15493-15499.

[23] M. Downen, T.D. Amaral, L.L. Hua, M.L. Zhao, S.C. Lee (1999). Neuronal death in cytokine-activated primary human brain cell culture: role of tumor necrosis factor-alpha. *Glia*, 28:114-127.

[24] E.T. Sutton, T. Thomas, M.W. Bryant, C.S. Landon, C.A. Newton, J.A. Rhodin (1999). Amyloid-beta peptide induced inflammatory reaction is mediated by the cytokines tumor necrosis factor and interleukin-1. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 31:313-323.

[25] Y. Shen et al. (2001). Complement activation by neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 305:165-168.

[26] L. Gan et al. (2004). Identification of cathepsin B as a mediator of neuronal death induced by Abeta-activated microglial cells using a functional genomics approach. *J Biol Chem*, 279:5565-5572.

[27] G.C. Brown, A. Bal-Price (2003). Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol*, 27:325-355.

[28] J.U. Johansson, N.S. Woodling, Q. Wang, M. Panchal, X. Liang, A. Trueba-Saiz, H.D. Brown, S.D. Mhatre, T. Loui, K.I. Andreasson (2015). Prostaglandin signaling suppresses beneficial microglial function in Alzheimer's disease models. *J Clin Invest*, 125:350-364.

[29] P. Grammas (2011). Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 8:26.

[30] J.W. Kinney, S.M. Bemiller, A.S. Murtishaw, A.M. Leisgang, A.M. Salazar, B.T. Lamb (2018). Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*, 4:575-590.

[31] P. Bakshi, E. Margenthaler, V. Laporte, F. Crawford, M. Mullan (2008). Novel role of CXCR2 in regulation of gamma-secretase activity. *ACS Chem Biol*, 3:777-789.

[32] Y.F. Liao, B.J. Wang, H.T. Cheng, L.H. Kuo, M.S. Wolfe (2004). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interferon-gamma stimulate gamma-secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK-dependent MAPK pathway. *J Biol Chem*, 279:49523-49532.

[33] J. Zhao, T. O'Connor, R. Vassar (2011). The contribution of activated astrocytes to Abeta production: implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neuroinflammation*, 8:150.

[34] C. Brenneis et al. (2011). Anti-inflammatory role of microsomal prostaglandin E synthase-1 in a model of neuroinflammation. *J Biol Chem*, 286:2331-2342.

[35] B.P. Imbimbo (2004). The potential role of non-steroidal anti-inflammatory drugs in treating Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 13:1469-1481.

[36] L.A. Kotilinek et al. (2008). Cyclooxygenase-2 inhibition improves amyloid-beta-mediated suppression of memory and synaptic plasticity. *Brain*, 131:651-664.

[37] P.S. Aisen, J. Schmeidler, G.M. Pasinetti (2002). Randomized pilot study of nimesulide treatment in Alzheimer's disease. *Neurology*, 58:1050-1054.

[38] B.P. Imbimbo (2009). An update on the efficacy of non-steroidal anti-inflammatory drugs in Alzheimer's disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 18:1147-1168.

[39] M. Miguel-Álvarez, A. Santos-Lozano, F. Sanchis-Gomar, C. Fiuza-Luces, H. Pareja-Galeano, N. Garatachea, A. Lucia (2015). Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a treatment for Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis of treatment effect. *Drugs Aging*, 32:139-147.

[40] I.R. Mackenzie, D.G. Munoz (1998). Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology*, 50:986-990.

[41] N.C. Teoh, G.C. Farrell (2003). Hepatotoxicity associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Liver Dis*, 7:401-413.

[42] S. Agatonovic-Kustrin, C. Kettle, D.W. Morton (2018). A molecular approach in drug development for Alzheimer's disease. *Biomed Pharmacother*, 106:553-565.

[43] T.J. Wenzel, A. Klegeris (2018). Novel multi-target directed ligand-based strategies for reducing neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Life Sci*, 207:314-322.

[44] A.A. Farooqui, L.A. Horrocks, T. Farooqui (2007). Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem*, 101:577-599.

[45] Z. Arvanitakis, A.W. Capuano, S.E. Leurgans, D.A. Bennett, J.A. Schneider (2016). Relation of cerebral vessel disease to Alzheimer's disease dementia and cognitive function in elderly people: a cross-sectional study. *Lancet Neurol*, 15:934-943.

[46] J.B. Toledo, S.E. Arnold, K. Raible, J. Brettschneider, S.X. Xie, M. Grossman, S.E. Monsell, W.A. Kukull, J.Q. Trojanowski (2013). Contribution of cerebrovascular disease in autopsy confirmed neurodegenerative disease cases in the National Alzheimer's Coordinating Centre. *Brain*, 136:2697-2706.

[47] E.E. Smith, S.M. Greenberg (2009). Beta-amyloid, blood vessels, and brain function. *Stroke*, 40:2601-2606.

[48] H.M. Wisniewski, J. Wegiel (1994). Beta-amyloid formation by myocytes of leptomeningeal vessels. *Acta Neuropathol*, 87:233-241.

[49] B. Frangione, T. Revesz, R. Vidal, J. Holton, T. Lashley, H. Houlden, N. Wood, A. Rostagno, G. Plant, J. Ghiso (2001). Familial cerebral amyloid angiopathy related to stroke and dementia. *Amyloid*, 8 Suppl 1:36-42.

[50] T. Revesz, J.L. Holton, T. Lashley, G. Plant, B. Frangione, A. Rostagno, J. Ghiso (2009). Genetics and molecular pathogenesis of sporadic and hereditary CAA. *Acta Neuropathol*, 118:115-130.

[51] D.R. Thal, W.S. Griffin, R.A. de Vos, E. Ghebremedhin (2008). Cerebral amyloid angiopathy and its relationship to Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 115:599-609.

[52] K.A. Jellinger (2002). Alzheimer disease and cerebrovascular pathology: an update. *J Neural Transm (Vienna)*, 109:813-836.

[53] L. Miravalle, T. Tokuda, R. Chiarle, G. Giaccone, O. Bugiani, F. Tagliavini, B. Frangione, J. Ghiso (2000). Substitutions at codon 22 of Alzheimer's abeta peptide induce diverse conformational changes and apoptotic effects in human cerebral endothelial cells. *J Biol Chem*, 275:27110-27116.

[54] M. Folin, S. Baiguera, M. Tommasini, D. Guidolin, M.T. Conconi, E. De Carlo, G.G. Nussdorfer, P.P. Parnigotto (2005). Effects of beta-amyloid on rat neuromicrovascular endothelial cells cultured in vitro. *Int J Mol Med*, 15:929-935.

[55] N. Strazielle, J.F. Ghersi-Egea, J. Ghiso, M.P. Dehouck, B. Frangione, C. Patlak, J. Fenstermacher, P. Gorevic (2000). In vitro evidence that beta-amyloid peptide 1-40 diffuses across the blood-brain barrier and affects its permeability. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59:29-38.

[56] Z. Suo, J. Tan, A. Placzek, F. Crawford, C. Fang, M. Mullan (1998). Alzheimer's beta-amyloid peptides induce inflammatory cascade in human vascular cells: the roles of cytokines and CD40. *Brain Res*, 807:110-117.

[57] V. Vukic, D. Callaghan, D. Walker, L.F. Lue, Q.Y. Liu, P.O. Couraud, I.A. Romero, B. Weksler, D.B. Stanimirovic, W. Zhang (2009). Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway. *Neurobiol Dis*, 34:95-106.

[58] R. Giri, S. Selvaraj, C.A. Miller, F. Hofman, S.D. Yan, D. Stern, B.V. Zlokovic, V.K. Kalra (2002). Effect of endothelial cell polarity on beta-amyloid-induced migration of monocytes across normal and AD endothelium. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283:C895-904.

[59] F.J. Gonzalez-Velasquez, J.A. Kotarek, M.A. Moss (2008). Soluble aggregates of the amyloid-beta protein selectively stimulate permeability in human brain microvascular endothelial monolayers. *J Neurochem*, 107:466-477.

[60] A. Chakraborty, N.M. de Wit, W.M. van der Flier, H.E. de Vries (2017). The blood brain barrier in Alzheimer's disease. *Vascul Pharmacol*, 89:12-18.

[61] S.S. Mok, D. Losic, C.J. Barrow, B.J. Turner, C.L. Masters, L.L. Martin, D.H. Small (2006). The beta-amyloid peptide of Alzheimer's disease decreases adhesion of vascular smooth muscle cells to the basement membrane. *J Neurochem*, 96:53-64.

[62] S. Fossati, J. Cam, J. Meyerson, E. Mezhericher, I.A. Romero, P.O. Couraud, B.B. Weksler, J. Ghiso, A. Rostagno (2010). Differential activation of mitochondrial apoptotic pathways by vasculotropic amyloid-beta variants in cells composing the cerebral vessel walls. *Faseb J*, 24:229-241.

[63] M.L. Maat-Schieman, S.G. van Duinen, A.J. Rozemuller, J. Haan, R.A. Roos (1997). Association of vascular amyloid beta and cells of the mononuclear phagocyte system in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch) and Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56:273-284.

[64] M. Yamada, Y. Itoh, M. Shintaku, J. Kawamura, O. Jensson, L. Thorsteinsson, N. Suematsu, M. Matsushita, E. Otomo (1996). Immune reactions associated with cerebral amyloid angiopathy. *Stroke*, 27:1155-1162.

[65] N. Melzer, A. Harder, C.C. Gross, J. Wolfer, W. Stummer, T. Niederstadt, S.G. Meuth, M. Marziniak, O.M. Grauer, H. Wiendl (2012). CD4+ T Cells Predominate in Cerebrospinal Fluid and Leptomeningeal and Parenchymal Infiltrates in Cerebral Amyloid beta-Related Angiitis. *Arch Neurol*, 69:773-777.

[66] R. Weiss, V. Lifshitz, D. Frenkel (2011). TGF-beta1 affects endothelial cell interaction with macrophages and T cells leading to the development of cerebrovascular amyloidosis. *Brain Behav Immun*, 25:1017-1024.

[67] C.N. Serhan, J. Savill (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol*, 6:1191-1197.

[68] C.N. Serhan (2006). Novel chemical mediators in the resolution of inflammation: resolvins and protectins. *Anesthesiol Clin*, 24:341-364.

[69] K.J. Herbst-Robinson, L. Liu, M. James, Y. Yao, S.X. Xie, K.R. Brunden (2015). Inflammatory Eicosanoids Increase Amyloid Precursor Protein Expression via Activation of Multiple Neuronal Receptors. *Sci Rep*, 5:18286.

[70] Y. Yao, C.M. Clark, J.Q. Trojanowski, V.M. Lee, D. Praticò (2005). Elevation of 12/15 lipoxygenase products in AD and mild cognitive impairment. *Ann Neurol*, 58:623-626.

[71] M.H. Thomas, S. Pelleieux, N. Vitale, J.L. Olivier (2016). Dietary arachidonic acid as a risk factor for age-associated neurodegenerative diseases: Potential mechanisms. *Biochimie*, 130:168-177.

[72] C.N. Serhan (2014). Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*, 510:92-101.

[73] V. Chiurchiù, A. Leuti, M. Maccarrone (2018). Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. *Front Immunol*, 9:38.

[74] X. Capó, M. Martorell, C. Busquets-Cortés, S. Tejada, J.A. Tur, A. Pons, A. Sureda (2018). Resolvins as proresolving inflammatory mediators in cardiovascular disease. *Eur J Med Chem*, 153:123-130.

[75] R.A. Whittington, E. Planel, N. Terrando (2017). Impaired Resolution of Inflammation in Alzheimer's Disease: A Review. *Front Immunol*, 8:1464.

[76] S.C. Dyall (2015). Long-chain omega-3 fatty acids and the brain: a review of the independent and shared effects of EPA, DPA and DHA. *Front Aging Neurosci*, 7:52.

[77] J.G. Devassy, S. Leng, M. Gabbs, M. Monirujjaman, H.M. Aukema (2016). Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Oxylipins in Neuroinflammation and Management of Alzheimer Disease. *Adv Nutr*, 7:905-916.

[78] M.C. de Wilde, B. Vellas, E. Girault, A.C. Yavuz, J.W. Sijben (2017). Lower brain and blood nutrient status in Alzheimer's disease: Results from meta-analyses. *Alzheimers Dement (N Y)*, 3:416-431.

[79] Y. Freund-Levi, M. Eriksdotter-Jonhagen, T. Cederholm, H. Basun, G. Faxen-Irving, A. Garlind, I. Vedin, B. Vessby, L.O. Wahlund, J. Palmblad (2006). Omega-3 fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: OmegAD study: a randomized double-blind trial. *Arch Neurol*, 63:1402-1408.

[80] G.M. Cole, S.A. Frautschy (2006). Docosahexaenoic acid protects from amyloid and dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Nutr Health*, 18:249-259.

[81] K.N. Green, H. Martinez-Coria, H. Khashwji, E.B. Hall, K.A. Yurko-Mauro, L. Ellis, F.M. LaFerla (2007). Dietary docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid ameliorate amyloid-beta and tau pathology via a mechanism involving presenilin 1 levels. *J Neurosci*, 27:4385-4395.

[82] G.P. Lim, F. Calon, T. Morihara, F. Yang, B. Teter, O. Ubeda, N. Salem, S.A. Frautschy, G.M. Cole (2005). A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci*, 25:3032-3040.

[83] M.F. Burke, F.M. Burke, D.E. Soffer (2017). Review of Cardiometabolic Effects of Prescription Omega-3 Fatty Acids. *Curr Atheroscler Rep*, 19:60.

[84] A. Pirillo, A.L. Catapano (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of hypertriglyceridaemia. *Int J Cardiol*, 170:S16-20.

[85] A. Daci, G. Özen, İ. Uyar, E. Civelek, F.İ.A. Yildirim, D.K. Durman, Ö. Teskin, X. Norel, B.S. Uydeş-Doğan, G. Topal (2017). Omega-3 polyunsaturated fatty acids reduce vascular tone and inflammation in human saphenous vein. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 133:29-34.

[86] M. Massaro, A. Habib, L. Lubrano, S. Del Turco, G. Lazzerini, T. Bourcier, B.B. Weksler, R. De Caterina (2006). The omega-3 fatty acid docosahexaenoate attenuates endothelial cyclooxygenase-2 induction through both NADP(H) oxidase and PKC epsilon inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:15184-15189.

[87] R.A. Siddiqui, K.A. Harvey, N. Ruzmetov, S.J. Miller, G.P. Zaloga (2009). n-3 fatty acids prevent whereas trans-fatty acids induce vascular inflammation and sudden cardiac death. *Br J Nutr*, 102:1811-1819.

[88] S. Delbosc, M. Glorian, A.S. Le Port, G. Bereziat, M. Andreani, I. Limon (2008). The benefit of docosahexanoic acid on the migration of vascular smooth muscle cells is partially dependent on Notch regulation of MMP-2/-9. *Am J Pathol*, 172:1430-1440.

[89] T. Shiina, T. Terano, J. Saito, Y. Tamura, S. Yoshida (1993). Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid suppress the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 104:95-103.

[90] J.C. de la Torre (2004). Alzheimer's disease is a vasocognopathy: a new term to describe its nature. *Neurol Res*, 26:517-524.

[91] J.C. de la Torre (2004). Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *Lancet Neurol*, 3:184-190.

[92] S. Amor, F. Puentes, D. Baker, P. van der Valk (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*, 129:154-169.

[93] J.C. Hur, R. Blaise, I. Limon (2016). Protocol for Isolating the Mouse Circle of Willis. *J Vis Exp*, 116:1-6.

[94] A.C. Newby (2006). Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovasc Res*, 69:614-624.

[95] S.S. Jung, W. Zhang, W.E. Van Nostrand (2003). Pathogenic A beta induces the expression and activation of matrix metalloproteinase-2 in human cerebrovascular smooth muscle cells. *J Neurochem*, 85:1208-1215.

[96] A.Y. Strongin, B.L. Marmer, G.A. Grant, G.I. Goldberg (1993). Plasma membrane-dependent activation of the 72-kDa type IV collagenase is prevented by complex formation with TIMP-2. *J Biol Chem*, 268:14033-14039.

[97] A.Y. Strongin, I. Collier, G. Bannikov, B.L. Marmer, G.A. Grant, G.I. Goldberg (1995). Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem*, 270:5331-5338.

[98] M.L. Previti, W. Zhang, W.E. Van Nostrand (2006). Dexamethasone diminishes the pro-inflammatory and cytotoxic effects of amyloid beta-protein in cerebrovascular smooth muscle cells. *J Neuroinflammation*, 3:18.

[99] G.M. Cole, Q.L. Ma, S.A. Frautschy (2009). Omega-3 fatty acids and dementia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 81:213-221.

[100] M.O.W. Grimm, D.M. Michaelson, T. Hartmann (2017). Omega-3 fatty acids, lipids, and apoE lipidation in Alzheimer's disease: a rationale for multi-nutrient dementia prevention. *J Lipid Res*, 58:2083-2101.

[101] M. Hashimoto et al. (2008). Docosahexaenoic acid disrupts in vitro amyloid beta(1-40) fibrillation and concomitantly inhibits amyloid levels in cerebral cortex of Alzheimer's disease model rats. *J Neurochem*, 107:1634-1646.

[102] S. Hossain, M. Hashimoto, M. Katakura, K. Miwa, T. Shimada, O. Shido (2009). Mechanism of docosahexaenoic acid-induced inhibition of in vitro Abeta1-42 fibrillation and Abeta1-42-induced toxicity in SH-S5Y5 cells. *J Neurochem*, 111:568-579.

[103] K. Iuchi, M. Ema, M. Suzuki, C. Yokoyama, H. Hisatomi (2019). Oxidized unsaturated fatty acids induce apoptotic cell death in cultured cells. *Mol Med Rep*,

[104] V.P. Yakubenko, T.V. Byzova (2017). Biological and pathophysiological roles of end-products of DHA oxidation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1862:407-415.

[105] S. Tardivel, A. Gousset-Dupont, V. Robert, M.L. Pourci, A. Grynberg, B. Lacour (2009). Protective effects of EPA and deleterious effects of DHA on eNOS activity in Ea hy 926 cultured with lysophosphatidylcholine. *Lipids*, 44:225-235.

[106] S. Roig-Pérez, F. Guardiola, M. Moretó, R. Ferrer (2004). Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine. *J Lipid Res*, 45:1418-1428.

[107] M.E. Bégin (1987). Effects of polyunsaturated fatty acids and of their oxidation products on cell survival. *Chem Phys Lipids*, 45:269-313.

[108] M.E. Bégin, G. Ells, U.N. Das, D.F. Horrobin (1986). Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *J Natl Cancer Inst*, 77:1053-1062.

[109] K. Hsiao, P. Chapman, S. Nilsen, C. Eckman, Y. Harigaya, S. Younkin, F. Yang, G. Cole (1996). Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science*, 274:99-102.

[110] S. Andrieu et al. (2017). Effect of long-term omega 3 polyunsaturated fatty acid supplementation with or without multidomain intervention on cognitive function in elderly adults with memory complaints (MAPT): a randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology*, 16:377-389.

[111] A.B. Nair, S. Jacob (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm*, 7:27-31.

[112] Y. Tajima et al. (2013). Lipidomic analysis of brain tissues and plasma in a mouse model expressing mutated human amyloid precursor protein/tau for Alzheimer's disease. *Lipids Health Dis*, 12:68.

[113] B. Porro, P. Songia, I. Squellerio, E. Tremoli, V. Cavalca (2014). Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: a neglected platelet-derived 12-lipoxygenase product. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 964:26-40.

[114] R. Natarajan, J. Rosdahl, N. Gonzales, W. Bai (1997). Regulation of 12-lipoxygenase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 30:873-879.

[115] A. Lebeau, F. Terro, W. Rostene, D. Pelaprat (2004). Blockade of 12-lipoxygenase expression protects cortical neurons from apoptosis induced by beta-amyloid peptide. *Cell Death Differ*, 11:875-884.

[116] J. Hur, V. Mateo, N. Amalric, M. Babiak, G. Béréziat, C. Kanony-Truc, T. Clerc, R. Blaise, I. Limon (2018). Cerebrovascular β-amyloid deposition and associated microhemorrhages in a Tg2576 Alzheimer mouse model are reduced with a DHA-enriched diet. *FASEB J*, 32:4972-4983.

[117] A. Vromman, N. Trabelsi, C. Rouxel, G. Béréziat, I. Limon, R. Blaise (2013). β-amyloid context intensifies vascular smooth muscle cells induced inflammatory response and de-differentiation. *Aging Cell*, 12:358-369.

[118] S. Agarwal, C. Achari, D. Praveen, K.R. Roy, G.V. Reddy, P. Reddanna (2009). Inhibition of 12-LOX and COX2 reduces the proliferation of human epidermoid carcinoma cells (A431) by modulating the ERK and PI3K-Akt signalling pathways. *Exp Dermatol*, 18:939-946.

[119] R. Blaise, V. Mateo, C. Rouxel, F. Zaccarini, M. Glorian, G. Bereziat, V.S. Golubkov, I. Limon (2012). Wild-type amyloid beta 1-40 peptide induces vascular smooth muscle cell death independently from matrix metalloprotease activity. *Aging Cell*, 11:384-393.

[120] D. Somjen, F. Kohen, R. Limor, O. Sharon, E. Knoll, A. Many, N. Stern (2016). Estradiol-17β increases 12- and 15-lipoxygenase (type2) expression and activity and reactive oxygen species in human umbilical vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 163:28-34.

[121] P.F. Li, R. Dietz, R. von Harsdorf (1997). Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett*, 404:249-252.

[122] L.R. Castro, N. Gervasi, E. Guiot, L. Cavellini, V.O. Nikolaev, D. Paupardin-Tritsch, P. Vincent (2010). Type 4 phosphodiesterase plays different integrating roles in different cellular domains in pyramidal cortical neurons. *J Neurosci*, 30:6143-6151.

[123] L.R. Castro, E. Guiot, M. Polito, D. Paupardin-Tritsch, P. Vincent (2014). Decoding spatial and temporal features of neuronal cAMP/PKA signaling with FRET biosensors. *Biotechnol J*, 9:192-202.

[124] C. Yapo, A.G. Nair, L. Clement, L.R. Castro, J. Hellgren Kotaleski, P. Vincent (2017). Detection of phasic dopamine by D1 and D2 striatal medium spiny neurons. *J Physiol*, 595:7451-7475.

[125] C. Yapo, A.G. Nair, J. Hellgren Kotaleski, P. Vincent, L.R.V. Castro (2018). Switch-like PKA responses in the nucleus of striatal neurons. *J Cell Sci*, 131

[126] K. Blirando, R. Blaise, N. Gorodnaya, C. Rouxel, O. Meilhac, P. Vincent, I. Limon (2015). The stellate vascular smooth muscle cell phenotype is induced by IL-1β via the secretion of PGE2 and subsequent cAMP-dependent protein kinase A activation. *Biochim Biophys Acta*, 1853:3235-3247.

[127] N. Clement, M. Glorian, M. Raymondjean, M. Andreani, I. Limon (2006). PGE2 amplifies the effects of IL-1beta on vascular smooth muscle cell de-differentiation: a consequence of the versatility of PGE2 receptors 3 due to the emerging expression of adenylyl cyclase 8. *J Cell Physiol*, 208:495-505.

[128] M. Gueguen, Z. Keuylian, V. Mateo, N. Mougenot, A.M. Lompre, J.B. Michel, O. Meilhac, L. Lipskaia, I. Limon (2010). Implication of adenylyl cyclase 8 in pathological smooth muscle cell migration occurring in rat and human vascular remodelling. *J Pathol*, 221:331-342.

[129] B. Vallin, Y. Legueux-Cajgfinger, N. Clément, M. Glorian, L. Duca, P. Vincent, I. Limon, R. Blaise (2018). Novel short isoforms of adenylyl cyclase as negative regulators of cAMP production. *Biochim Biophys Acta*, 1865:1326-1340.

[130] J.C. de la Torre (2012). Cerebral hemodynamics and vascular risk factors: setting the stage for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 32:553-567.

[131] C. Iadecola (2013). The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*, 80:844-866.

[132] J. Attems, K. Jellinger, D.R. Thal, W. Van Nostrand (2011). Review: sporadic cerebral amyloid angiopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 37:75-93.

[133] M. Morgado, E. Cairrão, A.J. Santos-Silva, I. Verde (2012). Cyclic nucleotide-dependent relaxation pathways in vascular smooth muscle. *Cell Mol Life Sci*, 69:247-266.

[134] T. Thomas, G. Thomas, C. McLendon, T. Sutton, M. Mullan (1996). beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature*, 380:168-171.

[135] T. Thestrup et al. (2014). Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nat Methods*, 11:175-182.

[136] J.B. Klarenbeek, J. Goedhart, M.A. Hink, T.W. Gadella, K. Jalink (2011). A mTurquoise-based cAMP sensor for both FLIM and ratiometric read-out has improved dynamic range. *PLoS One*, 6:e19170.

[137] A. Yamada, K. Hirose, A. Hashimoto, M. Iino (2005). Real-time imaging of myosin II regulatory light-chain phosphorylation using a new protein biosensor. *Biochem J*, 385:589-594.

[138] F. Antigny et al. (2016). Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*, 133:1371-1385.

[139] F. Hubert, M. Belacel-Ouari, B. Manoury, K. Zhai, V. Domergue-Dupont, P. Mateo, F. Joubert, R. Fischmeister, V. Leblais (2014). Alteration of vascular reactivity in heart failure: role of phosphodiesterases 3 and 4. *Br J Pharmacol*, 171:5361-5375.

[140] P. Libby, P.M. Ridker, G.K. Hansson (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473:317-325.

[141] M. Gueguen, B. Vallin, M. Glorian, R. Blaise, I. Limon (2016). Adénylyl cyclases et transdifférenciation des cellules musculaires lisses vasculaires : rôle dans le remodelage vasculaire pathologique. *Biol Aujourdhui*, 210:153-166.

[142] M.R. Bennett, S. Sinha, G.K. Owens (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*, 118:692-702.

[143] T. Inoue, K. Node (2009). Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents. *Circ J*, 73:615-621.

[144] W.S. Weintraub (2007). The pathophysiology and burden of restenosis. *Am J Cardiol*, 100:3K-9K.

[145] P. Cirillo, P. Golino, M. Ragni, C. Battaglia, F. Pacifico, S. Formisano, C. Buono, M. Condorelli, M. Chiariello (1999). Activated platelets and leucocytes cooperatively stimulate smooth muscle cell proliferation and proto-oncogene expression via release of soluble growth factors. *Cardiovasc Res*, 43:210-218.

[146] A. Schömig et al. (1996). A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med*, 334:1084-1089.

[147] T. Inoue, K. Croce, T. Morooka, M. Sakuma, K. Node, D.I. Simon (2011). Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC Cardiovasc Interv*, 4:1057-1066.

[148] A. Kalra, H. Rehman, S. Khera, B. Thyagarajan, D.L. Bhatt, N.S. Kleiman, R.W. Yeh (2017). New-Generation Coronary Stents: Current Data and Future Directions. *Curr Atheroscler Rep*, 19:14.

[149] T.B. Johnstone, S.R. Agarwal, R.D. Harvey, R.S. Ostrom (2018). cAMP Signaling Compartmentation: Adenylyl Cyclases as Anchors of Dynamic Signaling Complexes. *Mol Pharmacol*, 93:270-276.

[150] M.L. Halls, D.M.F. Cooper (2017). Adenylyl cyclase signalling complexes - Pharmacological challenges and opportunities. *Pharmacol Ther*, 172:171-180.

[151] J.G. Webb, P.W. Yates, Q. Yang, Y.V. Mukhin, S.M. Lanier (2001). Adenylyl cyclase isoforms and signal integration in models of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281:H1545-52.

[152] P. Bobin, M. Belacel-Ouari, I. Bedioune, L. Zhang, J. Leroy, V. Leblais, R. Fischmeister, G. Vandecasteele (2016). Cyclic nucleotide phosphodiesterases in heart and vessels: A therapeutic perspective. *Arch Cardiovasc Dis*, 109:431-443.

[153] R.G. Deeley, C. Westlake, S.P. Cole (2006). Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev*, 86:849-899.

[154] M.D. Nielsen, G.C. Chan, S.W. Poser, D.R. Storm (1996). Differential regulation of type I and type VIII Ca2+-stimulated adenylyl cyclases by Gi-coupled receptors in vivo. *J Biol Chem*, 271:33308-33316.

[155] D. Willoughby, D.M. Cooper (2006). Ca2+ stimulation of adenylyl cyclase generates dynamic oscillations in cyclic AMP. *J Cell Sci*, 119:828-836.

[156] C. Gu, D.M. Cooper (1999). Calmodulin-binding sites on adenylyl cyclase type VIII. *J Biol Chem*, 274:8012-8021.

[157] J.J. Cali, J.C. Zwaagstra, N. Mons, D.M. Cooper, J. Krupinski (1994). Type VIII adenylyl cyclase. A Ca2+/calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J Biol Chem*, 269:12190-12195.

[158] D. Delmeire, D. Flamez, S.A. Hinke, J.J. Cali, D. Pipeleers, F. Schuit (2003). Type VIII adenylyl cyclase in rat beta cells: coincidence signal detector/generator for glucose and GLP-1. *Diabetologia*, 46:1383-1393.

[159] N. Defer, O. Marinx, D. Stengel, A. Danisova, V. Iourgenko, I. Matsuoka, D. Caput, J. Hanoune (1994). Molecular cloning of the human type VIII adenylyl cyclase. *FEBS Lett*, 351:109-113.

[160] M. Raoux et al. (2015). Multilevel control of glucose homeostasis by adenylyl cyclase 8. *Diabetologia*, 58:749-757.

[161] Z. Keuylian, J.H. de Baaij, M. Gueguen, M. Glorian, C. Rouxel, E. Merlet, L. Lipskaia, R. Blaise, V. Mateo, I. Limon (2012). The Notch pathway attenuates interleukin 1beta (IL1beta)-mediated induction of adenylyl cyclase 8 (AC8) expression during vascular smooth muscle cell (VSMC) trans-differentiation. *J Biol Chem*, 287:24978-24989.

[162] K.M. Fetalvero, M. Shyu, A.P. Nomikos, Y.F. Chiu, R.J. Wagner, R.J. Powell, J. Hwa, K.A. Martin (2006). The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290:H1337-46.

[163] A. Chatterjee, A. Sharma, M. Chen, R. Toy, G. Mottola, M.S. Conte (2014). The pro-resolving lipid mediator maresin 1 (MaR1) attenuates inflammatory signaling pathways in vascular smooth muscle and endothelial cells. *PLoS One*, 9:e113480.

[164] L. Gesquière, N. Loreau, D. Blache (2000). Role of the cyclic AMP-dependent pathway in free radical-induced cholesterol accumulation in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*, 29:181-190.

[165] R.C. Hewer, G.B. Sala-Newby, Y.J. Wu, A.C. Newby, M. Bond (2011). PKA and Epac synergistically inhibit smooth muscle cell proliferation. *J Mol Cell Cardiol*, 50:87-98.

[166] J.S. McKean, F. Murray, G. Gibson, D.A. Shewan, S.J. Tucker, G.F. Nixon (2015). The cAMP-producing agonist beraprost inhibits human vascular smooth muscle cell migration via exchange protein directly activated by cAMP. *Cardiovasc Res*, 107:546-555.

[167] C. Indolfi et al. (2000). 8-chloro-cAMP inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointima formation induced by balloon injury in vivo. *J Am Coll Cardiol*, 36:288-293.

[168] J.R. Chao, Y.G. Ni, C.A. Bolanos, Z. Rahman, R.J. DiLeone, E.J. Nestler (2002). Characterization of the mouse adenylyl cyclase type VIII gene promoter: regulation by cAMP and CREB. *Eur J Neurosci*, 16:1284-1294.

[169] L.M. Muglia, M.L. Schaefer, S.K. Vogt, G. Gurtner, A. Imamura, L.J. Muglia (1999). The 5'-flanking region of the mouse adenylyl cyclase type VIII gene imparts tissue-specific expression in transgenic mice. *J Neurosci*, 19:2051-2058.

[170] R. Blaise, T. Guillaudeux, G. Tavernier, D. Daegelen, B. Evrard, A. Mairal, C. Holm, B. Jegou, D. Langin (2001). Testis hormone-sensitive lipase expression in spermatids is governed by a short promoter in transgenic mice. *J Biol Chem*, 276:5109-5115.

[171] M.V. Tzvetkov, C. Meineke, E. Oetjen, K. Hirsch-Ernst, J. Brockmöller (2007). Tissue-specific alternative promoters of the serotonin receptor gene HTR3B in human brain and intestine. *Gene*, 386:52-62.

[172] Z. Sun, P. Sassone-Corsi, A.R. Means (1995). Calspermin gene transcription is regulated by two cyclic AMP response elements contained in an alternative promoter in the calmodulin kinase IV gene. *Mol Cell Biol*, 15:561-571.

[173] J.J. Cali, R.S. Parekh, J. Krupinski (1996). Splice variants of type VIII adenylyl cyclase. Differences in glycosylation and regulation by Ca2+/calmodulin. *J Biol Chem*, 271:1089-1095.

[174] R.S. Ostrom, X. Liu, B.P. Head, C. Gregorian, T.M. Seasholtz, P.A. Insel (2002). Localization of adenylyl cyclase isoforms and G protein-coupled receptors in vascular smooth muscle cells: expression in caveolin-rich and noncaveolin domains. *Mol Pharmacol*, 62:983-992.

[175] A. Baragli, M.L. Grieco, P. Trieu, L.R. Villeneuve, T.E. Hébert (2008). Heterodimers of adenylyl cyclases 2 and 5 show enhanced functional responses in the presence of Galpha s. *Cell Signal*, 20:480-492.

[176] C. Gu, J.J. Cali, D.M. Cooper (2002). Dimerization of mammalian adenylate cyclases. *Eur J Biochem*, 269:413-421.

[177] C. Gu, A. Sorkin, D.M. Cooper (2001). Persistent interactions between the two transmembrane clusters dictate the targeting and functional assembly of adenylyl cyclase. *Curr Biol*, 11:185-190.

[178] Y. Cai, D.J. Nagel, Q. Zhou, F. Li, X. Pi, P. Knight, C. Yan (2015). Role of cAMP-Phosphodiesterase 1C Signaling in Regulating Growth Factor Receptor Stability, Vascular Smooth Muscle Cell Growth, Migration, and Neointimal Hyperplasia. *Circ Res*, 116:1120-1132.

[179] D.G. Tilley, D.H. Maurice (2005). Vascular smooth muscle cell phenotype-dependent phosphodiesterase 4D short form expression: role of differential histone acetylation on cAMP-regulated function. *Mol Pharmacol*, 68:596-605.

[180] N. Clement, M. Gueguen, M. Glorian, R. Blaise, M. Andreani, C. Brou, P. Bausero, I. Limon (2007). Notch3 and IL-1beta exert opposing effects on a vascular smooth muscle cell inflammatory pathway in which NF-kappaB drives crosstalk. *J Cell Sci*, 120:3352-3361.

[181] R. Blaise, M. Mahjoub, C. Salvat, U. Barbe, C. Brou, M.T. Corvol, J.F. Savouret, F. Rannou, F. Berenbaum, P. Bausero (2009). Involvement of the Notch pathway in the regulation of matrix metalloproteinase 13 and the dedifferentiation of articular chondrocytes in murine cartilage. *Arthritis Rheum*, 60:428-439.

[182] J.H. Kim, S.R. Lee, L.H. Li, H.J. Park, J.H. Park, K.Y. Lee, M.K. Kim, B.A. Shin, S.Y. Choi (2011). High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One*, 6:e18556.

[183] A. Hasbi, M.L. Perreault, M.Y. Shen, L. Zhang, R. To, T. Fan, T. Nguyen, X. Ji, B.F. O'Dowd, S.R. George (2014). A peptide targeting an interaction interface disrupts the dopamine D1-D2 receptor heteromer to block signaling and function in vitro and in vivo: effective selective antagonism. *FASEB J*, 28:4806-4820.

[184] H. Bruzzoni-Giovanelli, V. Alezra, N. Wolff, C.Z. Dong, P. Tuffery, A. Rebollo (2018). Interfering peptides targeting protein-protein interactions: the next generation of drugs. *Drug Discov Today*, 23:272-285.

[185] F. Ahmadi, Z. Oveisi, S.M. Samani, Z. Amoozgar (2015). Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res Pharm Sci*, 10:1-16.

[186] L. Lipskaia, F. del Monte, T. Capiod, S. Yacoubi, L. Hadri, M. Hours, R.J. Hajjar, A.M. Lompré (2005). Sarco/endoplasmic reticulum Ca2+-ATPase gene transfer reduces vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat. *Circ Res*, 97:488-495.

ARTICLE 1

Wild-type amyloid beta 1-40 peptide induces vascular smooth muscle cell death independently from matrix metalloprotease activity.

Blaise R, Mateo V, Rouxel C, Zaccarini F, Glorian M, Bérériat G, Golubkov VS, Limon I

Aging Cell. 2012 Jun;11(3):384-93

ARTICLE 2

β-amyloid context intensifies vascular smooth muscle cells induced-inflammatory response and de-differentiation.

Vromman A, Trabelsi N, Rouxel C, Béréziat G, Limon I and **Blaise R**.

Aging Cell. 2013 Jun;12(3):358-69. [Epub ahead of print]

ARTICLE 3

A DHA-enriched diet reduces cerebrovascular β-amyloid deposition and associated microhaemorrages in Tg2576-Alzheimer mouse model

Hur J, Mateo V, Babiak M, Béréziat G, Kanoni-Truc C, Clerc T, **Blaise R**[*] and Limon I[*]. ([*] *co-last authors)*

FASEB J. 2018 Sep;32(9):4972-4983

ARTICLE 4

Novel short isoforms of adenylyl cyclase as negative regulators of cAMP production.

Vallin B, Legueux-Cajgfinger Y, Clément N, Glorian M, Duca L, Vincent P*, Limon I* and **Blaise R***.
(* *co-last authors)*

Biochim Biophys Acta (Mol Cell Research). 2018 Sep;1865(9):1326-1340

PHENOTYPIC ALTERATIONS OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN ALZHEIMER DISEASE AND ATHEROSCLEROSIS

Régis BLAISE, Ph.D
Assistant Professor at Sorbonne University, Paris.

All the research I conducted from my first postdoctoral position in 2000 to today, focused on the study of signaling pathways involved in the phenotypic transition that specialized cells undergo during development of diseases. Indeed, during my last three postdoctoral fellowships, I worked on i) the NF-κB signaling pathway in leukemia and lymphomas ii) the Notch signaling pathway in chondrocyte differentiation during osteoarthritis and iii) the study of different signaling pathways in the phenotypic transition of smooth muscle cells in vascular diseases. When I joined the team "Phenotypic control of vascular smooth muscle cells (VSMCs)" at Sorbonne University in 2009, I developed a new research project to study vascular alterations in the context of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD) and cerebral amyloid angiopathy (CAA).

CAA are cerebrovascular pathologies characterized by amyloid peptides deposits around or within the wall of cerebral vessels. For about ten years, it has been shown, both *in vitro* and *in vitro*, that the accumulation of Aβ peptides in the cerebral cortex and/or the vascular wall generates inflammation, reinforcing the hypothesis that the ontogeny of CAA is associated with the development of vascular inflammation. Moreover, in the arterial wall, accumulation of amyloid peptides $A\beta_{1\text{-}40}$ ultimately results in an alteration of VSMCs adhesion to the extracellular matrix (ECM), associated with their degeneration. All of these leading to a loss of vessel wall integrity and to cerebral ischemia and haemorrhage, both key-features of CAA. During this project, I studied (i) the molecular mechanisms involved in the Aβ1-40-induced VSMCs degeneration and (ii) the influence of $A\beta_{1\text{-}40}$ peptide on parietal cells inflammatory responses.

From this *in vitro* study, I next developped an *in vivo* project aiminig to evaluate the beneficial effect of a diet enriched with docosahexanoic acid (DHA), which is known to attenuate inflammation in CAA/AD, on a transgenic model (Tg2576 mice). This study allowed us to demonstrate that a DHA-enriched diet reduced cerebrovascular alterations in Alzheimer's disease as well as the resulting cerebral microhemorrhages in our model. These observations being associated with a decrease of lipid inflammatory markers, such as 12-HETE, which production is induced by Aβ1-40 peptide in VSMCs *in vitro*, through induction of 12-Lox expression, leading to VSMCs apoptosis.

Alternatively to this project on AD/CAA, I also developped a project aiming to study the role of adenylyl Cyclase 8 (AC8) in pathological vascular remodelings such as atherosclerosis and restenosis, where VSMCs undergo a phenotypic transition to a migratory, secretory and proliferative phenotype. During my work on AC8, I identified and clone a new family of AC8 short isoforms (AC8E-H), expressed in transdifferenciated VSMCs, whose presence regulates cAMP production dynamics. Using biosensor imaging and biochemical approaches, we showed that AC8E-H isoforms have no cyclase activity and act as dominant-negative regulators by forming heterodimers with other full-length ACs, impeding the traffic of functional units towards the plasma membrane, and decreasing cAMP production, known to have vasoprotective effets. These short AC8s should therefore constitute new therapeutic targets in the treatment of atherosclerosis and in pathological vascular remodeling.