



HAL
open science

Influence des microparticules sur la fonction vasculaire lors de pathologies hypoxiques

Simon Tual-Chalot

► **To cite this version:**

Simon Tual-Chalot. Influence des microparticules sur la fonction vasculaire lors de pathologies hypoxiques. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2011. Français. NNT: . tel-00978657

HAL Id: tel-00978657

<https://theses.hal.science/tel-00978657>

Submitted on 14 Apr 2014

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.

Influence des microparticules sur la fonction vasculaire lors de pathologies hypoxiques

Thèse de Doctorat

Spécialité : Physiologie & Physiopathologie Humaine

Ecole doctorale Biologie Santé

Présentée et soutenue publiquement

Le 12 octobre 2011, à Angers

Par

Simon TUAL-CHALOT

Devant le jury ci-dessous:

Pr Patrick LEVY	Rapporteur	PU-PH, Université de Grenoble
Pr Roger MARTHAN	Rapporteur	PU-PH, Université de Bordeaux
Pr Patrick SAULNIER	Examineur	PU, Université d'Angers

Directeur de thèse:

Docteur Maria Del Carmen MARTINEZ

INSERM U694

SOMMAIRE

SOMMAIRE	1
REMERCIEMENTS.....	6
LISTE DES PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS	11
ABBREVIATIONS	14
LISTE DES FIGURES & TABLEAUX	19
AVANT-PROPOS.....	22
CHAPITRE 1 - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	25
I. Le système vasculaire et ses fonctions.....	26
1. La circulation sanguine	26
1.1. Organisation et rôles.....	26
1.1.1. La circulation systémique ou grande circulation.....	26
1.1.2. La circulation pulmonaire ou petite circulation	27
1.1.3. Morphologie et histologie de la paroi artérielle	28
1.2. Mécanismes de régulation de la vasomotricité.....	30
1.2.1. Contraction des cellules musculaires lisses.....	30
1.2.2. Relaxation des cellules musculaires lisses	32
2. Physiologie de l'endothélium.....	35
2.1. Hétérogénéité structurelle et fonctionnelle de l'endothélium	35
2.2. Facteurs vasoactifs produits par l'endothélium.....	35
2.2.1. Facteurs relaxants dérivé de l'endothélium.....	35
2.2.2. Facteurs contractants dérivés de l'endothélium	41
2.2.3. Les autres médiateurs	43
2.3. La dysfonction endothéliale	45
II. Les microparticules circulantes	46
1. Découverte et définition	46
2. Formation des microparticules	46
2.1. L'activation cellulaire	47
2.2. L'apoptose.....	49
2.3. Autres mécanismes de formation	49

3. Composition et contenu des microparticules	50
3.1. Contenu protéique	50
3.2. Contenu lipidique	51
4. Interaction entre les microparticules et les cellules cibles	51
4.1. Interaction ligand-récepteur	52
4.2. Transfert de composants.....	53
4.3. Fusion et internalisation	53
5. Les microparticules : biomarqueurs et effecteurs dans les pathologies cardio-vasculaires	54
5.1. Effets des microparticules sur la fonction vasculaire.....	54
5.2. Angiogenèse et microparticules	55
6. Modulation et action thérapeutique des microparticules.....	57
III. Physiopathologie de l'endothélium : l'exemple de deux pathologies hypoxiques.....	59
1. Les pathologies pulmonaires	59
2. L'hypertension artérielle pulmonaire	59
2.1. Classification clinique des hypertensions pulmonaires.....	59
2.2. Manifestations cliniques et diagnostic	61
2.3. Pathogénèse globale	61
2.4. Stratégie thérapeutique	63
2.5. Modèles animaux	64
3. Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil.....	65
3.1. Manifestations cliniques et diagnostic	65
3.2. Pathogénèse globale	66
3.3. Stratégie thérapeutique	69
OBJECTIFS DES TRAVAUX	70
CHAPITRE 2 - RESULTATS.....	72
Partie I : Les microparticules circulantes issues de rats hypoxiques chroniques entraînent une dysfonction endothéliale	73
I. But de l'étude	74

II. Matériel et méthodes.....	75
1. Matériel biologique	75
1.1. Microparticules issues d'un modèle animal : le rat hypoxique	75
1.2. Cellules endothéliales d'aorte et d'artère pulmonaire de rats	78
2. Cytométrie en flux.....	79
3. Western blot	80
4. Dosage des radicaux libres par résonnance paramagnétique électronique.....	82
5. Dosage de l'activité de la xanthine oxydase	83
6. Réactivité vasculaire.....	83
7. Analyse statistique.....	84
III. Résultats	85
IV. Discussion	95
Partie II : Microparticules issues de patients syndrome d'apnées obstructives du sommeil et hyperréactivité vasculaire : rôle de l'endothélium	102
I. But de l'étude	103
II. Matériel et méthodes.....	104
1. Matériel biologique	104
2. Cytométrie en flux.....	105
3. Réactivité vasculaire.....	105
4. Western blot	106
5. Dosage du monoxyde d'azote	106
6. Dosage des divers prostanoïdes.....	107
7. Analyse statistique des résultats	107
III. Résultats	108
IV. Discussion	122
Partie III : Microparticules issues de patients syndrome d'apnées obstructives du sommeil et angiogenèse	127
I. But de l'étude	128
II. Matériel et méthodes.....	129

1. Matériel biologique	129
2. Mesure du taux de VEGF	129
3. Western blot	130
4. Prolifération cellulaire	130
5. Mesure de la formation de capillaire sur Matrigel	131
6. Analyse statistique des résultats	131
III. Résultats	132
IV. Discussion	137
CHAPITRE 3 - CONCLUSION & PERSPECTIVES	141
ANNEXES	145
BIBLIOGRAPHIE	148
PUBLICATIONS & MANUSCRIT	167
Revue :	
Microvesicles: intercellular vector of biological messages Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R, MartinezMC. Molecular Interventions, 2011	168
Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease MartinezMC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Trends in Pharmacological Sciences, 2011	176
Publications :	
Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction Tual-Chalot S American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2010	184
Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnea Trzepizur W, Priou P, Paris A, Nardi J, Tual-Chalot S, Meslier N, Urban T, Andriantsitohaina R, Martinez MC, Gagnadoux F. European Respiratory Journal, 2011	193
Manuscrit :	
Sleep apnea syndrome microparticles enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium Tual-Chalot S, Fatoumata K, Priou P, Trzepizur W, Contreras C, Prieto D, Martinez MC, Gagnadoux F, Andriantsitohaina R	197

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Docteur Carmen Martinez qui m'a accueilli et guidé depuis mon master 2. Merci vivement de ton soutien constant, de ta grande disponibilité et de ta gentillesse. J'espère que tu trouveras ici l'expression de ma reconnaissance.

Ce travail n'aurait également pas pu se faire sans la volonté et l'efficacité du Docteur Ramaroson Andriantsitohaina. Je le remercie vivement pour nos échanges scientifiques que nous avons pu avoir tous ensemble, notamment le lundi matin.

Je remercie monsieur le Professeur Patrick Lévy et monsieur le Professeur Roger Marthan d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mes travaux de thèse. Je leur exprime toute ma gratitude pour l'honneur qu'ils me font en jugeant ce travail.

Je remercie également monsieur le Professeur Patrick Saulnier d'avoir accepté de me faire l'honneur de participer à ce jury.

Un remerciement très particulier au Dr Christelle Guibert de l'INSERM U1045 pour son travail sur l'obtention des MPs hypoxiques, son accueil lors de ma visite et les échanges scientifiques qui m'ont permis de réaliser ce travail.

Merci également à l'équipe du service de Pneumologie du CHU d'Angers, et plus particulièrement le Professeur Frédéric Gagnadoux, et les Docteur Pascaline Priou et Wojciech Trzepizur pour les MPs, les discussions et la bonne humeur toujours présente !

Je tiens également à remercier le GRRC et la SFP de donner la possibilité aux jeunes chercheurs de s'exprimer et de participer à la communauté scientifique, ainsi que pour leurs soirées de folies !!!!

Je souhaite remercier chaleureusement Carmen et Naina qui sont beaucoup plus que des encadrants, et qui nous permettent de nous sentir vraiment bien au sein du laboratoire. Vous avez placé la barre très haute pour mes futurs laboratoires !

J'aimerai également remercier toutes les personnes partageant au quotidien la vie du laboratoire et qui rendent les conditions de travail si agréable, Matthieu un vrai collègue et vrai ami, Lucie même si on ne joue plus dans la même catégorie et Raffa membre indispensable de l'équipe Martinez.

Je tiens à remercier également les anciens et actuels membres de l'équipe Naina-Martinez, Angela, Daniela (partenaire attirée de myographie), Francesco et Mariele, Carmina, Christina et Vannina, Ahmed, Abdel et Tarek, Alexis, Françoise, Nicolas et Sébastien qui m'ont accompagné et ont participé à ma formation tout au long de ces derniers années. Merci également à Céline qui a contribué à ma grande passion pour les animaleries...Merci enfin à Fatou, Henry et Angélique pour leur contribution apportée a ce travail. Merci à vous pour votre gentillesse et vos précieux conseils.

J'ai commencé ce travail dans l'UMR CNRS 6214-INSERM 771 du Docteur Daniel Henrion. Emilie, Anne-Laure, Kévin, Bertrand, Jennifer, Lamine, Kahena et Emmanuelle Maire, je les remercie. Ma dernière année a débuté par un grand déménagement (dans des supers locaux !!!) et s'est effectuée dans l'U694 dirigé par le Professeur Yves Malthiéry. Audrey, Delphine, Jihane, Luisa (et les poissons obèses !); Aziz, Caroline, Emilie, Ghaceb (bon courage avec Lucie !), Jacques; Amine (dernière année !) et Mireille (super intendante), à tous merci de m'avoir apporté une aide parfois précieuse dans la réalisation de mes

expériences, et dans la réponse à toutes les questions pratiques, techniques et administratives auxquelles un étudiant en thèse se retrouve forcément confrontés.

Une petite pensée pour nos rivaux-amis de l'IBT toujours prêts pour une pétanque à lille ou ailleurs, et membres du Layon's Club,

Archidelaballe, toujours partant pour tout, dattebayo!!!

La famille Bastiat-Pinier, Guillaume, l'homme le plus fort du monde, capable de soulever un stade à lui tout seul et Maud P, Dr², femme la plus forte du monde pour supporter son homme.

Elisa, ma petite espagnole support de star, bon courage avec tes monkeys

Florian, mélodicien de talent, aussi étourdi que moi, ça me fait bien plaisir!!!

Marie Morille, organisatrice de tournoi mais déteste perdre...

Maud G, parisienne de talent, femme chocolat...

Matt, que de bons moments à la piscine, au golf, au travail aussi!!!

Lucie, perturbatrice de tous les instants, reine de l'oxygraphie, bon courage pour la dernière ligne droite...

Raffa, tu as le cœur sur la main, je n'oublierai pas que c'est toujours mieux quand Raffa est là...

Iacco, italien jusqu'au bout des ongles, avec tout ce que cela implique...

Welsh le pub, Welsh la bière et Welsh le chat

Merci d'être là à tous les instants de la vie

A tous ceux que je n'ai pas mentionné et qui ont contribué de près ou de loin à être ce que je suis, tous les Lasséens, à l'avenir...

Je voudrais également remercier la très grande famille Roger-Maubert-Naulet de Vieil Baugé, ainsi qu'Emilie, une de ses plus folle représentante (désolé mais mes derniers remerciements ne seront pas pour toi!)

Je voudrais enfin remercier ma famille, notamment mes parents, Yves et Patricia, qui m'ont soutenu tout au long de mes biens longues études, mes petits frères et sœur, Matthieu, Pierre et Camille.

Mon dernier remerciement sera pour toi Mathilde qui m'a ouvert la voie, merci d'être là. Je ne suis pas inquiet pour notre avenir non plus et tu sais pourquoi...

Pour Camille

LISTE DES PUBLICATIONS
& COMMUNICATIONS

ARTICLES PUBLIES

Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci*. (Sous presse).

Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microvesicles: intercellular vectors of biological messages. *Mol Inter* 2011;11:88-94.

Trzepizur W, Priou P, Paris A, Nardi J, Tual-Chalot S, Meslier N, Urban T, Andriantsitohaina R, Martinez MC, Gagnadoux F. Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2011;37:1293-1295.

Benameur T, Tual-Chalot S, Andriantsitohaina R, Martinez MC. PPARalpha is essential for microparticle-induced differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cell and angiogenesis. *Plos One* 2010;5.

Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:261-268.

ARTICLES SOUMIS OU EN PREPARATION

Tual-Chalot S, Fatoumata K, Priou P, Trzepizur W, Contreras C, Prieto D, Martinez MC, Gagnadoux F, Andriantsitohaina R. Sleep apnea syndrome microparticles enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium. *Soumis*.

Rottner M, Tual-Chalot S, Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Freyssinet JM, Martinez MC. Increased oxidative stress induces apoptosis in cystic fibrosis cells. *Soumis à Plos One*.

Lopez-Andres N, Tesse A, Regnault V, Huguet L, Cattan V, Thornton S, labat C, Kakou A, Tual-Chalot S, Faure S, Challande P, Osborne-Pellegrin M, Martinez MC, Lacolley P, Andriantsitohaina R. Increased microparticle production and impaired microvascular endothelial function in aldosterone-salt-treated rats. Protective effects of Polyphenols. *Soumis à British Journal of Pharmacology*.

COMMUNICATIONS

Tual-Chalot S, Fatoumata K, Priou P, Trzepizur W, Contreras C, Prieto D, Martinez MC, Gagnadoux F, Andriantsitohaina R. Microparticles from OSA patients induce hyper-reactivity through up-regulation of pro-inflammatory proteins. *Congrès du GRRC, Lyon, 2011. Communication affichée. Prix de la communication affichée. Archives of Cardiovascular diseases, 2011; 2 :1-91.*

Jeanneteau J, Martinez MC, Tual-Chalot S, Tamareille S, Furber A, Andriantsitohaina R, Prunier F. Microparticle release in remote ischemic preconditioning mechanism. *Congrès du GRRC, Lyon, 2011. Communication affichée. Archives of Cardiovascular diseases, 2011; 2 :1-91.*

Tual-Chalot S, Fatoumata K, Priou P, Trzepizur W, Contreras C, Prieto D, Martinez MC, Gagnadoux F, Andriantsitohaina R. *Congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Grenoble, 2011. Communication affichée. Fundam Clin. Pharmacol., 2011 ; 25 (suppl 1) : 112-125.*

Tual-Chalot S, Guibert C, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Journées de Recherche Respiratoire, Nantes, 2010. Communication affichée. Rev Mal Respir Actual, 2010 ; 2 : 3-58.*

Tual-Chalot S, Guibert C, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats are vectors of oxidative stress. *5ème journée de l'IFR 132, Avril 2010. Communication orale.*

Tual-Chalot S, Guibert C, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats are vectors of oxidative stress. *Congrès du GRRC, Nantes, 2010. Communication affichée. Archives of Cardiovascular diseases, 2010; 17 (suppl 2).*

Tual-Chalot S, Rottner M, Mostefai HA, Andriantsitohaina R, Freyssinet JM, Martinez MC. Increased oxidative stress induces apoptosis in cystic fibrosis cells. *4ème journée de l'IFR 132, Décembre 2009. Communication orale.*

Benameur T, Tual-Chalot S, Andriantsitohaina R, Martinez MC PPARalpha is essential for microparticle-induced differentiation of bone marrow- derived endothelial progenitor cell and *in vitro* angiogenesis. *European Council for Cardiovascular Research, Nice, 2009. Communication orale. Hypertension, 54 (5):1169-9.*

Tual-Chalot S, Guibert C, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles induce endothelial dysfunction in a rat model of pulmonary hypertension. *3ème journée de l'IFR 132, Mai 2009. Communication orale.*

Tual-Chalot S, Guibert C, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles induce endothelial dysfunction in a rat model of pulmonary hypertension. *Congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Marseille, 2009. Prix de la communication orale. Fundam Clin. Pharmacol., 2009 ; 23 (suppl 1) : 1-112.*

Benameur T, Tual-Chalot S, Andriantsitohaina R, Martinez MC. PPARalpha is essential for microparticle-induced differentiation of bone marrow- derived endothelial progenitor cell and *in vitro* angiogenesis. *Congrès de la Société Française de Pharmacologie et de Thérapeutique, Marseille, 2009. Communication orale. Fundam Clin. Pharmacol., 2009; 23 (suppl 1) : 1-112.*

Tual-Chalot S, Guibert C, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles induce endothelial dysfunction in a rat model of pulmonary hypertension. *Congrès du GRRC, Nancy, 2009. Communication orale. Archives of Cardiovascular diseases, 2009; 102 (suppl 1).*

Benameur T, Tual-Chalot S, Andriantsitohaina R, Martinez MC PPARalpha is essential for microparticle-induced differentiation of bone marrow- derived endothelial progenitor cell and *in vitro* angiogenesis. *Congrès du GRRC, Nancy, 2009. Communication orale. Archives of Cardiovascular diseases, 2009; 102 (suppl 1).*

ABBREVIATIONS

5-HT	Sérotonine
AA	Acide arachidonique
Ac-LDL	Lipoprotéines de basse densité acétylées
ActD	Actinomycine D
AMPc	Adénosine-3'5'-monophosphate cyclique
ANOVA	Analyse globale de la variance
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
BSA	Albumine sérique bovine
CEs	Cellules endothéliales
CMH	1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl 2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine
CML	Cellules musculaires lisses
COX	Cyclooxygénase
COX-1	Cyclooxygénase constitutive
COX-2	Cyclooxygénase inductible
CXCR4	Co-récepteur à chémokine de type 4
DAG	Diacylglycérol
DETC	Diéthylthiocarbamate
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
EBM-2	Endothelial basal cell medium-2
EDHF	Facteurs hyperpolarisants dépendants de l'endothélium
E _{max}	Effet maximal
EMPs	Microparticules endothéliales
eNOS	Monoxyde d'azote synthase endothéliale
ERO	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
ET	Endothéline
ET _B	Récepteurs endothéliaux à l'endothéline

Fe(DETC) ₂	Diethyldithiocarbamate de fer
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
GCs	Guanylate cyclase soluble
GMPc	Guanosine-3'5'-monophosphate cyclique
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
IAH	Index d'apnées-hypopnées
ICAM-1	Inter-cellular adhesion molecule 1
IDO	Index de désaturation de l'oxyhémoglobine
iNOS	Monoxyde d'azote synthase inductible
IP ₃	Inositol triphosphate
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
miARN	Micro acide ribonucléique messenger
MLC	Chaîne légère de la myosine
MLCK	Kinase des chaînes légères de la myosine
MLCP	Phosphatase de la chaîne légère de la myosine
MMPs	Métalloprotéinases
MPs	Microparticules
MV2	Endothelial cell growth medium
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
nNOS	Monoxyde d'azote synthase neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Monoxyde d'azote synthase

O ₂	Dioxygène
O ₂ ⁻	Anions superoxydes
ONNO ⁻	Peroxynitrites
PAP	Pression artérielle pulmonaire
PBS	Phosphate buffer saline
PGD ₂	Prostaglandine D ₂
PGE ₂	Prostaglandine E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandine F _{2α}
PGI ₂	Prostacycline
PHA	Phytohémagglutine
PI3K	Phosphatidyl-inositol 3 kinase
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol biphosphate
PK	Protéine kinase
PKGs	Protéines kinases guanosine-3'5'-monophosphate cyclique -dépendantes
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-myristate-acétate
PMPs	Microparticules plaquettaires
PPARα	Peroxisome proliferator-activated receptor α
PPC	Pression positive continue
PPP	Plasma pauvre en plaquettes
RIP ₃	Récepteur canal à l'inositol triphosphate
ROC	Receptor-operated channel
ROCK	Rho-associated protein kinase
RPE	Résonance paramagnétique électronique
RyR	Récepteur canal sensible à la ryanodine
SaO ₂	Saturation artérielle en oxygène
SAOS	Syndrome d'apnées obstructives du sommeil
SEM	Erreur standard de la moyenne
SERCA	Sarco endoplasmic reticulum ATPases
SVF	Sérum de veau fœtal

TP	Récepteurs au thromboxane A ₂
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand
TXA ₂	Thromboxane A ₂
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VOC	Voltage-operated channel

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

Figure 1	Représentation schématique de la circulation systémique et pulmonaire	27
Figure 2	Représentation schématique de la paroi vasculaire	29
Figure 3	Voies de signalisations intracellulaires de la contraction des cellules musculaires lisses.....	31
Figure 4	Voies de signalisations intracellulaires de la relaxation des cellules musculaires lisses.....	34
Figure 5	Facteurs vasorelaxants synthétisés par l'endothélium.....	36
Figure 6	Réaction catalysée par les NOS.....	37
Figure 7	Mécanisme de production de NO par l'eNOS.....	38
Figure 8	Effets multiples du NO endothélial	39
Figure 9	Métabolisme de l'acide arachidonique	40
Figure 10	Représentation schématique des diverses espèces réactives de l'oxygène et des réactions chimiques impliquées.....	43
Figure 11	Source d'anions superoxydes dans les cellules endothéliales	44
Figure 12	Mécanismes impliqués dans l'apparition de la dysfonction endothéliale	45
Figure 13	Voies de signalisations connues pour être impliquées dans la formation des microparticules	47
Figure 14	Mécanismes d'interactions entre les microparticules et leurs cellules cibles .	52
Figure 15	Les différentes étapes du processus angiogénique	56
Figure 16	Utilisation de microparticules comme outil thérapeutique.....	58
Figure 17	Rôle de la dysfonction endothéliale dans l'HTAP	62
Figure 18	Corrélation positive entre la sévérité de l'HTAP et le taux de microparticules d'origine endothéliale	63
Figure 19	Mécanisme de la dysfonction endothéliale observée dans le SAOS	67
Figure 20	Corrélation entre le taux de microparticules leucocytaires et la production de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales humaines Eahy 926	68
Figure 21	Effet de trois semaines d'hypoxie chronique chez le rat sur les valeurs de pression artérielle pulmonaire moyenne, du rapport de Fulton et de l'hématocrite.....	77
Figure 22	Taux circulants de microparticules chez les rats normoxiques et hypoxiques	87
Figure 23	Les microparticules issues des rats hypoxiques diminuent la production de NO dans les cellules endothéliales d'aorte.....	88
Figure 24	Les microparticules issues des rats hypoxiques diminuent la production de NO dans les cellules endothéliales d'artère pulmonaire.....	89
Figure 25	Les microparticules de rats hypoxiques diminuent la production d'O ₂ ⁻ uniquement dans les cellules endothéliales d'artère pulmonaires	90

Figure 26	Les microparticules hypoxiques diminuent la relaxation dépendante de l'endothélium.....	92
Figure 27	Réactivité vasculaire chez les rats normoxiques et injectés par les microparticules hypoxiques.....	94
Figure 28	Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale induite par les microparticules hypoxiques dans l'HTAP.....	101
Figure 29	Corrélation entre l'index d'apnées-hypopnées (IAH) et le nombre de microparticules issues des leucocytes activées (CD62L ⁺).....	110
Figure 30	Les microparticules SAOS augmentent la réponse contractile aux différents agents vasoconstricteurs.....	112
Figure 31	Implication de la voie du NO dans l'hyperréactivité induite par les microparticules SAOS.....	114
Figure 32	Dérégulation de l'eNOS dans l'hyperréactivité induite par les microparticules SAOS.....	115
Figure 33	Implication des métabolites des COX dans l'hyperréactivité induite par les microparticules SAOS.....	117
Figure 34	Microparticules SAOS et métabolites des COX.....	118
Figure 35	Effet de l'antagoniste du thromboxane A ₂ dans l'hyperréactivité induite par les microparticules SAOS.....	119
Figure 36	Interaction entre les voies du NO et des COX.....	121
Figure 37	Mécanismes impliqués dans la dysfonction vasculaire induite par les microparticules SAOS.....	126
Figure 38	Taux plasmatique de VEGF.....	132
Figure 39	Expression du VEGF dans les microparticules SAOS.....	134
Figure 40	L'augmentation de la formation des capillaires par les microparticules SAOS est prévenue par l'antagoniste du récepteur à l'endothéline-1.....	136
Figure 41	Implication des microparticules SAOS dans le processus angiogénique.....	138
Tableau 1	Classification clinique des hypertensions pulmonaires.....	60
Tableau 2	Caractéristiques cliniques des patients.....	109
Tableau 3	Taux de microparticules circulantes.....	110
Tableau 4	Caractéristiques cliniques des patients.....	133
Tableau 5	Anticorps utilisés en Western Blot.....	146
Tableau 6	Composition des solutions salines de Krebs et hyperpotassique.....	147

AVANT PROPOS

Les maladies cardio-vasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le système circulatoire. Ces maladies sont d'importance majeure en santé publique car elles constituent l'une des premières causes de mortalité dans les pays industrialisés. Cependant, la complexité de l'étiologie de ces pathologies et l'implication de nombreux facteurs rendent leur compréhension délicate.

Parmi ces facteurs, les microparticules (MPs) sont des microvésicules membranaires libérées par des cellules activées ou apoptotiques, détectables dans le sang en dehors de toutes situations pathologiques, mais dont l'altération du taux et du phénotype semble très souvent corrélé à la sévérité d'une pathologie. Longtemps considérées comme des débris cellulaires, il est reconnu maintenant que les MPs constituent des effecteurs cellulaires susceptibles de moduler de nombreuses fonctions biologiques. En effet, c'est dans le cadre de leurs diverses interactions que les MPs provoquent des modifications phénotypiques et fonctionnelles, physiologiques ou pathologiques, notamment au niveau de la paroi vasculaire et en particulier de l'endothélium pouvant ainsi participer à la dysfonction endothéliale. La dysfonction endothéliale, caractérisée par une altération de la production, de la biodisponibilité et de la signalisation de médiateurs sécrétés et/ou régulés par l'endothélium vasculaire, constitue un phénotype complexe observé très précocement, avant même l'apparition des manifestations cliniques des pathologies cardio-vasculaires. Les MPs pourraient alors être des marqueurs précoces de l'atteinte endothéliale dans de nombreuses pathologies.

Ces dernières années, notre laboratoire s'est ainsi intéressé de très près aux effets vasculaires des MPs. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet de nombreuses publications et ont permis de mettre en évidence la participation des MPs *in vitro* et *ex vivo* dans la régulation de la vasomotricité de différents territoires vasculaires par l'endothélium lors de pathologies cardio-vasculaires. Ce travail s'est inscrit dans la poursuite de cet axe de recherche, et cette thèse a consisté à étudier l'influence des MPs sur la dysfonction vasculaire observée dans deux pathologies, l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) et le syndrome d'apnées obstructive du sommeil (SAOS), présentant l'hypoxie et une dysfonction endothéliale comme caractéristiques communes.

Ce travail est subdivisé en trois grands chapitres. Dans le premier chapitre, nous présenterons une étude bibliographique détaillant le rôle complexe de l'endothélium sur la régulation de la

fonction vasculaire, les MPs en tant que vecteur biologique, et nous présenterons également les deux pathologies hypoxiques étudiées. Le deuxième chapitre de ce manuscrit sera consacré à l'exposition de la méthodologie suivie, aux résultats expérimentaux et aux commentaires apportés. Nous déterminerons si les MPs participent à la dysfonction endothéliale observée dans l'HTAP. Nous étudierons ensuite l'influence des MPs dans l'altération de la réactivité vasculaire présente dans le SAOS. Dans un troisième temps, nous évaluerons les mécanismes par lesquels les MPs pourraient agir lors de l'angiogenèse observée dans le SAOS. Enfin, le troisième chapitre sera consacré à une synthèse de nos résultats les plus significatifs et à la présentation des perspectives de notre travail.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Le système vasculaire et ses fonctions

1. La circulation sanguine

Décrit pour la première fois en 1628 par William Harvey dans son ouvrage *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in animalibus*, le système vasculaire comprend le cœur qui propulse le sang dans un réseau composé des artères, des artérioles, des capillaires, des veines et des veinules. Ce système constitue le premier organe qui se met en place durant l'embryogenèse et forme le plus grand réseau du corps humain [1]. Il est organisé en un réseau branché et hiérarchisé dont la fonction primaire est d'acheminer par le sang l'oxygène et les nutriments indispensables au fonctionnement des tissus, et d'éliminer les déchets en les transportant au niveau des reins ou des poumons. Ce système forme également un réseau de contrôle permettant le transport et la sécrétion d'hormones, participe à la défense de l'organisme par l'intermédiaire des cellules immunitaires et participe à la thermorégulation corporelle en transportant la chaleur produite par les organes jusqu'à la peau.

1.1. Organisation et rôles

Le cœur comporte deux pompes fonctionnant en parallèle ; le cœur gauche, assurant la circulation systémique vers les organes, et le cœur droit assurant la circulation pulmonaire (Figure 1).

1.1.1. La circulation systémique ou grande circulation

Dans la circulation systémique, le sang sort du ventricule gauche du cœur par l'aorte pour acheminer le sang vers les principales artères élastiques. Le sang progresse ensuite dans les artères musculaires qui irriguent tous les organes et tissus de l'organisme. À proximité des organes, les artères musculaires se ramifient en artérioles puis à l'intérieur même de l'organe, les artérioles se ramifient en capillaires. Le sang rejoint ensuite l'oreillette gauche par l'intermédiaire des capillaires, des veinules et des veines. Ce circuit parcourt l'organisme en entier; c'est pourquoi on parle de la grande circulation. Son rôle est essentiel étant donné qu'il permet aux cellules d'être en contact avec les capillaires au niveau desquels les échanges sont possibles.

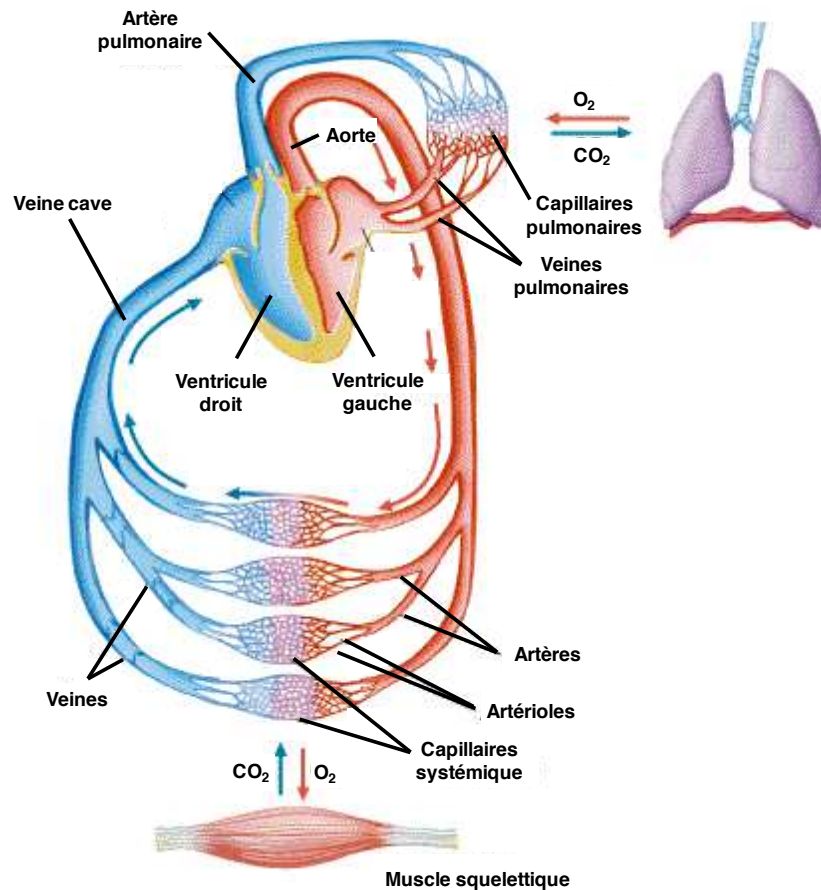


Figure 1 : Représentation schématique de la circulation systémique et pulmonaire.

1.1.2. La circulation pulmonaire ou petite circulation

La circulation pulmonaire amène le sang veineux, pauvre en oxygène au contact des alvéoles pulmonaires afin d'assurer une réoxygénation du sang. Ainsi, presque tout le sang emprunte l'artère pulmonaire, issue du ventricule droit, pour atteindre le lit capillaire pulmonaire où les échanges gazeux sont assurés avant d'être ramené à l'oreillette gauche *via* les veines pulmonaires (Figure 1). Les capillaires formés autour des alvéoles se raccordent aux veines bronchiques permettant l'irrigation nutritionnelle des bronches et du tissu bronchique.

La pression artérielle pulmonaire moyenne est d'environ 10 à 25 mmHg contre 80 à 120 mmHg dans la circulation systémique. C'est un système à haut débit, faible résistance, basse pression et qui est très sensible à l'oxygène. Le débit sanguin pulmonaire est influencé à la fois par des facteurs actifs (vasomotricité) et passifs (pression artérielle pulmonaire). Les

vaisseaux pulmonaires ont une abondante innervation autonome, et la stimulation des ganglions orthosympathiques peut diminuer de 30 % le débit sanguin pulmonaire. Ces vaisseaux répondent également aux divers agents humoraux [2].

Contrairement à la circulation systémique, la circulation pulmonaire répond à l'hypoxie par une vasoconstriction. L'ajustement de la perfusion à la ventilation est déterminé localement par la quantité de dioxygène (O₂) présente. Ce système permettant de détecter la diminution ou l'augmentation d'O₂ est constitué par les muscles lisses des petites artères pulmonaires qui contiennent des canaux calciques sensibles à l'O₂. Ces canaux sont responsables de la vasoconstriction déclenchée par l'hypoxie afin de détourner le sang des régions hypoxiques et d'augmenter la pression artérielle systémique. Il en va autrement pour les artères systémiques, qui contiennent des canaux potassiques activés par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP), en cas d'hypoxie ces canaux laissent sortir une plus grande quantité d'ions potassiques qui cause une vasodilatation.

1.1.3. Morphologie et histologie de la paroi artérielle

Le système vasculaire est complexe, non homogène et compartimenté en trois tuniques concentriques distinctes. Cependant, les parois vasculaires possèdent toutes un modèle d'organisation commun permettant de situer, de la lumière vers la périphérie, l'*intima*, la *media* et l'*adventice* qui présentent chacune des caractéristiques fonctionnelles et structurales spécifiques (Figure 2).

L'*intima* est la tunique la plus interne et la plus fine. Elle est en contact direct avec la circulation sanguine, assurant ainsi l'interface entre le sang circulant et le tissu artériel. Elle est constituée par une monocouche de cellules endothéliales. Cet endothélium représente ainsi la partie de la paroi vasculaire la plus exposée aux forces mécaniques mais également aux nombreux facteurs circulants. De part cette position stratégique, l'endothélium participe à de nombreuses fonctions physiologiques fondamentales telles que le contrôle du tonus vasomoteur, le trafic des cellules sanguines, la balance hémostatique, la perméabilité vasculaire, la prolifération, l'inflammation, l'angiogenèse ou encore la survie cellulaire. L'*intima* est séparée de la *media* par la limitante élastique interne.

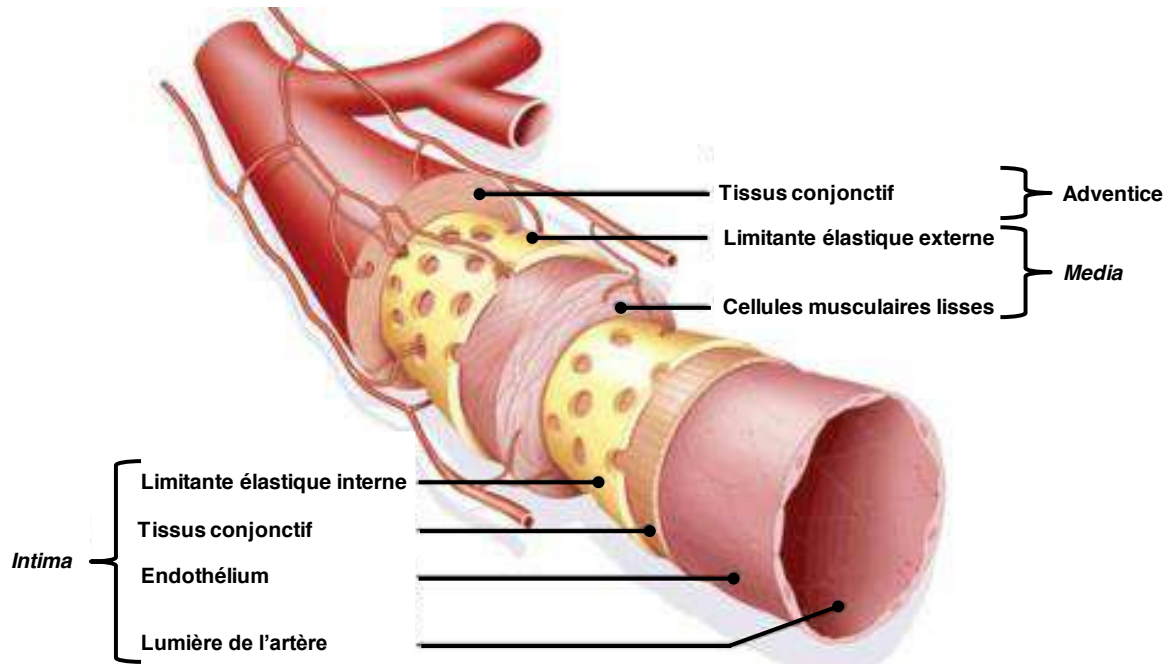


Figure 2 : Représentation schématique de la paroi vasculaire (d'après Sanofis-Aventis®)

La *media* est la couche la plus épaisse, constituant principal de l'artère et est composée de cellules musculaires lisses (CML) arrangées de manière circulaire en couche dans une matrice composée d'élastine et de fibres de collagènes. Le nombre de ces couches varie suivant le type d'artères, d'une couche pour les artérioles à plusieurs couches pour les artères élastiques. Les CML perçoivent différents signaux et leur état contractile définit le tonus vasomoteur contrôlant le diamètre, modifie la distribution du débit sanguin et permet la répartition du flux en fonction des différents besoins de l'organisme. La *media* est séparée de l'adventice par la limitante élastique externe. Cette limitante n'est présente que dans les vaisseaux de gros calibres.

L'adventice est la couche la plus externe de la paroi vasculaire, en contact avec le tissu environnant qui protège et ancre les artères aux structures avoisinantes. Son épaisseur varie selon le type vasculaire et la localisation. Elle est constituée d'un tissu conjonctif peu organisé, riche en collagène et en fibres élastiques, et contenant des fibroblastes et des adipocytes. Grâce aux fibroblastes et aux fibres nerveuses qui rejoignent les fibres musculaires lisses de la *media*, l'adventice a la propriété de synthétiser des facteurs vasoactifs qui participent au contrôle du calibre vasculaire et de la vasomotricité. Dans les vaisseaux de

diamètres important, l'adventice est parcouru par des vaisseaux nourriciers, les *vasa vasorum*, qui vont irriguer l'adventice elle-même et la partie externe de la *media*.

Le lit vasculaire pulmonaire ressemble au lit vasculaire systémique, excepté que l'épaisseur de la paroi de l'artère pulmonaire et de ses grosses branches est à peine équivalente à 30 % de celle de l'aorte, que la proportion de cellules musculaires est plus faible et que les vaisseaux pulmonaires présentent une structure plus élastique que celle des vaisseaux systémiques [2].

1.2. Mécanisme de régulation de la vasomotricité

L'état de contraction et de relaxation de la CML détermine le tonus vasomoteur et reflète l'équilibre entre les différents facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Cet état est contrôlé par des stimuli physiques ou chimiques.

1.2.1. Contraction des cellules musculaires lisses

Le taux de contraction des CML dépend de la concentration intracellulaire en calcium. La concentration en calcium cytoplasmique étant très faible à l'état basal, le calcium nécessaire provient soit des réserves du réticulum endoplasmique, soit du milieu extracellulaire. Deux voies conduisent ainsi à une augmentation rapide, importante et transitoire du calcium intracellulaire nécessaire à la contraction des CML : le couplage électromécanique et le couplage pharmacomécanique [3] (Figure 3).

Le couplage électromécanique consiste en une dépolarisation de la membrane cellulaire qui provoque l'ouverture de canaux très sélectifs du calcium, les « voltage-operated channel » (VOC) à travers lesquels le calcium entre dans la cellule pour initier la contraction.

Le couplage pharmacomécanique représente la liaison d'un agoniste à son récepteur membranaire conduisant à une augmentation du calcium intracellulaire, soit par activation de « receptor-operated channel » (ROC), soit par libération du calcium à partir des réserves intracellulaires.

Les récepteurs des agonistes vasoconstricteurs sont couplés à une protéine G couplée à une phospholipase C (PLC). La PLC hydrolyse le phosphatidyl-inositol biphosphate (PIP₂) de la bicouche phospholipidique en inositol triphosphate (IP₃) et en diacylglycérol (DAG). L'IP₃ se fixe sur le récepteur canal à l'IP₃ (RIP₃) et permet la libération des réserves calciques du

réticulum endoplasmique vers le cytoplasme [4]. Parallèlement, cette hausse en calcium intracellulaire va activer le deuxième récepteur canal présent à la surface du réticulum endoplasmique, le récepteur canal sensible à la ryanodine (RyR) qui participe à l'augmentation générale de calcium intracellulaire. Enfin un mécanisme de libération de calcium induit par le calcium lui-même (« calcium-induced calcium release ») participe à l'amplification de ce phénomène.

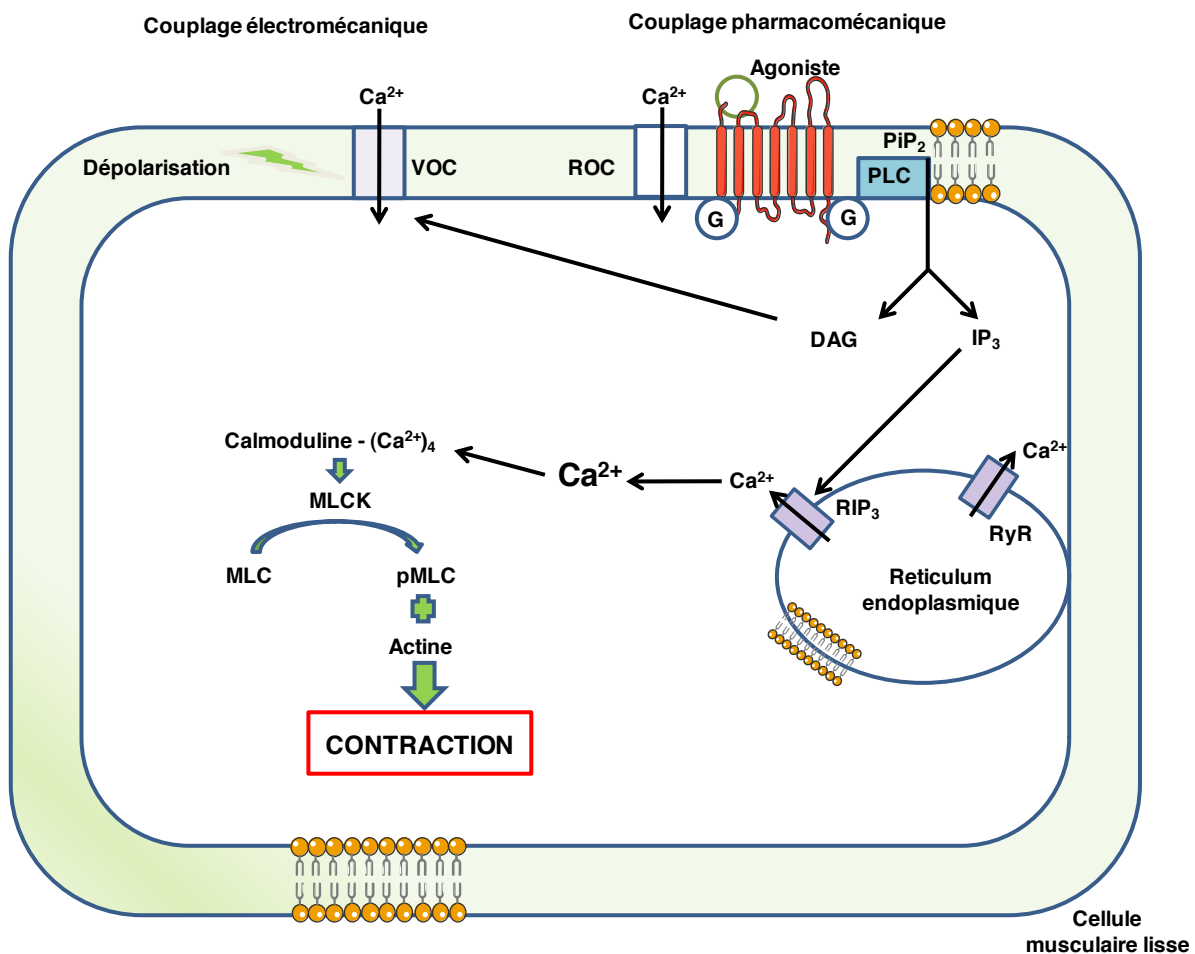


Figure 3 : Voies de signalisations intracellulaires de la contraction des cellules musculaires lisses.

VOC : voltage-operated channel; ROC : receptor-operated channel; PLC : phospholipase C; PIP₂ : phosphatidylinositol biphosphate; DAG : diacylglycérol; IP₃ : inositol triphosphate; RIP₃ : récepteur canal à l'IP₃; RyR : récepteur canal sensible à la ryanodine; MLCK : kinase des chaînes légères de la myosine; MLC : chaîne légère de la myosine.

La formation d'un complexe calcium/calmoduline suite à l'élévation de la concentration en calcium libre cytosolique permet l'activation de la kinase des chaînes légères de la myosine (MLCK). Cette enzyme va phosphoryler la chaîne légère de la myosine (MLC), stimuler l'activité ATPasique de la myosine permettant l'interaction avec l'actine et donc la contraction de la CML.

Cependant, des études ont montré qu'il n'y avait pas toujours de relation entre le taux de calcium intracellulaire et la contraction, suggérant l'existence d'un mécanisme alternatif permettant d'augmenter la phosphorylation de la MLC. Ce mécanisme est dû à une augmentation de la sensibilité des protéines contractiles au calcium et implique l'inhibition de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine (MLCP) [5].

1.2.2. Relaxation des cellules musculaire lisses

Les mécanismes conduisant à une diminution de la sensibilité au calcium et à une diminution de sa concentration intracellulaire aboutissent à une inhibition de l'activité de MLCK et/ou à une stimulation de la MLCP. La MLCP est très active dans les CML. Dès que la phosphorylation par la MLCK diminue, la MLCP déphosphoryle la myosine et ainsi inhibe les interactions myosine-actine. Si la baisse de l'activation de la MLCK est consécutive à la diminution de calcium, le fonctionnement de la MLCP est indépendant du calcium. La baisse de la concentration en calcium se produit soit par expulsion du calcium intracellulaire vers l'extérieur de la cellule, soit par recaptage du calcium par les ATPases du reticulum sarcoplasmique, les « sarco endoplasmic reticulum ATPases » (SERCA). Trois voies interviennent dans la relaxation des CML : deux voies impliquant des nucléotides cycliques, la voie de la guanylate cyclase et la voie de l'adénylate cyclase et une voie impliquant une hyperpolarisation des CML (Figure 4).

La voie de la guanylate cyclase soluble (GCs)-guanosine-3'5'-monophosphate cyclique (GMPc) est une des voies majeures impliquée dans la relaxation du tonus vasculaire. Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule gazeuse, générée par la NO synthase (NOS), qui diffuse dans les CML pour stimuler la GCs, enzyme clef de la régulation cardio-vasculaire. La fixation du NO sur le fer du noyau hémérique active l'enzyme et permet la conversion du guanosine-5'-triphosphate (GTP) en GMPc [6]. Une seconde voie de synthèse du GMPc consiste en la fixation des peptides natriurétiques sur le récepteur membranaire de la GCs. L'action du GMPc étant limitée spatialement et temporellement par l'action de

phosphodiésterases le dégradant, il va donc agir rapidement comme second messenger. Le GMPc interagit avec trois différents types de récepteurs intracellulaires : les protéines kinases GMPc-dépendantes (PKGs), les canaux ioniques régulés par le GMPc et les phosphodiésterases régulées par le GMPc, même si la plupart des effets du GMPc semblent médiés par les PKGs [7]. Les PKGs vont pouvoir réduire la teneur en calcium intracellulaire par différents mécanismes [8]. Ces mécanismes incluent la phosphorylation d'une protéine du reticulum endoplasmique, le phospholambane qui désinhibe la SERCA [9], la stimulation de la pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ [10] et l'inhibition des canaux calciques de type L [11]. De plus, il a été démontré que l'entrée de calcium était plus fortement activée lorsque le taux de GMPc était bas, et inversement [12]. Le GMPc inhibe également la libération des stocks intracellulaires de calcium [13] et la formation d' IP_3 [14]. Par ailleurs, la GMPc peut directement activer les canaux potassiques, et inhiber certaines phosphodiésterases, augmentant ainsi sa clairance.

La seconde voie est celle de l'adénosine-3'5'-monophosphate cyclique (AMPc). Des récepteurs couplés aux protéines G présents à la surface des cellules activés par leurs ligands vont permettre la dissociation de ces protéines G. Cette dissociation active l'adénylate cyclase localisée au niveau de la membrane, ce qui en résulte une augmentation de la formation d'AMPc à partir de l'ATP. L'AMPc produit active la protéine kinase dépendante de l'AMPc, la PKA, capable d'induire la relaxation des CML par une diminution de la concentration intracellulaire en calcium et/ou de la sensibilité au calcium par des mécanismes semblables à ceux de la PKGs [15].

La troisième voie est une voie dépendante de l'endothélium associée à une hyperpolarisation des CML [16]. Cette hyperpolarisation a pour principal effet d'empêcher l'activation des canaux calciques dépendant des CML entraînant une diminution de la concentration cytosolique en calcium libre [17]. L'hyperpolarisation est résistante aux inhibiteurs des NOS ou des COX et non associés à une augmentation des nucléotides cycliques précédemment cités. Cette voie implique donc l'existence de facteurs hyperpolarisants dépendants de l'endothélium (EDHF).

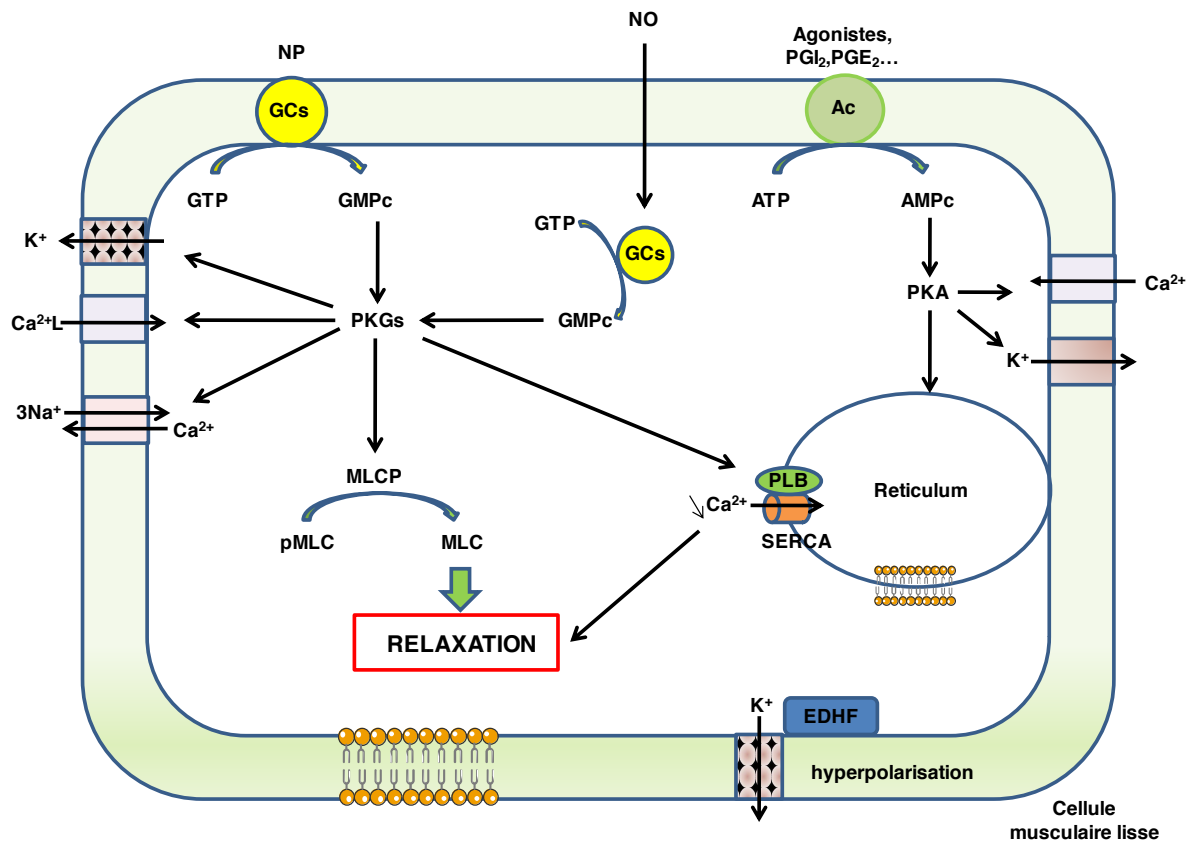


Figure 4 : Voies de signalisations intracellulaires de la relaxation des cellules musculaires lisses.

NP : peptide natriurétique; NO : monoxyde d'azote; PGI₂ : prostacycline; PGE₂ : prostaglandine; GCs : guanylate cyclase soluble; GTP : guanosine-5'-triphosphate; GMPc : guanosine-3'5'-monophosphate cyclique; PKGs : protéines kinases GMPc-dépendantes; AC : adénylate cyclase; ATP : adénosine-5'-triphosphate; AMPc : adénosine-3'5'-monophosphate cyclique; PKA : protéine kinase A; PLB : phospholambane; SERCA : sarco endoplasmic reticulum ATPases; EDHF : facteurs hyperpolarisants dépendants de l'endothélium; MLCK : kinase des chaînes légères de la myosine; MLC : chaîne légère de la myosine.

2. Physiologie de l'endothélium

L'endothélium vasculaire est considéré comme un organe à part entière et forme la barrière cellulaire intérieure qui limite les vaisseaux sanguins [18]. Dans des conditions pathologiques, l'homéostasie régulée par l'endothélium est perturbée, on parle alors de dysfonction endothéliale.

2.1. Hétérogénéité structurelle et fonctionnelle de l'endothélium

Les cellules endothéliales (CEs) qui composent cette barrière varient selon leur localisation dans le système vasculaire impliquant une hétérogénéité structurelle et fonctionnelle de l'endothélium. Bien que possédant des caractéristiques communes, les CEs de chaque type de vaisseaux acquièrent des propriétés spécifiques selon le territoire anatomique. Ainsi, l'étude des vaisseaux sanguins de rats a montré que les CEs aortiques sont plutôt longues et étroites (55 x 10 μm) alors que les CEs d'artères pulmonaires sont plus larges et plus courtes (30 x 14 μm) permettant une adaptation fonctionnelle de l'endothélium selon la fonction demandée [19]. L'endothélium exerce ainsi ses différents rôles en sécrétant différentes substances suivant les stimuli reçus par les CEs.

2.2. Facteurs vasoactifs produits par l'endothélium

Le tonus vasculaire est régulé par de nombreux facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs endothéliaux. L'endothélium joue ainsi un rôle crucial en maintenant un équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation [20].

2.2.1. Facteurs relaxants dérivés de l'endothélium

Les trois principaux facteurs vasorelaxants libérés par l'endothélium sont le NO, la prostacycline (PGI_2) et l'EDHF (Figure 5).

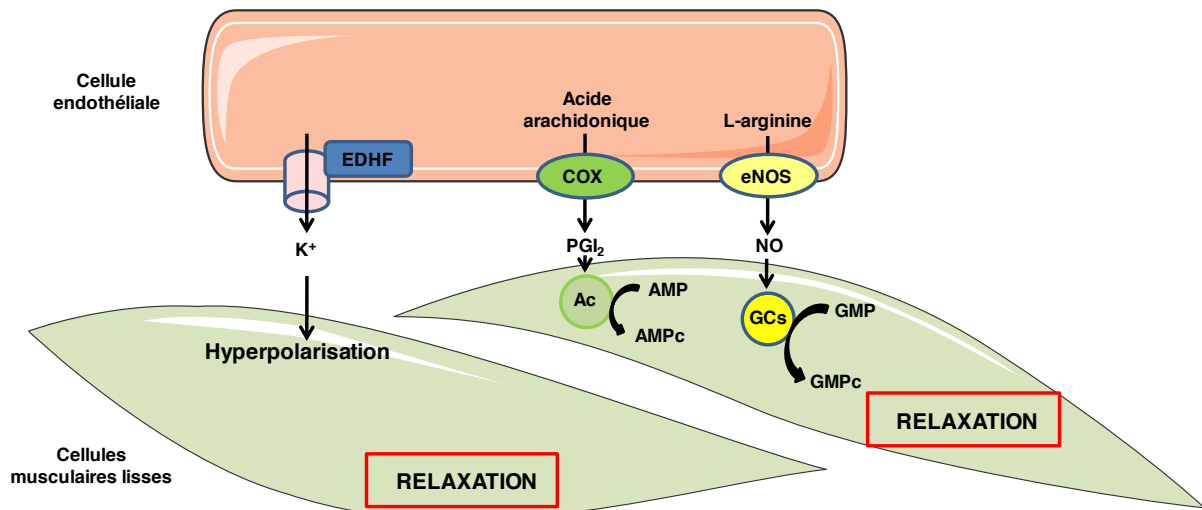


Figure 5 : Facteurs vasorelaxants synthétisés par l'endothélium.

EDHF : facteurs hyperpolarisants dépendants de l'endothélium; COX : cyclooxygénase; PGI₂ : prostacycline; AC : adénylate cyclase; ATP : adénosine-5'- triphosphate; AMPc : adénosine-3'5'-monophosphate cyclique; eNOS : monoxyde d'azote synthase endothéliale; NO : monoxyde d'azote; GCs : guanylate cyclase soluble; GTP : guanosine-5'-triphosphate; GMPc : guanosine-3'5'-monophosphate cyclique.

Le monoxyde d'azote

En 1980, Furchgott et Zawadzki ont réussi à démontrer que la relaxation des CML en réponse à l'acétylcholine était dépendante de l'intégrité anatomique de l'endothélium [21]. Ce facteur appelé facteur relaxant dérivé de l'endothélium a été identifié par la suite comme étant le monoxyde d'azote (NO) par trois différents groupes Furchgott [22], Ignarro [23] et Palmer [24]. Cette découverte fondamentale dans la compréhension de la physiologie de l'endothélium sera couronnée par le prix Nobel de médecine en 1998.

Le NO est une molécule gazeuse capable de diffuser rapidement à travers les membranes cellulaires et d'agir au niveau des CEs, des CML, des plaquettes, des érythrocytes ou des cellules de l'inflammation. Il est ainsi reconnu comme un messenger intercellulaire jouant un rôle fondamental dans l'homéostasie vasculaire. Malgré sa courte demi-vie, le NO est un puissant vasodilatateur synthétisé par les CEs en réponse à divers stimuli. Même si c'est en très faible quantité, le NO est libéré de façon continue par les CEs car les forces de cisaillement du flux sanguin laminaire constituent un puissant activateur de la transcription du gène de la eNOS.

La synthèse du NO s'effectue à partir de la transformation de la L-arginine en L-citrulline par la NO synthase (NOS) [25] (Figure 6). Les NOS sont des métalloenzymes dont trois isoformes ont été décrites dans la littérature. Deux isoformes sont constitutivement actives, les NOS endothéliale (eNOS) et neuronale (nNOS) et la troisième est une NOS inducible (iNOS). Généralement, les NOS constitutives possèdent une activation dépendante du calcium et ont donc une activité rapide, de courte durée avec une faible quantité de NO produite, alors que la iNOS voit son expression augmenter en réponse à divers stimuli afin de produire de forte quantité de NO sur une longue durée [27].

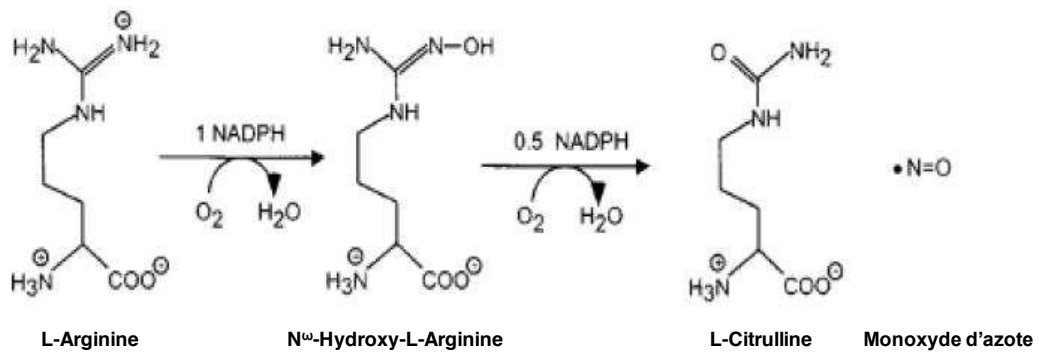


Figure 6 : Réaction catalysée par les NOS (d'après Alderton *et al.* [26]).

La eNOS est une protéine exprimée de manière importante dans les CE de vaisseaux sanguins. L'activité enzymatique de la eNOS peut être régulée au niveau de son expression mais également au niveau de son activité. Il existe deux modes d'activation de la eNOS, l'un dépendant du calcium et l'autre indépendant (Figure 7). Dans les CE, la eNOS interagit avec la cavéoline-1, une protéine présente dans les cavéoles qui joue un rôle dynamique dans le trafic des protéines membranaires avec les compartiments intracellulaires. Cette protéine séquestre à la membrane la eNOS et la maintient dans un état de faible activité. Lorsque la CE est activée, l'augmentation de la concentration cytosolique en calcium va permettre la liaison du calcium à la calmoduline et la formation d'un complexe qui va dissocier l'interaction eNOS-cavéoline-1. La eNOS libérée est alors accessible à différentes kinases qui vont pouvoir faire varier son état d'activation et permettre la production de NO. En effet, l'état de phosphorylation de la eNOS joue un rôle important dans la régulation de son activité : la phosphorylation du résidu sérine 1177 conduit à son activation alors que celle sur le résidu thréonine 495 est inhibitrice. Un second mécanisme d'activation est liée à la phosphorylation de résidus sérine par la voie phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K)/Akt [29].

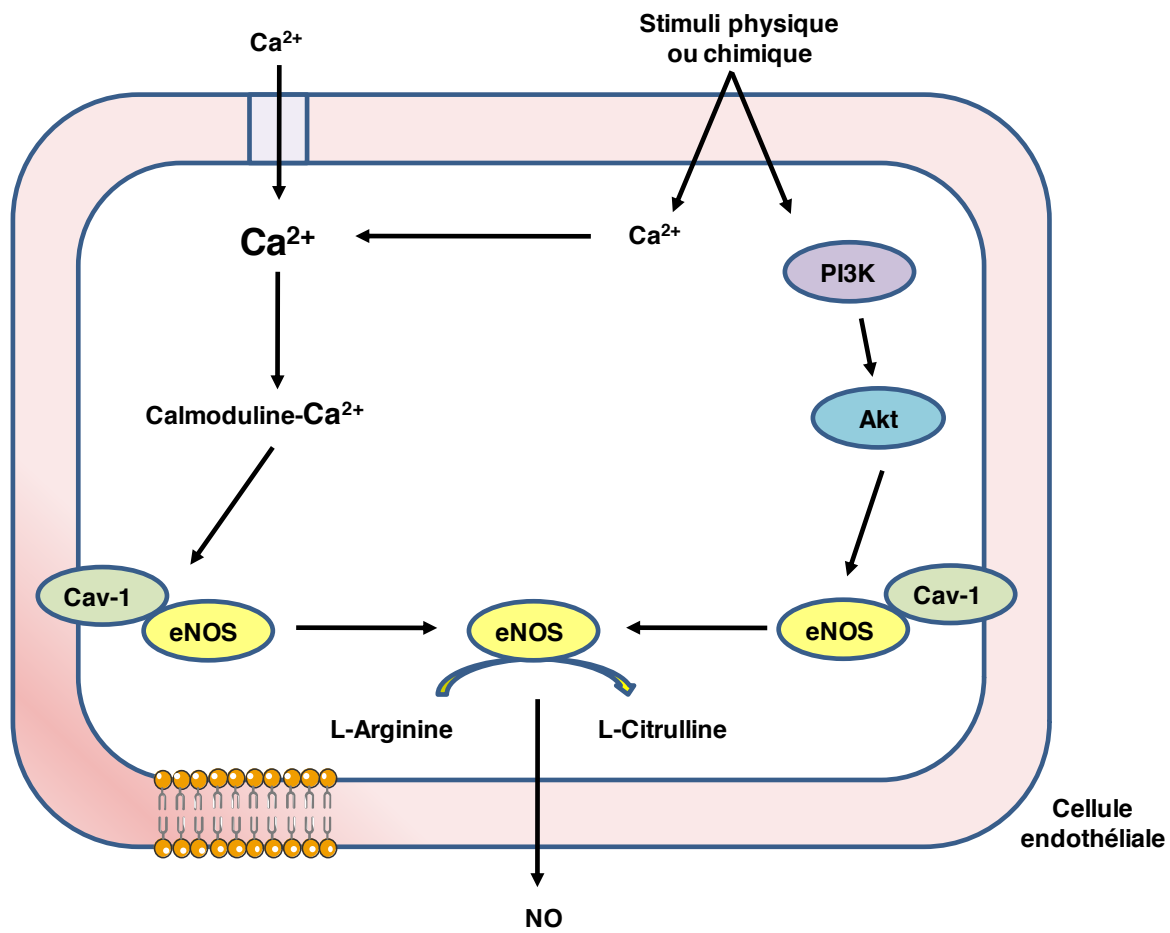


Figure 7: Mécanisme de production de NO par l'eNOS (d'après Toda *et al.* [28]).

PI3K : phosphatidyl-inositol 3 kinase; Cav-1 : cavéoline-1; eNOS : monoxyde d'azote synthase endothéliale; NO : monoxyde d'azote.

Dans le système cardio-vasculaire, les effets biologiques locaux du NO endothélial sont multiples et lui confère un rôle vasculo-protecteur majeur (Figure 8). Une fois produit, il diffuse très rapidement à la rencontre des CML, des macromolécules et des cellules circulantes sanguines. Il participe ainsi à la relaxation dépendante de l'endothélium des vaisseaux sanguins, en diffusant librement jusqu'aux CML où, par activation de la voie du GMPc, il inhibe la contraction. Le NO peut également inhiber la migration, la prolifération et la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire, limitant ainsi l'épaississement de l'*intima*. Le NO exerce également des effets sur la CE où il est capable de moduler le processus angiogénique, en agissant sur la prolifération, la migration et l'apoptose de ces cellules.

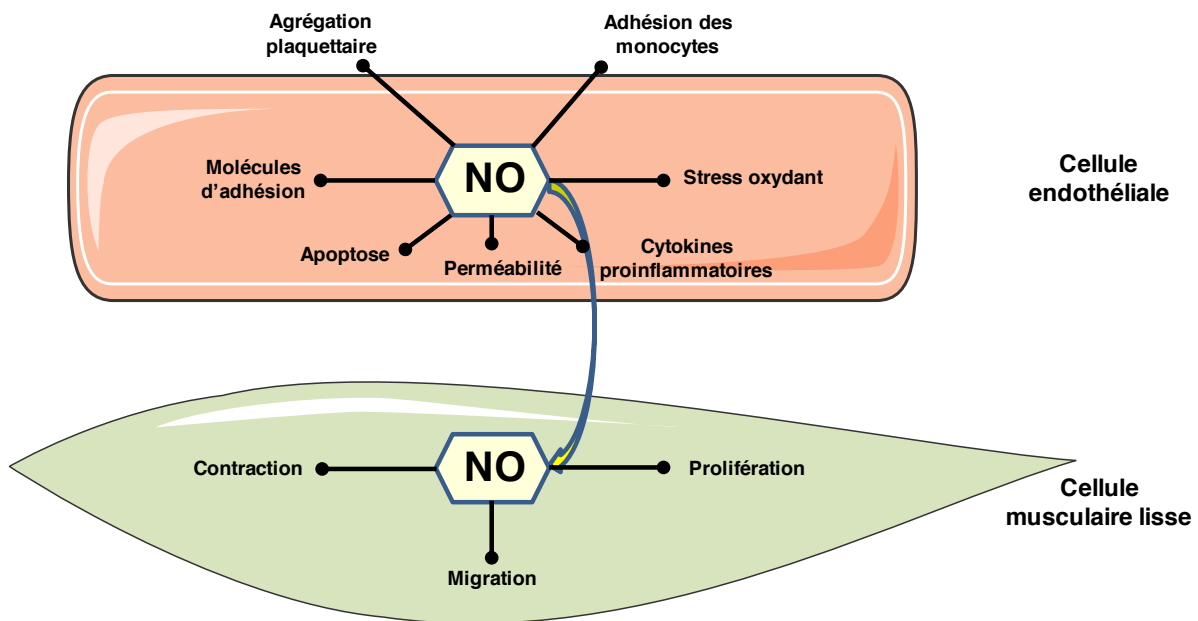


Figure 8 : Effets multiples du NO endothélial (d'après Schini-Kerth [30]).

Les prostacyclines

Sous l'action de la phospholipase A₂, l'acide arachidonique (AA) est libéré des phospholipides membranaires. L'AA est ensuite métabolisé sous l'action de différentes enzymes, telles que les cyclooxygénase (COX) dont il existe deux isoformes: la COX-1 constitutive et la COX-2 inducible, les lipooxygénases et des enzymes dépendantes du cytochrome P450. L'AA est ainsi le précurseur des eicosanoïdes, molécules lipidiques qui regroupent les leucotriènes et les prostanoides (Figure 9). Les prostanoides sont des médiateurs importants dans la modulation du tonus vasculaire dans les conditions physiologiques. Ces prostanoides regroupent la PGI₂, les prostaglandines, telle la prostaglandine E₂ (PGE₂), la prostaglandine D₂ (PGD₂), la prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}) et le thromboxane A₂ (TXA₂).

La PGI₂ a été découverte en 1976 par Bunting *et al.* [31] et est un puissant agent vasodilatateur, ainsi qu'un inhibiteur de l'agrégation et de l'adhésion plaquettaire. La PGI₂ inhibe également l'adhésion leucocytaire et la prolifération des CML [32-34]. La production de PGI₂ est stimulée par divers stimuli tels que l'hypoxie, les forces de cisaillement, ou divers agonistes, et sa synthèse est dépendante de la concentration en calcium cytosolique [35]. Il est important de remarquer que la PGI₂ est synthétisée par l'endothélium en réponse aux mêmes

stimuli impliqués dans la libération du NO suggérant une action synergique sur les différentes cellules cibles [36,37]. La PGI₂ va diffuser librement et se fixer sur le récepteur à la PGI₂ présent sur les cellules cibles [38]. Ces récepteurs vont ensuite activer *via* la protéine G α la voie de l'adénylate cyclase-AMPC décrite précédemment. D'autre part, la PGI₂ participe également à l'ouverture de différents canaux potassiques renforçant la relaxation des CML [39].

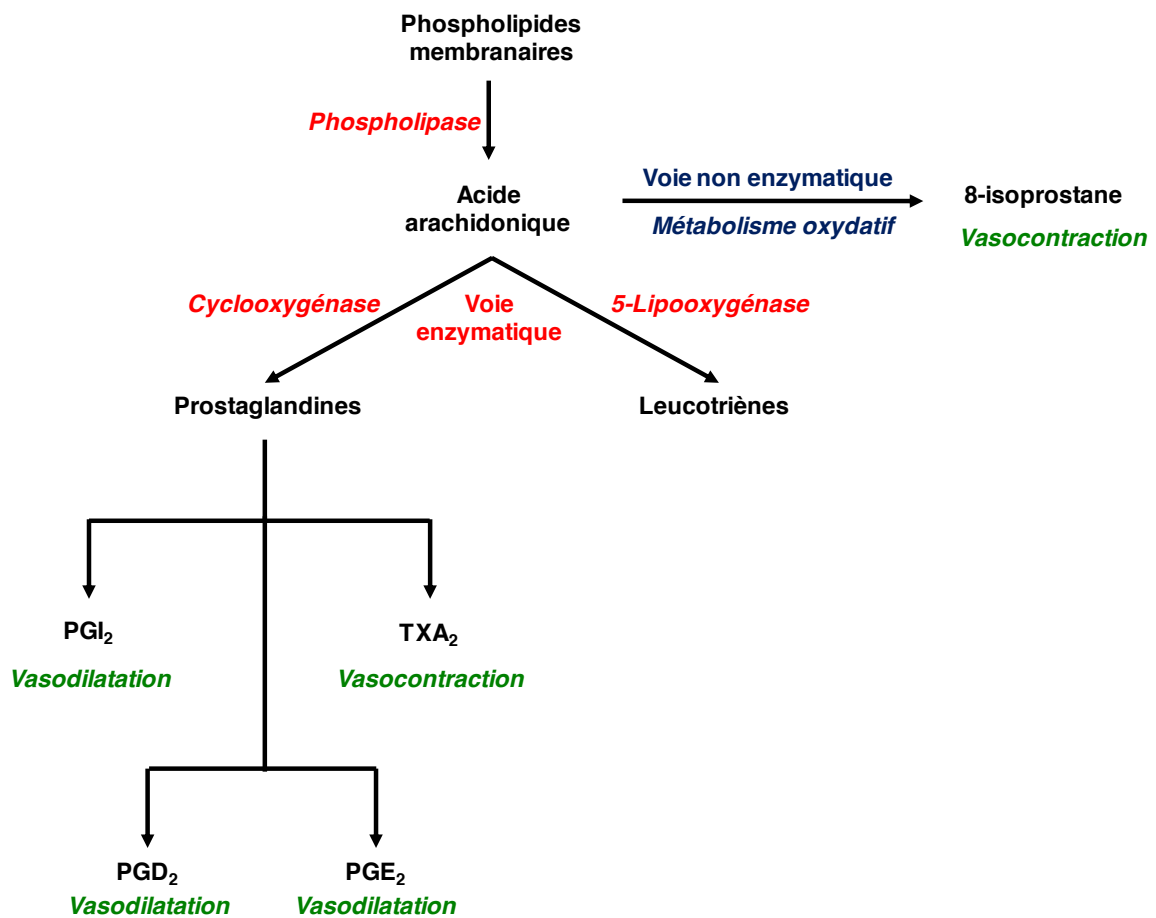


Figure 9 : Métabolisme de l'acide arachidonique.

PGI₂ : prostacycline; TXA₂ : thromboxane A₂; PGD₂ : prostaglandine D₂; PGE₂ : prostaglandine E₂.

Les facteurs hyperpolarisants

L'endothélium libère également plusieurs autres facteurs paracrines vasodilatateurs responsables d'une hyperpolarisation des CML par activation des canaux potassiques. Les structures chimiques de ces EDHF ne sont pas encore connues et semblent être variables selon les lits vasculaires. En effet, bien qu'une relaxation dépendante de l'endothélium due aux EDHF ait été reportée à la fois dans les vaisseaux de conductances (tel que l'aorte) et dans les vaisseaux de résistances (comme les artères mésentériques), il apparaît que la contribution des EDHF est plus importante dans les petites artères, et semble inversement proportionnelle à la taille du vaisseau [40]. Plusieurs candidats ont ainsi démontré leurs effets tels que le peroxyde d'hydrogène [41] ou encore les ions potassiques [42].

L'importance relative du NO, des prostacyclines et de l'EDHF varie suivant les espèces, le lit vasculaire et les stimuli physiologiques ou pharmacologiques utilisés [43], mais il existe des interactions entre les différents facteurs vasorelaxants libérés par l'endothélium. Ainsi le NO exerce une modulation constante de l'EDHF en inhibant sa synthèse et sa libération [44]. Une augmentation de l'EDHF se produit alors dans des situations pathologiques lorsque la biodisponibilité du NO est réduite, ce qui permet de maintenir partiellement les capacités vasorelaxantes de l'endothélium.

2.2.2. Facteurs contractants dérivés de l'endothélium

L'endothélium peut également générer des facteurs vasoconstricteurs qui permettent le maintien du tonus vasculaire, mais qui sont particulièrement exprimés dans les conditions pathologiques. Très souvent, une augmentation de production d'agents vasoconstricteurs s'accompagne d'une diminution de libération d'agents vasorelaxants, ce qui potentialise l'effet de la contraction. Par ailleurs, des interactions entre les voies intracellulaires des agents vasoactifs ont été décrites, indiquant que chacun des facteurs libérés par l'endothélium peut libérer la production des autres. Il existe de nombreux facteurs contracturants produits par la CE, mais parmi ces facteurs, nous nous intéresserons particulièrement à l'endothéline (ET) et au TXA₂.

L'endothéline

L'ET est un puissant vasoconstricteur qui permet le maintien du tonus vasculaire basal, et dont la structure a été décrite en 1988 par Yanagisawa [45]. Il s'agit d'un peptide de 21 acides aminés qui possèdent au moins trois isoformes, respectivement nommés ET-1, ET-2 et ET-3. Les isoformes agissent en se liant à des récepteurs membranaires dont il existe au moins deux types distincts ET_A et ET_B présents sur les CML. La liaison de l'ET à son récepteur active alors une protéine G couplée à la PLC permettant l'augmentation de la sensibilité des CML au calcium. Cependant, l'ET n'a pas que des effets vasoconstricteurs. Une fois libérée l'ET-1 peut également agir sur des récepteurs endothéliaux ET_B et induire une vasorelaxation en activant la libération de NO et/ou d'EDHF aussi bien au niveau de la circulation systémique [46] que de la circulation pulmonaire [47].

Le Thromboxane A₂

Le TXA_2 est un prostanoïde vasoconstricteur produit en faible quantité par les plaquettes et les vaisseaux systémiques. Le TXA_2 libéré va alors se fixer aux récepteurs thromboxane (TP) des CML qui vont permettre une augmentation de la quantité et de la sensibilisation au calcium intracellulaire. Dans les conditions physiologiques, l'influence des petites quantités de TXA_2 est masquée par la production de facteurs vasorelaxants [48]. Dans les conditions pathologiques, le TXA_2 peut cependant contribuer à l'accroissement du tonus vasculaire. Cependant, l'existence de récepteurs TP sur l'endothélium suggère que les effets du TXA_2 sont plus complexes. En effet, le TXA_2 est capable d'induire la libération de facteurs vasorelaxants dérivés de l'endothélium, suggérant qu'en conditions physiologiques, ses effets sont la résultante de son action à la fois sur le muscle lisse et sur l'endothélium.

2.2.3. Les autres médiateurs

Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ont de nombreux rôles physiologiques et sont impliqués dans la transmission de nombreuses informations biologiques. Ainsi, les ERO produites d'une manière contrôlée à de faibles concentrations, contribuent à la régulation de l'homéostasie vasculaire. De plus, les systèmes de défenses antioxydants, qui permettent la détoxification et la défense des cellules face aux effets potentiellement délétères des ERO, régulent également l'état redox des CEs. Les ERO sont donc impliquées dans de nombreuses régulations physiologiques, mais peuvent être également responsables du stress oxydant, qui correspond à un état cellulaire exposé à des niveaux exagérés d'ERO soit par augmentation de leur synthèse ou par diminution de l'efficacité des systèmes de défenses antioxydants.

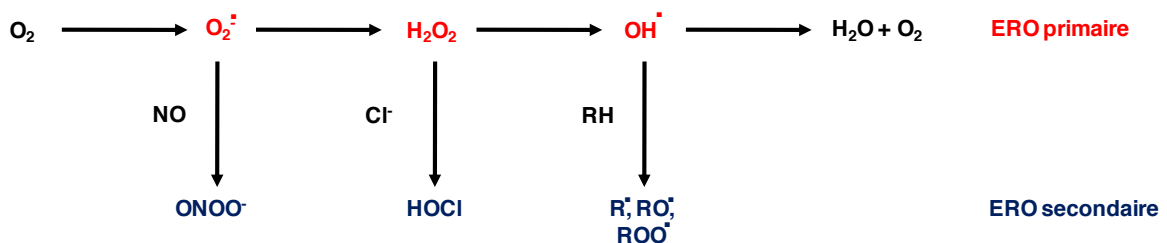


Figure 10 : Représentation schématique des diverses espèces réactives de l'oxygène et des réactions chimiques impliquées.

O_2 : molécule d'oxygène, $O_2^{\cdot-}$: anion superoxyde, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, OH^{\cdot} : radical hydroxyl, H_2O : molécule d'eau, NO : monoxyde d'azote, $ONNO^{\cdot-}$: peroxydinitrite, Cl^- : ion chlore, $HOCl$: acide hypochloreux, RH : chaînes carbonées, R^{\cdot} : radical alkyl, RO^{\cdot} : radical alkoxyde, ROO^{\cdot} : radical alkoperoxyde.

Les anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$) sont l'un des ERO majeurs au niveau vasculaire. En effet l' $O_2^{\cdot-}$ est le premier intermédiaire et le précurseur des autres ERO (Figure 10). L' $O_2^{\cdot-}$ peut être produit par différentes enzymes endothéliales comme la xanthine oxydase, la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, la eNOS ou encore les COX mais également par la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Figure 11). L'interaction de l' $O_2^{\cdot-}$ avec le NO conduit à la formation de peroxydinitrites ($ONNO^{\cdot-}$) entraînant une diminution de la biodisponibilité du NO et une perte de ses effets vasodilatateurs. L'augmentation du stress oxydant est ainsi associée à une diminution des relaxations dépendantes de l'endothélium. Les ERO pourraient donc être en partie responsable de la dysfonction endothéliale observée dans certaines pathologies [50].

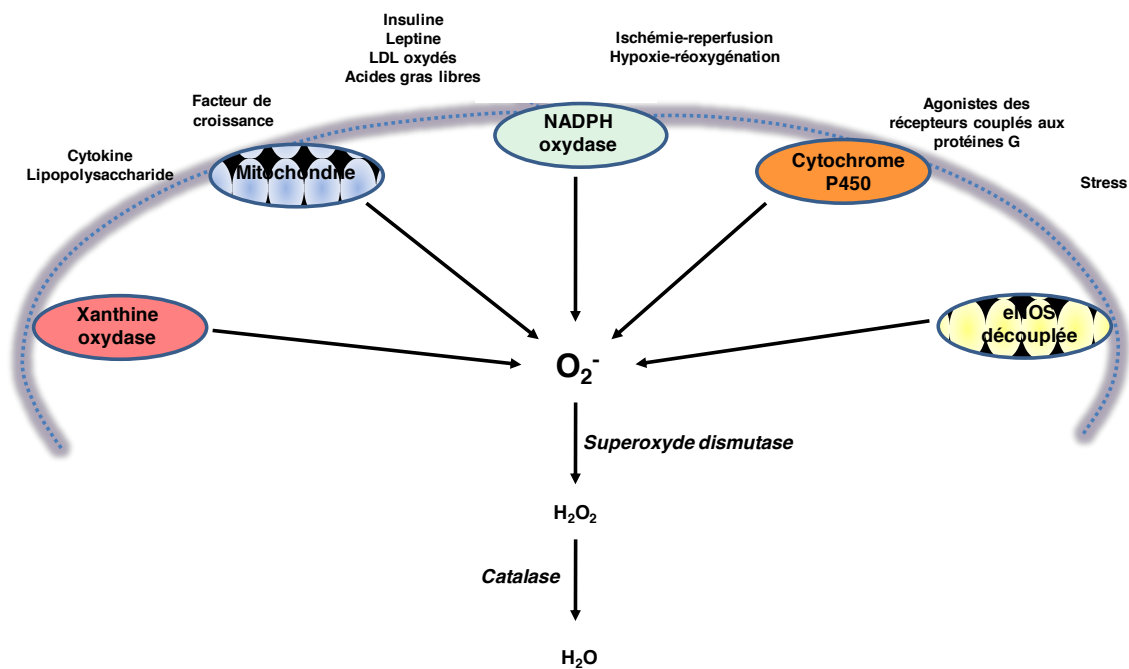


Figure 11 : Source d'anions superoxydes dans les cellules endothéliales (d'après [49]).

O_2^- : anion superoxyde, H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène, H_2O : molécule d'eau.

Les microparticules

Les MPs, de petites vésicules membranaires libérées théoriquement par tous les types cellulaires, sont présentes dans le sang de sujets sains, et des taux élevés de MPs de différentes origines ont été retrouvés dans de nombreuses pathologies cardio-vasculaires. Les MPs sont maintenant considérées comme de véritables effecteurs biologiques entraînant de nombreux effets sur l'endothélium, et seront présentées plus en détail dans la seconde partie de ces données bibliographiques.

2.3. La dysfonction endothéliale

L'endothélium joue un rôle primordial dans le maintien du tonus et de l'intégrité vasculaire. Dans la plupart des pathologies vasculaires, l'équilibre entre les différents facteurs vasoactifs est rompu et l'endothélium perd ses fonctions vasodilatatrices : on peut parler de dysfonction endothéliale. Cette dysfonction est caractérisée par une diminution de facteurs vasorelaxants et/ou une augmentation des facteurs vasocontracturants au sein de l'endothélium. Elle peut également être due à une perte de sensibilité des CML aux facteurs vasorelaxants ou encore à la participation du stress oxydant (Figure 12).

Différentes méthodes existent à l'heure actuelle pour évaluer la fonction endothéliale, et la position de l'« European Society of Cardiology » indique clairement que parmi les biomarqueurs biologiques, les MPs sont un des nouveaux moyens disponibles pour détecter la dysfonction endothéliale [51].

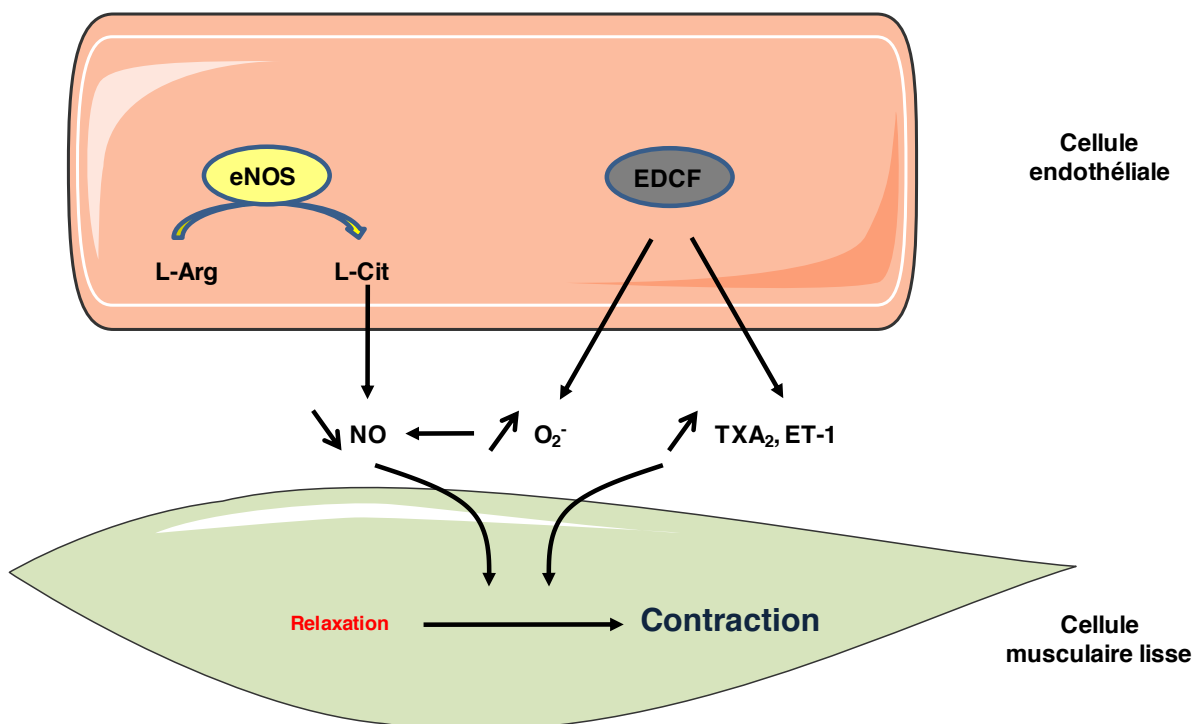


Figure 12 : Mécanismes impliqués dans l'apparition de la dysfonction endothéliale.

L-Arg : L-arginine; L-Cit : L-citrulline; eNOS : monoxyde d'azote synthase endothéliale; NO : monoxyde d'azote; O₂⁻ : anion superoxyde; EDCF : facteur contracturant dérivé de l'endothélium; TXA₂ : thromboxane A₂; PGH₂ : prostaglandine H₂; ET-1 : endothéline-1.

II. Les microparticules circulantes

1. Découverte et définition

Le concept des MPs a vu le jour dans les années 1970 et décrivait les MPs comme des débris inertes (“débris plaquettaires” par Wolf [52] qui avait noté la présence de petits fragments dérivés des plaquettes dans le plasma humain). L’évolution des techniques et des connaissances a ensuite mené la communauté scientifique à étudier leur signification et un possible rôle joué par les MPs a été proposé par Batisda *et al.* [53].

Actuellement, les MPs sont définies comme de petites vésicules hétérogènes en taille, en composition, et possédant des propriétés pro-inflammatoires et pro-coagulantes. La taille des MPs, comprise entre 0.05 nm et 1 μm , est une caractéristique souvent utilisée pour les distinguer des exosomes (<0.1 μm) et des plaquettes (> 1 μm).

Bien qu’en théorie, tous les types cellulaires sont susceptibles de libérer des MPs, la détermination de leur origine a établi que les MPs étaient principalement libérées à partir de la membrane des cellules circulantes du plasma (plaquettes, érythrocytes, cellules B et T et monocytes), des cellules de la paroi vasculaire (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses) et des cellules tumorales [54-56]. Cette position centrale des MPs suggère un rôle général des MPs dans les régulations cellulaires.

2. Formation des microparticules

A l’heure actuelle, même si les mécanismes concernant la formation des MPs sont complexes et pas encore complètement éludés, il est reconnu que l’activation cellulaire et l’apoptose sont les deux principaux processus aboutissant à la formation des MPs. Il a été élégamment reporté par le groupe de Jimenez que le phénotype et la quantité des MPs libérées varient suivant la voie utilisée pour les produire, soit l’activation ou l’apoptose dans les cellules endothéliales [57]. La figure 13 schématise ces deux voies décrites par la suite.

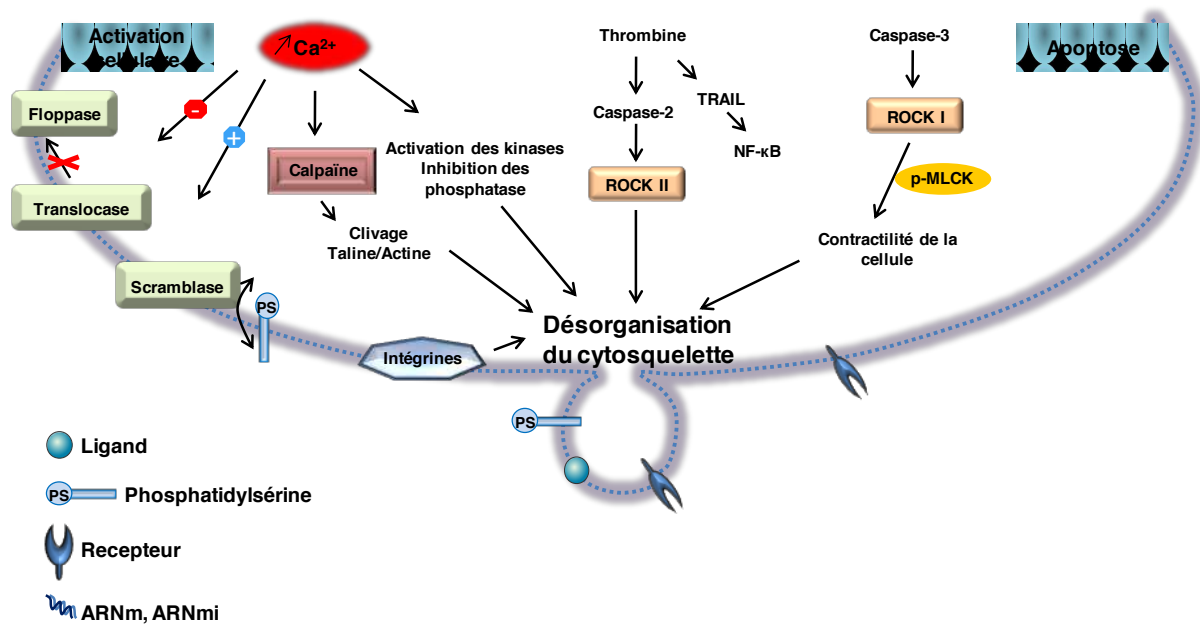


Figure 13 : Voies de signalisations connues pour être impliquées dans la formation des microparticules.

TRAIL : tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand; NF-κB : nuclear factor-kappa B; ROCK : Rho-associated protein kinase; MLCK : kinase de la chaîne légère de la myosine.

2.1. L'activation cellulaire

Durant l'activation cellulaire par différents agonistes ou stress, la formation des MPs est dépendante de l'augmentation de calcium intracellulaire, de sa cinétique et/ou de l'amplitude du signal. L'influx de calcium extracellulaire est également nécessaire pour induire la formation de MPs par activation d'agonistes et est associé à l'activation de la calpaïne, enzyme requise pour la désorganisation du cytosquelette [58]. Bien que la relation entre l'activation de la calpaïne et la microvésiculation a été confirmée [59], la participation de la calpaïne dans le processus de libération des MPs est toujours controversée. Wiedmer *et al.* ont ainsi montré que la formation des MPs dérivées des plaquettes (PMPs) est dépendante de l'influx de calcium, mais ne nécessite pas de protéolyse du cytosquelette médiée par la calpaïne, suggérant un mécanisme alternatif de microvésiculation indépendant cette enzyme [60].

Le bourgeonnement de la membrane et la microvésiculation sont souvent précédés par une perte de l'asymétrie de la membrane due à des perturbations locales de la structure en bicouche lipidique des cellules. Il en résulte une redistribution des aminophospholipides, telle

que la phosphatidylsérine, du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane [61]. La régulation de la distribution asymétrique des aminophospholipides est régie par trois activités distinctes qui permettent la redistribution bidirectionnelle à travers la bicouche lipidique [62]. Le premier complexe est une aminophospholipide translocase qui permet le transport de la phosphatidylsérine et de la phosphatidyléthanolamine du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane plasmique contre le gradient de concentration présent. L'orientation différentielle des aminophospholipides à travers la bicouche lipidique est gouvernée par une floppase ATP-dépendante qui agit en coopération avec la translocase. Le troisième complexe, la scramblase lipidique, peut rapidement déplacer les aminophospholipides entre les feuillet membranaires par un mécanisme dépendant du calcium et peut aboutir à une perte de l'asymétrie membranaire. Une concentration élevée de calcium régule positivement la scramblase et bloque la coopération entre la translocase et la floppase. Cela aboutit à une externalisation de la phosphatidylsérine vers le feuillet externe de la membrane et est suivi par la libération des MPs. Ainsi, la phosphatidylsérine est exprimée sur la plupart des MPs, et a des conséquences fonctionnelles sur la stimulation du processus de coagulation en se liant au domaine chargé positivement des protéines de la coagulation.

Par ailleurs, il a été montré une implication des protéines kinases dans la régulation de la formation des MPs et l'exposition de la phosphatidylsérine. L'augmentation du calcium cytosolique peut activer certaines kinases et inhiber d'autres phosphatases responsables de la perturbation du cytosquelette [63-65]. Récemment, il a été reporté que la protéine kinase A (PKA) jouait un rôle central dans la régulation de la formation des MPs d'origine plaquettaires et dans l'exposition de la phosphatidylsérine, grâce à un mécanisme dépendant de l'activation de la calpaïne [66].

Pour illustrer un peu plus cette complexité de la formation des MPs, des mécanismes indépendants du calcium peuvent être également impliqués dans la formation des MPs. Ainsi Cauwenberghs *et al.* [67] ont trouvé que la voie des intégrines $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ est responsable de la formation de MPs par les plaquettes en absence d'agonistes. Cette voie agit par une déstabilisation de l'actine, indépendamment du calcium et de la calpaïne, mais leurs travaux n'ont pas pu expliquer si les deux voies (dépendante ou indépendante du calcium) agissaient séparément ou en synergie.

2.2. L'apoptose

Le second mécanisme aboutissant à la formation des MPs est l'apoptose. L'apoptose est un processus régulé d'une importance fondamentale dans le maintien de l'homéostasie, et est accompagné par des changements de morphologie cellulaire et notamment d'une perturbation du cytosquelette, d'une rétraction de la cellule et d'un bourgeonnement dynamique de la membrane [68]. Alors que la formation des MPs s'effectue principalement durant les phases précoces de l'apoptose, les corps apoptotiques sont produits dans les phases tardives du processus de mort cellulaire [69]. Les corps apoptotiques sont plus larges que les MPs et résultent de la fragmentation de l'ensemble de la cellule apoptotique [70]. Durant l'apoptose, le clivage de la caspase 3 mène à une activation indépendante de Rho des « Rho-associated protein kinase » (ROCK) I, qui va permettre la contractilité de la cellule par la génération d'une force myosine-actine, le bourgeonnement de la membrane et la formation des MPs sans affecter l'externalisation de la phosphatidylsérine [71,72].

2.3. Autres mécanismes de formation

Finalement, il a été reporté l'existence d'un autre mécanisme se situant à l'interface entre l'apoptose et l'activation cellulaire. Une équipe française a démontré que la stimulation de cellules endothéliales par la thrombine, une enzyme multifonctionnelle, permettait la génération de MPs par une voie impliquant la caspase-2 et RhoA/ROCK II, en absence de mort cellulaire [73]. La poursuite des travaux sur le même modèle a démontré l'implication du « tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand » (TRAIL) et de son récepteur TRAIL-R2 (également impliqué dans la voie de signalisation des cellules apoptotiques [74]) dans la libération de MPs endothéliales en initiant le recrutement de protéines adaptatrices et l'activation de « nuclear factor kappa B » (NF- κ B). Ils ont également mis à jour une nouvelle fonction de TRAIL comme médiateur entre les phénomènes de coagulation et d'inflammation en réponse à la thrombine [75].

Ces différentes données de la littérature soulignent clairement la complexité et les possibles interactions entre les différentes voies aboutissant à la formation des MPs. Une meilleure compréhension des mécanismes de microvésiculation (activation ou apoptose) contribuerait à déterminer des thérapies dans le but de cibler directement les MPs et diminuer leur taux dans des conditions pathologiques. La principale limite de l'ensemble des études concernant la

formation des MPs est que très souvent elles ont été réalisées *in vitro* sur des lignées cellulaires avec des inhibiteurs pharmacologiques. Il est donc nécessaire de déterminer si les mêmes voies de signalisation sont impliquées dans la production *in vivo* de MPs.

3. Composition et contenu des microparticules

Un important paramètre qui détermine l'effet biologique des MPs est leur composition protéique et lipidique, qui varie suivant l'origine cellulaire et le stimulus impliqué dans leur formation. En effet, les MPs contiennent des composants membranaires, cytoplasmiques et nucléaires de leur cellule précurseur, permettant leur caractérisation en utilisant des anticorps spécifiques de la cellule d'origine.

3.1. Contenu protéique

Les protéines des MPs d'origine endothéliale (EMPs) sont principalement des enzymes métaboliques, des protéines impliquées dans les processus d'adhésion et de fusion ainsi que des protéines associées au cytosquelette [76], alors que les protéines retrouvées dans les PMPs sont des glycoprotéines de surface ou des chemokines [77,78].

Cependant la composition globale en protéine des MPs peut être en relation avec leur stimulus d'origine. Par exemple, des MPs générées *in vitro* par activation cellulaire (par la phytohémagglutinine (PHA) et la phorbol-myristate-acétate (PMA)) et par apoptose (par l'actinomycine D (ActD)) à partir de lignée de lymphocyte T CEM ou des lymphocytes de patients diabétiques expriment à leur surface le morphogène Sonic Hedgehog (impliqué dans le développement embryonnaire et adulte). Cependant le traitement de ces mêmes cellules avec seulement la PHA, le PMA ou l'ActD ne permet pas de retrouver Sonic Hedgehog sur les MPs [79]. De plus, la comparaison de la composition protéique des MPs obtenues par activation cellulaire ou par apoptose montre que les MPs apoptotiques sont plus riches en protéines que les MPs activées par stimulus mitogénique [80]. De même, l'activation des monocytes THP-1 avec le lipopolysaccharide ou par la P-sélectine permet la production de MPs de taille et d'activité pro-coagulante similaire mais qui diffèrent sur la composition protéique [81].

3.2. Contenu lipidique

Concernant la composition lipidique, la bicouche membranaire des MPs est principalement formée de phospholipides, et présente une charge négative due à la présence de phosphatidylsérine et de phosphatidyléthanolamine. La déplétion en cholestérol inhibe l'externalisation de la phosphatidylsérine sur le feuillet exoplasmique de la membrane et la vésiculation indique que ces deux événements sont dépendants de l'organisation des radeaux lipidiques [65]. Dean *et al.* [82] ont récemment reporté que les composants actifs des PMPs de moyenne taille étaient lipidiques mais leur nature reste à déterminer. De plus, plusieurs travaux ont montré que l'environnement lipidique pouvait modifier l'activité de certaines protéines portées par les MPs. Par exemple, un enrichissement en cholestérol de monocytes humain induit la génération de MPs au potentiel fortement pro-coagulant [83]. L'ensemble de ces données laissent penser que les MPs issues des patients avec des pathologies métaboliques peuvent avoir une composition lipidique différente et engendrer des effets fonctionnels différents. De futures études lipidomiques seront donc nécessaires pour évaluer l'influence de l'environnement lipidique sur les effets des MPs.

4. Interaction entre les microparticules et les cellules cibles

La communication intercellulaire est basée sur des cascades de signalisation qui requièrent un contact cellulaire direct ou l'intervention d'un récepteur activé par des molécules secrétées.

Les MPs peuvent interagir avec la cellule cible par action sur un ligand exprimé à la surface, transférer des récepteurs de surface, ou délivrer des protéines, des acides ribonucléiques messagers (ARNm), des microARN (miARN) et des lipides bioactifs. De plus, elles peuvent transporter des particules infectieuses (mécanisme du cheval de Troie) et délivrer des organites intacts. Jusqu'à présent quatre mécanismes de transfert d'information ont été reportés : l'interaction ligand/récepteur, le transfert, la fusion et l'internalisation (Figure 14).

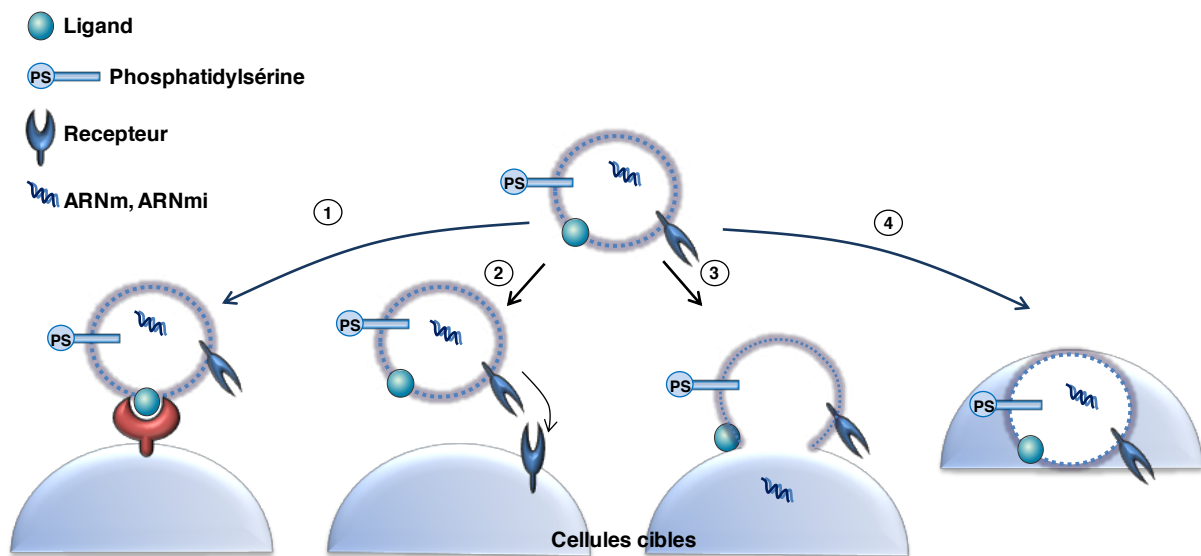


Figure 14 : Mécanismes d'interactions entre les microparticules et leur cellules cibles.

1 : interaction ligand-récepteur, 2 : transfert d'information, 3 : fusion, 4 : internalisation.

4.1. Interaction ligand-récepteur

Plusieurs études ont démontré que les MPs pouvaient directement stimuler les récepteurs exprimés sur les cellules cibles soit par interaction avec le ligand exprimé sur la surface des MPs ou par des médiateurs relâchés par les MPs. Ainsi, les PMPs exprimant la P-sélectine augmentent l'accumulation et l'agrégation des leucocytes en se liant à la P-sélectine glycoprotéine ligand-1 [84]. Par ailleurs, des travaux menés au sein du laboratoire ont montré que les MPs exprimant Sonic Hedgehog favorisaient la différenciation des mégacaryocytes, la production de NO par les CEs ainsi que l'angiogenèse de ces mêmes cellules tous ces effets étant annulés par l'inhibition du récepteur de Sonic Hedgehog [79,85,86]. De plus, le laboratoire a également pu mettre en évidence que les MPs issues des cellules T agissaient sur les CML par la voie de signalisation Fas/Fas Ligand [87].

4.2. Transfert de composants

Une autre voie utilisée par les MPs s'effectue à travers un transfert sélectif par contact direct de différents composants pouvant affecter différentes fonctions de la cellule cible. Les MPs peuvent notamment transférer des récepteurs à la surface de la cellule cible. Rozmyslowicz *et al.* ont ainsi montré que les MPs jouaient un rôle dans l'infection du virus de l'immunodéficience humaine en transférant le co-récepteur à chémokine de type 4 (CXCR4) aux cellules CD4⁺/CXCR4⁻ [88]. Les MPs peuvent également transférer d'autres composants, tel que l'AA transporté par les PMPs et retrouvé dans les CEs afin d'induire une augmentation de l'expression de la COX-2 et de l'«inter-cellular adhesion molecule 1» (ICAM-1) [89].

4.3. Fusion et internalisation

Finalement, les MPs peuvent aussi être absorbées par fusion ou par internalisation. La fusion des MPs avec leurs cellules cibles mène à un transfert non sélectif des composants des MPs et affecte les propriétés des cellules. La fusion des MPs riches en facteur tissulaire avec des plaquettes activées augmentent ainsi fortement leur activité pro-coagulante [90]. L'interaction entre les MPs libérées par les progéniteurs endothéliaux et les intégrines $\alpha 4$ et $\beta 1$ des cellules endothéliales mènent à leur internalisation et à la délivrance d'ARNm capable d'induire un programme d'activation angiogénique [91].

Cette énumération n'exclut pas la possibilité que les MPs peuvent être impliquées dans différentes voies et ces différentes possibilités d'interaction soulèvent une question: une MP interagit-elle seulement avec une seule cellule ou peut-elle influencer plusieurs cellules avant d'être éliminée? De plus, il est important de noter que les technologies actuelles ne permettent pas de déterminer le métabolisme, l'élimination des MPs et que leur demi-vie n'est toujours pas complètement connue. Récemment, il a été rapporté que les PMPs après transfusion sanguine possédaient une demi-vie d'environ six heures chez les patients avec une sévère thrombocytopenie [92]. On ne peut cependant exclure que le mécanisme d'élimination des MPs agissent différemment chez les sujets sains.

Toutes ces données nous montrent que la caractérisation précise de l'origine cellulaire ainsi que du message porté et transféré par les MPs est essentiel pour comprendre leurs propriétés pathogéniques ou bénéfiques.

5. Les microparticules : biomarqueurs et effecteurs dans les pathologies cardiovasculaires

Bien qu'un taux basal de MPs soit retrouvé chez les sujets sains, une élévation de ce taux a été reportée dans de nombreuses conditions pathologiques. La principale cible des MPs est le système cardio-vasculaire. Les MPs circulantes isolées à partir du sang sont maintenant considérées comme des biomarqueurs d'une dysfonction vasculaire et d'une inflammation dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'infarctus du myocarde, la prééclampsie, l'athéromatose, le diabète, l'hypertension ou encore le syndrome métabolique. Dans ces maladies, un taux élevé de MPs a été reporté et est souvent corrélé à la sévérité de la pathologie. Depuis quelques années, les MPs sont également considérées comme de véritables effecteurs capables de véhiculer un message biologique aux cellules cibles. Il est intéressant de noter que le transfert d'information aux cellules est indépendant du nombre de MPs mais concernerait plutôt la composition et/ou l'origine des MPs [93,94].

5.1. Effets des microparticules sur la fonction vasculaire

Concernant les effets directs des MPs sur la fonction vasculaire, il a été proposé par de nombreux groupes que les MPs circulantes affectaient la quantité de NO en diminuant sa production via la réduction de l'activité de la eNOS et/ou en diminuant sa biodisponibilité. Ainsi, les MPs issues de patients souffrant d'infarctus du myocarde, de diabète ou de prééclampsie induisent une dysfonction endothéliale par une détérioration de la voie de transduction du NO endothélial [95-97]. Chez les patients souffrant du syndrome métabolique, l'élévation du taux de MPs participe à la dysfonction endothéliale en diminuant l'activité de la eNOS, la production de NO, en augmentant la nitration des protéines des CEs [98] et en augmentant les marqueurs plasmatiques du stress oxydant [99].

Les MPs circulantes peuvent aussi interagir avec les CML, induire une inflammation vasculaire et modifier la contractilité des vaisseaux. Durant la prééclampsie, le taux circulant de MPs est capable d'induire une hyporéactivité aux agonistes contractiles par une augmentation de la production de NO *via* la iNOS et des dérivés vasoconstricteurs issus des métabolites de la COX-2 [100].

La séparation des MPs selon leurs origines cellulaires montre que si les MPs d'origine leucocytaire sont à même d'induire la libération de NO et des produits vasoconstricteurs d'origine COX-2, celles d'origine plaquettaire stimulent seulement la production de NO,

suggérant que les PMPs pourraient servir de mécanisme protecteur contre l'hypertension durant la prééclampsie.

Ces résultats suggèrent d'une part une implication des MPs dans les mécanismes responsables de complications cardiovasculaires dans différentes pathologies et d'autre part que les MPs peuvent être vraiment considérées comme des marqueurs d'une dysfonction cardiovasculaire et participer à l'amplification de cette dysfonction préexistante.

5.2. Angiogenèse et microparticules

L'angiogenèse est un terme générique qui se définit par la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Au cours du processus angiogénique, la vasodilatation initiale du vaisseau s'accompagne par une augmentation de la perméabilité de la monocouche de CEs, et de la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante. Les CEs activées sont alors capables de migrer, de proliférer pour former de nouveaux tubes vasculaires (Figure 15). L'angiogenèse est un processus contrôlé par des facteurs pro- ou anti-angiogéniques qui prend place dans les tissus ischémiques. Ainsi, en cas d'hypoxie, le « vascular endothelial growth factor » (VEGF), un des principaux facteurs pro-angiogénique, est surexprimé. Un aspect clef des effets des MPs sur le système cardiovasculaire est leur capacité à moduler le programme angiogénique à la fois des CEs matures et des cellules progénitrices. Il est maintenant admis dans la littérature que les MPs sont capables d'intervenir sur trois étapes cruciales de l'angiogenèse : le recrutement et la différenciation des progéniteurs endothéliaux, la dégradation matricielle et la migration et la prolifération des CEs. De plus, les effets des MPs seraient différentiels selon l'origine de ces MPs [55].

Taraboletti *et al.* ont reporté qu'un mélange de EMPs et exosomes porteuses de métalloprotéinases (MMPs) favorisaient la formation de structure tubulaire par les CEs humaines, en régulant probablement l'activité protéolytique, étape importante de l'angiogenèse impliquée dans la migration des cellules [101]. D'autres protéines, tel le « peroxysome proliferator-activated receptor α » (PPAR α), portées par les MPs semblent essentiels dans leur capacité à reprogrammer angiogéniquement les progéniteurs endothéliaux *via* la voie de signalisation impliquant Akt et NF- κ B [102]. Récemment, les MPs isolées de patients atteints de rétinopathie diabétique ont montré une capacité à stimuler la prolifération des CEs et à augmenter la formation de nouveaux vaisseaux chez la souris, indiquant que ces MPs pourraient contribuer à la progression de la pathologie grâce à leur capacité pro-angiogénique [103].

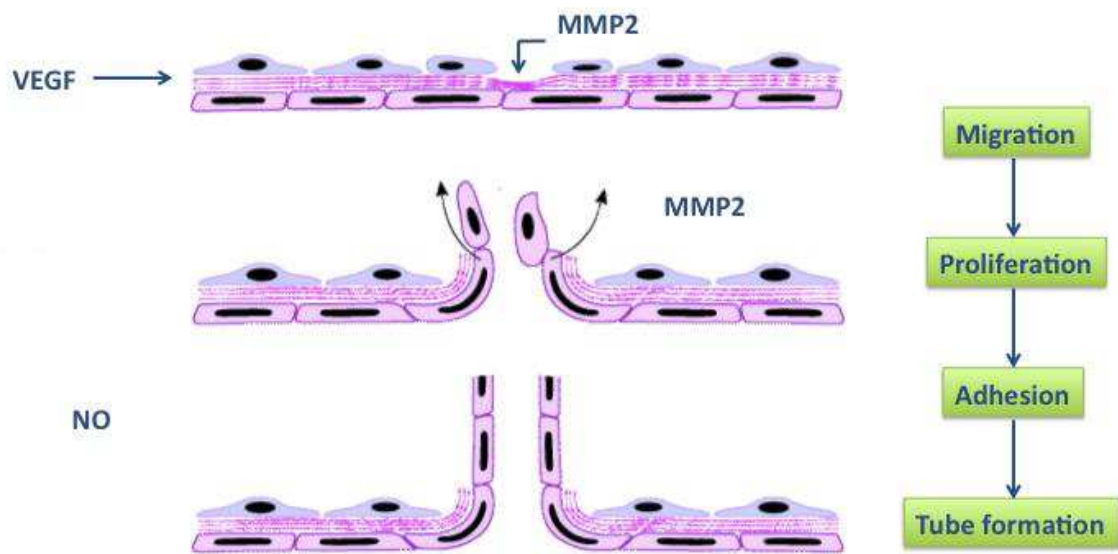


Figure 15 : Les différentes étapes du processus angiogénique.

VEGF : vascular endothelial growth factor, NO : moxyde d'azote, MMP2: metalloproteinase 2.

Les MPs sont également capables de contribuer au développement de l'athérosclérose en amplifiant la dysfonction endothéliale présente et en accélérant la progression des lésions athérosclérotiques par néovascularisation de la plaque interne [104]. L'ensemble de ces données apporte un éclaircissement sur les effets potentiels des MPs sur différentes étapes de l'angiogenèse, et pourraient faire des MPs une nouvelle cible thérapeutique contre la progression de certaines pathologies.

Malgré toutes ces études, une élévation du taux circulants de MPs n'est pas toujours synonyme d'effets délétères. En effet, une fraction serait capable de délivrer des messages biologiques protecteurs afin de préserver la fonction endothéliale et/ou l'intégrité vasculaire. Ainsi, les MPs circulantes provenant des patients septiques ont montré des propriétés protectrices en corrigeant l'hyporéactivité des vaisseaux traités au lipopolysaccharide (LPS) *via* une production de TXA_2 [105], confirmant une étude précédente qui avait établie une corrélation positive entre un fort taux circulants de MPs et la survie des patients septiques [106].

6. Modulation et action thérapeutique des microparticules

Il est devenu clair avec les années que les MPs pouvaient être considérées comme de véritables vecteurs biologiques capables de véhiculer différentes informations bénéfiques ou délétères en interagissant avec les cellules cibles. En conséquence, la compréhension du rôle des MPs dans les pathologies n'est pas seulement importante pour décrypter les mécanismes physiopathologiques associés mais également dans l'utilisation des MPs comme outil thérapeutique.

Il a ainsi été proposé au laboratoire d'utiliser les MPs comme outil grâce à la conception *in vitro* de MPs [107]. Ces MPs sont générées spécifiquement dans le but de modifier leur composition moléculaire, et leurs propriétés cardiovasculaires. Ces MPs produites à partir de cellules T activées/apoptotiques porteuses de Sonic Hedgehog sont capables d'augmenter la production de NO, de restaurer la relaxation dépendante de l'endothélium après une ischémie-reperfusion, de favoriser l'angiogenèse *in vitro* ainsi que la formation de nouveaux vaisseaux dans un modèle d'ischémie périphérique chez la souris [85,86,108]. Ces données suggèrent que les MPs porteuses de Sonic Hedgehog représentent un outil potentiel en stimulant la néovascularisation dans les pathologies présentant un déficit angiogénique. Plus audacieux encore, la transfection de MPs avec des nouvelles protéines ou ARNm afin de les délivrer aux cellules cibles pourraient représenter une nouvelle opportunité de transférer le message biologique désiré aux cellules, modifier leur phénotype ou rétablir leur fonction d'origine (Figure 16).

En résumé, les MPs pourraient constituer à l'avenir un outil thérapeutique prometteur. En effet, la facilité et la faisabilité d'une production à grande échelle, le manqué de toxicité et les données précliniques et cliniques déjà obtenues dans de nombreuses pathologies sont de nombreux arguments en faveur des MPs.

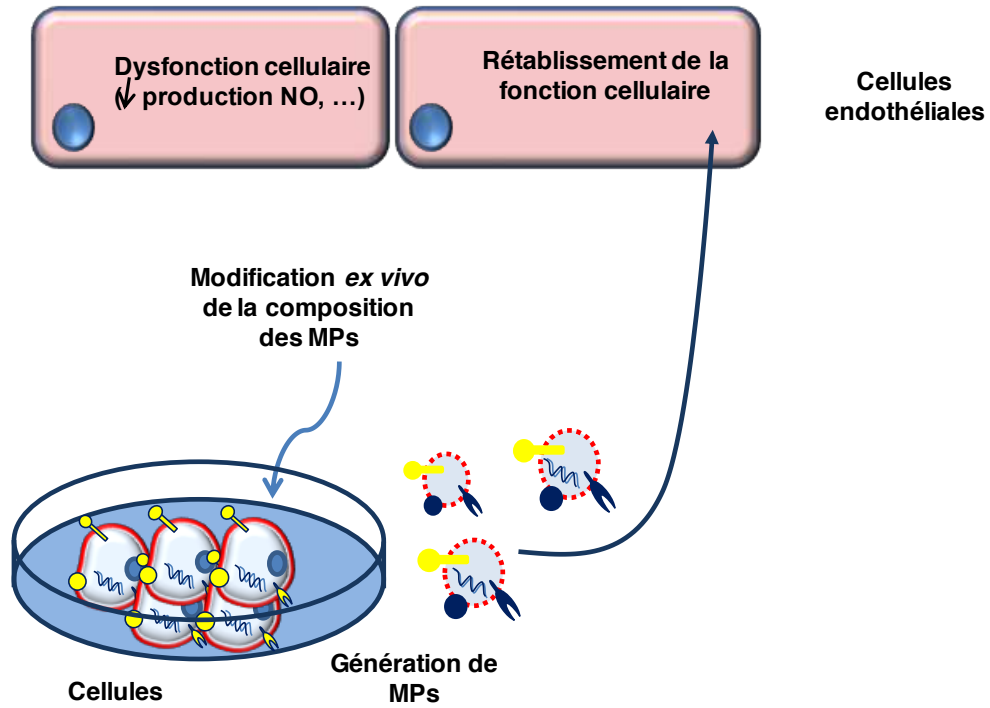


Figure 16: Utilisation de microparticules comme outil thérapeutique.

III. Physiopathologie de l'endothélium : l'exemple de deux maladies hypoxiques

1. Les pathologies pulmonaires

Les pathologies pulmonaires incluent un grand nombre de pathologies et leurs relations avec les MPs sont étudiées de plus en plus largement. Il apparaît ainsi que les MPs peuvent contribuer à la sévérité de ces pathologies non seulement en présentant une altération de leur taux, mais également en potentialisant ces pathologies. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à deux pathologies pulmonaires présentant une caractéristique commune, l'hypoxie. En effet, l'HTAP est caractérisée par une hypoxie chronique alors que le SAOS est caractérisé par une hypoxie intermittente.

2. L'hypertension artérielle pulmonaire

L'HTAP a été décrite pour la première fois en 1891, par Ernst von Romberg comme une « sclérose des artères pulmonaires » et est considérée comme une maladie fatale dont la médiane de survie était inférieure à trois ans. L'HTAP est une maladie pulmonaire définie par une pression artérielle pulmonaire (PAP) supérieure à 25 mmHg au repos, ou supérieure à 30 mmHg à l'effort [109], conduisant à une défaillance ventriculaire droite, cause principale de la mortalité. Actuellement, la prévalence minimale de l'HTAP en France est de 15 cas par millions d'adultes et l'incidence est de 2.4 cas par millions d'adultes par an [110].

2.1. Classification clinique des hypertensions pulmonaires

L'HTAP fut initialement classé en deux catégories : l'HTAP primitive, dont la cause demeurait inconnue, et l'HTAP secondaire consécutive à d'autres maladies ou suite à une hypoxémie chronique environnementale. Dans le but de regrouper certaines formes d'HTAP partageant des caractéristiques cliniques, physiopathologiques et thérapeutiques, une nouvelle classification a été réalisée lors du « *World Symposium on Pulmonary Arterial Hypertension* » en 1998. La révision la plus récente date de 2008 (Tableau 1).

I. Hypertension artérielle pulmonaire
Idiopathique
Héréditaire
Médicamenteuse et toxique
Associée
Hypertension pulmonaire persistente du nouveau-né
I'. Maladie veino-occlusive et/ou hémangiomatose pulmonaire
II. Hypertension pulmonaire par cardiopathie gauche
III. Hypertension pulmonaire due à des pathologies pulmonaires et/ou à l'hypoxie
Bronchopneumopathie chronique obstructive
Pathologies intersticielles
Autres pathologies pulmonaires
Pathologies du sommeil
Hypoventilation alvéolaire
Long séjour en haute altitude
Anomalie du développement
IV. Hypertension pulmonaire par maladie thromboembolique chronique
V. Hypertension pulmonaire de mécanismes non clairs et/ou multifactoriels
Hémopathies
Désordre systémique
Désordre métabolique
Autres

Tableau 1 : Classification clinique des hypertensions pulmonaires (d'après Simonneau *et al.* [111]).

2.2. Manifestations cliniques et diagnostic

Le diagnostic de l'HTAP est un diagnostic d'exclusion [112]. En effet, l'établissement d'un diagnostic d'HTAP n'est à l'heure actuelle toujours pas aisé, en raison de la relative rareté de la pathologie, la nature non spécifique des symptômes et du fait que les tests de routine ne sont pas adéquats [113]. Le signe clinique le plus courant est la dyspnée d'effort, accompagné d'une asthénie, de douleurs thoraciques, d'œdèmes ou de syncopes [114]. L'examen physique peut révéler la présence d'une HTAP et/ou d'une défaillance ventriculaire droite. D'autres examens peuvent orienter le diagnostic tels l'électrocardiogramme, la radiographie du thorax ou encore l'échographie transthoracique par laser Doppler [115]. Mais, même si c'est une technique invasive, le cathétérisme cardiaque droit reste cependant la seule méthode qui confirme avec certitude l'élévation de la PAP et donc l'installation de l'HTAP.

2.3. Pathogénèse globale

L'HTAP est une maladie qui touche principalement les artères pulmonaires. Elle se caractérise par une obstruction vasculaire conduisant à une augmentation progressive des résistances à l'écoulement sanguin. Cette augmentation de la postcharge du ventricule droit conduit à une défaillance cardiaque droite [116]. La vasoconstriction et le remodelage de la paroi des vaisseaux pulmonaires sont des facteurs qui contribuent à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires [117]. L'obstruction des artères pulmonaires par prolifération intimale et médiale est également considérée comme un facteur déterminant dans la pathogénèse de l'HTAP [118]. Au plan physiopathologique, il est actuellement bien établi que la principale anomalie est une dysfonction endothéliale s'accompagnant d'une diminution de la production de substances vasodilatatrices, ainsi que d'une augmentation de vasoconstricteurs puissants qui stimulent également la prolifération vasculaire pulmonaire (Figure 17).

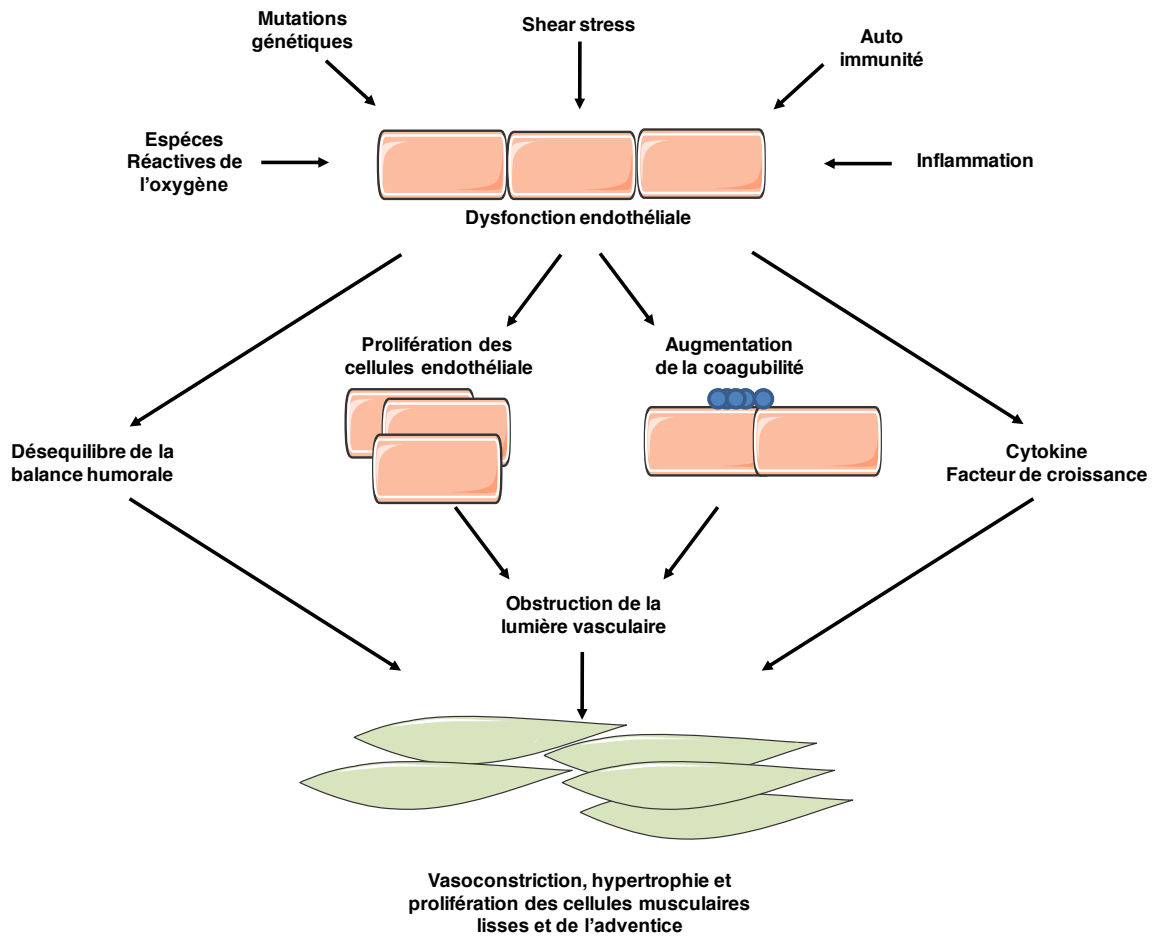


Figure 17 : Rôle de la dysfonction endothéliale dans l'HTAP (d'après Budhiraja *et al.* [119]).

Au niveau moléculaire, trois voies mécanistiques majeures bien connues sont altérées dans l'HTAP [115]. L'activité des PGI₂ synthases et le taux de PGI₂ sont diminués chez les patients souffrant d'HTAP. Cette diminution mène à une déficience de ses effets vasodilatateurs et antiprolifératifs, qui sont associés à une augmentation du taux de TXA₂ [120]. Par ailleurs, les taux d'ET-1 sont plus élevés chez les patients souffrant d'HTAP [121] et sa dégradation dans les vaisseaux pulmonaires est réduite. Il a ainsi été reporté une corrélation positive entre les taux plasmatiques d'ET-1, la sévérité de l'HTAP et le pronostic vital [122]. La troisième voie altérée est la voie du NO. Ces patients présentent en effet une diminution de l'expression de la eNOS qui va favoriser la vasoconstriction et la prolifération cellulaire [123]. A l'heure actuelle, la CE semble donc être une des cibles particulièrement exposées dans l'HTAP.

Parmi les paramètres biologiques altérés lors de l'HTAP, il a été reporté une corrélation positive entre le taux de MPs membranaires et la sévérité de l'HTAP [124, 125] (Figure 18), mais rien n'indique à l'heure actuelle si les MPs peuvent participer à la dysfonction endothéliale observée.

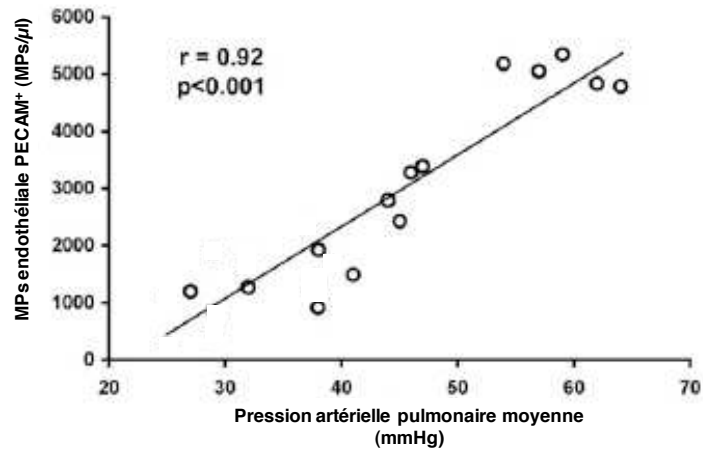


Figure 18 : Corrélation positive entre la sévérité de l'HTAP et le taux de MPs d'origine endothéliale (d'après Amabile *et al.* [124]).

2.4. Stratégie thérapeutique

Chez les patients, certaines précautions simples doivent être envisagées, et la plus importante est sans doute d'éviter les circonstances et les médicaments pouvant aggraver la maladie. En effet, chez ces patients, toute augmentation brutale du débit cardiaque peut entraîner une aggravation des symptômes d'HTAP et d'insuffisance cardiaque droite [126]. Le traitement conventionnel de l'HTAP associe ainsi des mesures générales, une anticoagulation au long cours pour éviter la formation de thrombus, et éventuellement une oxygénothérapie pour maintenir une saturation en oxygène suffisamment élevé.

Les traitements médicamenteux spécifiques se sont améliorés grâce à l'acquisition de nouvelles connaissances sur l'HTAP. La principale cible thérapeutique est l'augmentation du diamètre de la lumière des vaisseaux en utilisant des vasodilatateurs. Ces traitements incluent l'inhalation de NO et/ou l'administration de bloqueurs des canaux calciques, de PGI₂ exogènes et des antagonistes des récepteurs de l'ET. Cependant, ces traitements ont durée d'action courte et une efficacité limitée. Ces traitements sont également onéreux et sont

associés à des effets secondaires non négligeables. Pour les patients qui ne répondent pas aux traitements médicaux, l'atrioseptostomie et la transplantation pulmonaire sont les seules options restantes [127,128].

2.5. Modèles animaux

L'HTAP est une pathologie multi-composante. L'investigation chez les patients étant limitée (notamment au niveau tissulaire), et dans la considération de nouvelles approches thérapeutiques), il a donc été nécessaire de mettre en place des modèles animaux. Un bon modèle animal se doit d'être isomorphe, présentant une forte homologie avec la pathologie, et surtout être prédictif. Un modèle spontané ne peut être un modèle réaliste car il est non contrôlable et souvent hétérogène, la recherche s'est donc tournée vers les modèles induits, même si toutes les composantes de la pathologie ne sont pas représentées.

Classiquement, il existe deux modèles animaux principaux d'HTAP : l'injection de monocrotaline (un alcaloïde de la famille de la pyrrolizidine présente dans la plante *Crotalaria spectabilis*) et l'hypoxie chronique qui réunissent de nombreuses caractéristiques cliniques, hémodynamiques, histopathologiques et biologiques de l'HTAP. D'autres modèles alternatifs présentant une caractéristique particulière existent également, mais dans cette étude nous avons utilisé le rat chronique hypoxique qui présente de forte homologie avec la pathologie humaine [129].

L'exposition à l'hypoxie chronique induit une vasoconstriction pulmonaire, suivie d'un remodelage artériolaire, la sévérité de l'HTAP étant proportionnelle à l'intensité de la vasoconstriction initiale. Le remodelage artériolaire se limite à une hypertrophie médiale, sans épaississement intimal ni infiltrats inflammatoires. Au niveau hémodynamique, on retrouve des valeurs de PAP de l'ordre de 20 à 35 mmHg. Sur le plan biologique, l'HTAP hypoxique se caractérise par une surexpression intimale de l'ET-1, de la NOS endothéliale et de la synthèse de la PGI₂. A l'exception de la surexpression de la PGI₂ et du NO, l'étiologie de l'HTAP hypoxique expérimentale ressemble à celle de l'HTAP.

3. Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil

Le SAOS est le trouble nocturne le plus fréquent caractérisé par des épisodes partiels (hypopnées) ou complets (apnées) d'occlusion des voies aériennes supérieures pendant le sommeil. Cette pathologie affecte dans la population adulte au moins 4% des hommes et 2% des femmes [130].

3.1. Manifestations cliniques et diagnostic

Le diagnostic du SAOS implique la présence répétée d'apnées et d'hypopnées pendant le sommeil, signe d'une obstruction répétée des voies aériennes supérieures. Cette obstruction conduit à une diminution de la saturation artérielle en O₂ (SaO₂) et à une fragmentation du sommeil. Le SAOS se caractérise ainsi par des symptômes nocturnes tels que le ronflement, un sommeil non réparateur, des pauses respiratoires ainsi que par une somnolence diurne excessive. Ce diagnostic est confirmé par un enregistrement nocturne par polysomnographie dans un laboratoire du sommeil où le sommeil, le débit respiratoire nasal, la SaO₂, les mouvements respiratoires de la cage thoracique et de l'abdomen sont enregistrés [131].

Les apnées sont caractérisées par une absence de débit respiratoire (mouvements respiratoires) pendant au moins 10 secondes, et les hypopnées par une diminution du débit respiratoire (l'amplitude respiratoire) supérieure à 50% pendant au moins 10 secondes accompagnée d'une diminution de la SaO₂ d'au moins 4% ou d'un micro-éveil. Les apnées sont dites obstructives s'il existe une occlusion du pharynx accompagné d'efforts respiratoires, et elles sont centrales si elles sont secondaires à l'absence de mouvements respiratoires sans occlusion du pharynx.

Le SAOS est défini par un index d'apnées-hypopnées (IAH) supérieur ou égal à 5 par heure accompagné notamment par une somnolence diurne excessive, deux ou plus épisodes de suffocation pendant le sommeil, des épisodes récurrents de micro-éveil, un sommeil non réparateur, une fatigue excessive, ou des défauts de concentration ou de mémoire [132].

La sévérité du SAOS est caractérisée par l'IAH. En effet, l'hypoxie et les micro-éveils qui interrompent le sommeil sont une conséquence directe des épisodes d'apnées et d'hypopnées, l'IAH est donc un indicateur direct de la fréquence de ces événements et de leurs conséquences physiopathologiques : un IAH entre 5 et 15 signe un SAOS minime, entre 15 et 30 modéré, et un SAOS sévère si supérieur à 30. Plus l'IAH est élevé, plus le tableau clinique

du SAOS est sévère (sommolence diurne, trouble neurocognitif), et il est maintenant reconnu que la prévalence des accidents cardio-vasculaires augmente avec cet index [133]. Le SAOS est ainsi considéré comme un facteur de risque cardio-vasculaire indépendant au même titre que le diabète, la dyslipidémie, l'hypertension artérielle ou le tabac [134].

3.2. Pathogénèse globale

Le SAOS est une pathologie multi-composante et peut varier considérablement entre les individus. La pathophysiologie du SAOS est influencé par de nombreux aspects inhérent à chaque individus tels l'anatomie des voies aériennes supérieures, la capacité des muscles dilatateurs des voies aériennes à répondre pendant le sommeil, la stabilité du système respiratoire ou encore le volume pulmonaire.

Les épisodes répétés d'hypoxie/régénération et la fragmentation du sommeil ont une influence sur la fonction endothéliale. De nombreuses études ont mis en évidence une dysfonction endothéliale aussi bien clinique que chez les modèles animaux par une diminution de la production de NO endothélial, ainsi qu'une augmentation du stress oxydant, ce qui réduit encore davantage la biodisponibilité du NO, bien que les taux de ONOO⁻ soient semblables chez les patients SAOS et les sujets sains [135]. Cette réduction du NO accroît le risque de pathologies vasculaires chez ces patients [136,137] (Figure 19).

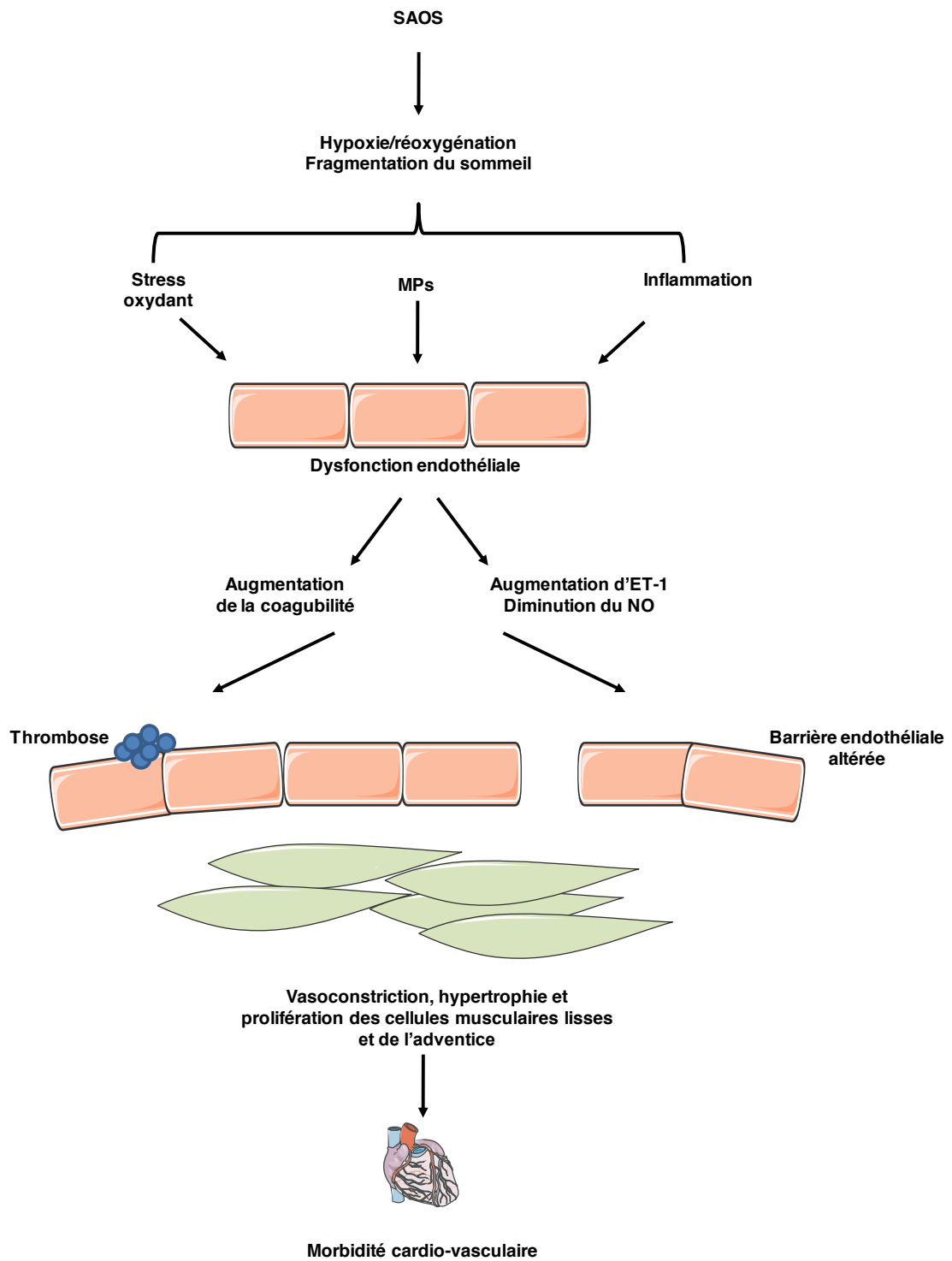


Figure 19: Mécanisme de la dysfonction endothéliale observée dans le SAOS (D'après Budhiraja *et al.* [137]).

Depuis une dizaine d'années, un lien entre les effets des MPs et le SAOS semble s'établir, même si les données présentes sont contradictoires. En effet, Geiser *et al* [138] ont montré des taux comparables de PMPs entre les patients SAOS et les témoins malgré une augmentation plaquettaire *in vivo*. Plus récemment, Ayers *et al* [139] ont montré une augmentation significative des MPs procoagulantes, leucocytaires et PMPs, sans modification des EMPs. A l'inverse, les altérations de l'endothélium vasculaire ont été mises en évidence par une surproduction de EMPs par d'autres auteurs [140,141]. Cependant, aucune de ces études n'avait montré de réels effets des MPs dans la pathologie. Au laboratoire, le travail du Dr. Priou n'a pas montré de différence entre les taux de MPs circulantes, mais une modification de leur phénotype, et notamment une augmentation des MPs d'origine leucocytaires et granulocytaires chez les patients SAOS [93] et que cette augmentation de MPs leucocytaires avait lieu la nuit [142]. Plus intéressant, ils ont réussi à démontrer une association entre la dysfonction endothéliale observée et le taux de MPs leucocytaires, suggérant ainsi la participation des MPs parmi les multiples mécanismes physiopathologiques proposés pour démontrer la morbidité cardio-vasculaire dans le SAOS (Figure 20).

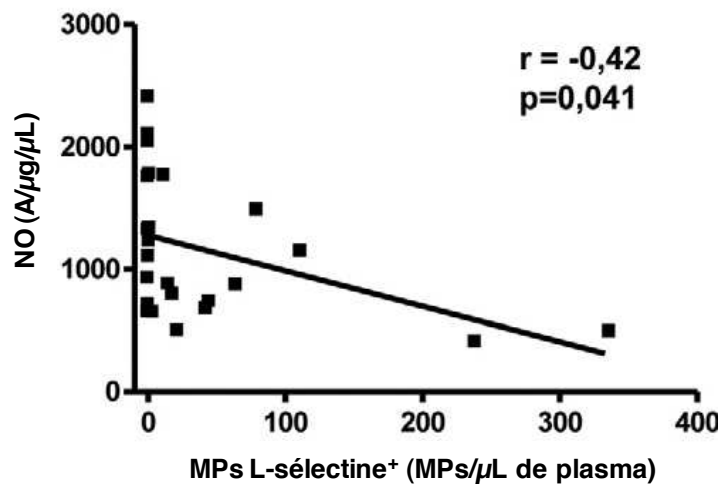


Figure 20 : Corrélation entre le taux de MPs leucocytaires et la production de monoxyde d'azote par les cellules endothéliales humaines Eahy 926 (d'après Priou *et al.* [93]).

3.3. Stratégie thérapeutique

Actuellement, la pression positive continue (PPC) est le traitement standard pour les patients SAOS. La PPC maintient une pression positive transmurale des voies aériennes et cette stratégie est bénéfique pour les patients qui la supportent. Des essais cliniques ont ainsi montré une nette amélioration de la somnolence diurne [143], de la pression sanguine, de la fonction vasculaire [144,145] et donc de la qualité de vie.

La PPC est très efficace, mais une proportion significative des patients ne tolère pas cette thérapie [146] ou est réticent à l'utiliser [147]. De nouvelles thérapies sont donc indispensables pour ces patients. L'alternative principale aujourd'hui comprend les appareils oraux, dont l'orthèse d'avancée mandibulaire qui possède potentiellement de nombreux avantages par rapport à la PPC [148]. Cependant ces appareils sont chers, peuvent être inconfortables et leurs réponses sont imprédictibles [149].

Au final, l'efficacité de ces différents traitements sera grandement amélioré si les autres facteurs qui influent sur la SAOS sont également pris en charge, tels que l'obésité, l'hygiène de sommeil, ou encore l'alcool.

OBJECTIFS DES TRAVAUX

L'objectif général de ce travail de thèse était d'étudier l'implication des MPs sur l'altération de la fonction vasculaire observée dans l'HTAP et le SAOS.

En effet, les MPs ont la capacité de transférer une information biologique entre les cellules en agissant comme de véritables vecteurs de signalisation, et leur taux est très souvent corrélé à la sévérité d'une pathologie.

Parmi les paramètres biologiques altérés lors de l'HTAP, il a été reporté une corrélation positive entre le taux de MPs membranaires et la sévérité de l'HTAP. Dans un premier temps, nous avons déterminé si les MPs participaient à la dysfonction endothéliale observée dans l'HTAP.

Par ailleurs, le rôle joué par les MPs dans la modulation de la réactivité vasculaire a été décrit dans plusieurs pathologies cardiovasculaires. Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à la possible implication des MPs circulantes dans la régulation de la vasomotricité au cours du SAOS.

Enfin dans le but de comprendre les mécanismes angiogénique observée dans le SAOS, nous avons étudié le rôle éventuel des MPs associé à ce processus.

RESULTATS

Partie I :

Les microparticules circulantes issues de rats hypoxiques
Chroniques entraînent une dysfonction endothéliale

I. But de l'étude

Cette étude s'inscrit dans la thématique du laboratoire qui depuis une dizaine d'années s'attache non seulement à décrire les altérations des taux de MPs mais également à en comprendre les effets physiologiques et/ou pathologiques dans les pathologies vasculaires. Ainsi, il a été rapporté une élévation du taux de MPs lors de la pré-éclampsie, le choc septique et le syndrome métabolique [150,105,98]. Concernant les effets propres des MPs, lors de la prééclampsie, il a été également montré que les MPs induisaient une hyporéactivité des vaisseaux issus de souris gestantes grâce à une surproduction de NO [150]. En revanche dans le choc septique, les MPs augmentent l'hyperréactivité à la sérotonine (5-HT) sans variation de la production de NO et agiraient comme un mécanisme protecteur contre l'hypotension présente chez ces patients [105]. Enfin, dans le syndrome métabolique, les MPs altèrent la production de NO dans les CEs et participent à la dysfonction endothéliale en diminuant la relaxation dépendante de l'endothélium des aortes de souris [98]. Des effets différentiels des MPs sur la production de NO et la réactivité vasculaire ont donc été mis en évidence en fonction de la pathologie étudiée.

Notre étude, réalisée en collaboration avec l'INSERM U1045 à Bordeaux, a permis d'associer l'expertise des deux laboratoires sur une pathologie, l'HTAP, et sur un vecteur les MPs. Ce travail expérimental a donc eu pour but de vérifier dans un premier temps, si dans un modèle animal d'HTAP nous observions des variations du taux de MPs, puis dans un second temps de déterminer si ces MPs pouvaient être un vecteur de la dysfonction vasculaire observée dans cette pathologie.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. **Microparticules issues d'un modèle animal** : le rat hypoxique chronique

Hypoxie chronique hypobare

Des rats males Wistar (8-10 semaines, 250-300 g) ont été soumis à une hypoxie dans un caisson hypobare (Sapratin, Argenteuil, France) dans lequel l'air est renouvelé à un débit de 10,5 à 11,1 l/minute. La pression était diminuée progressivement pour atteindre 380 mmHg ou 0,5 atmosphère, ce qui équivaut à une altitude de 5500 mètres. La pression inspirée en oxygène dans le caisson est de 79.8 mmHg, valeur considérée au niveau alvéolaire comme étant le seuil induisant une HTAP. Les rats hypoxiques y ont été maintenus durant 21 jours. Le caisson a été remis à la pression atmosphérique 3 jours par semaine pendant un temps limité (environ 30 minutes) pour changer les litières et permettre le réapprovisionnement en eau et en nourriture. La dépressurisation était réalisée progressivement pour revenir à 760 mmHg.

Les rats normoxiques ont été maintenus dans le caisson pendant 21 jours dans les mêmes conditions que les rats hypoxiques, exceptée que la pression atmosphérique y était maintenue à 760 mmHg.

Evaluation de l'HTAP hypoxique

Pour évaluer l'efficacité du modèle, la détermination de l'HTAP hypoxique a été réalisée par l'appréciation de trois critères :

- la mesure de la PAP moyenne
- le calcul de l'indice de Fulton
- la valeur de l'hématocrite

Mesure de la pression artérielle pulmonaire

Après trois semaines d'exposition, les rats étaient retirés du caisson puis anesthésiés par un mélange de Xylazine (10mg/kg) et de kétamine (50mg/kg) administrés par voie intrapéritonéale. La PAP moyenne a été mesurée à l'aide d'un cathéter de pression après insertion dans la veine jugulaire droite (thorax fermé), puis passage dans le ventricule droit pour arriver à l'artère pulmonaire principale.

Les valeurs de PAP moyennes chez les rats normoxiques et hypoxiques ont été mesurées à l'aide d'un moniteur automatique (Physiogard SM 785, ODAM, Wissembourg, France) : les rats normoxiques présentaient une PAP moyenne de 15.6 ± 0.8 mmHg et les rats hypoxiques de 30.4 ± 1 mmHg (Figure 21 A). Après les mesures de pression, les rats ont été sacrifiés par exposition au CO₂.

Calcul de l'indice de Fulton

L'indice de Fulton est défini par le rapport du poids du ventricule droit sur le poids du ventricule gauche plus septum. Le ventricule droit était délicatement disséqué du ventricule gauche et du septum, les caillots de sang résiduels enlevés et les deux parties pesées. Une élévation de ce rapport indique le développement d'une hypertrophie ventriculaire droite consécutive à l'augmentation des résistances artérielles pulmonaires. Les rats normoxiques présentaient un ratio de 0.26 ± 0.04 contre un ratio de 0.51 ± 0.01 pour les rats hypoxique (Figure 21 B).

Valeur de l'hématocrite

La mesure de l'hématocrite se réalise sur le sang rapidement prélevé et transféré dans un capillaire et centrifugé. Les rats hypoxiques présentaient un hématocrite plus élevés par rapport aux rats normoxiques (Figure 21 C, d'après Bonnet *et al.* [151]).

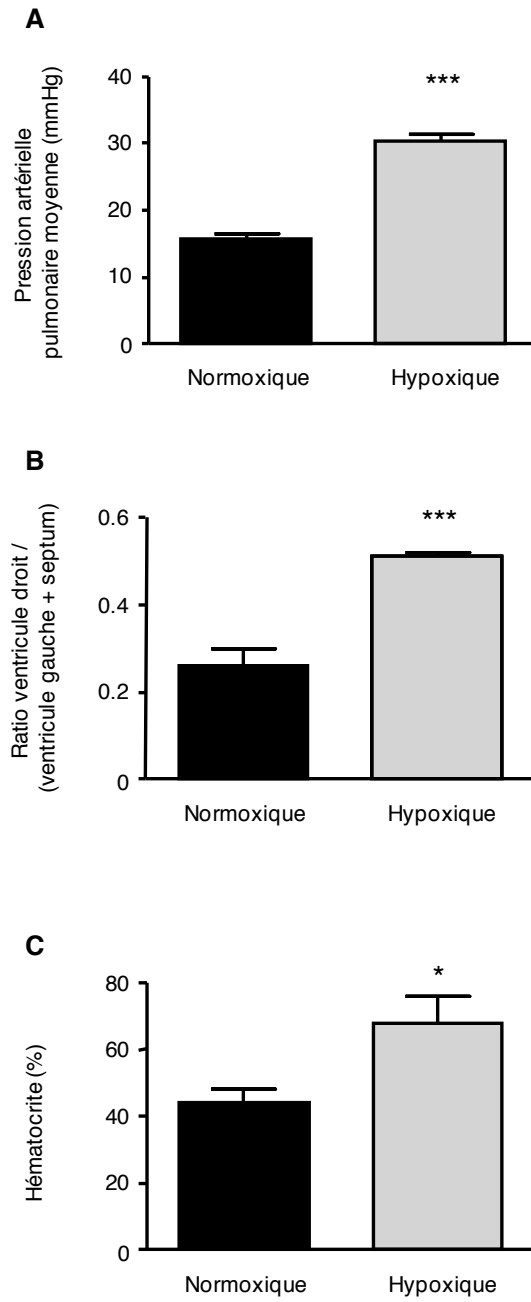


Figure 21 : Effet de trois semaines d'hypoxie chronique chez le rat sur les valeurs de pression artérielle pulmonaire moyenne, du rapport de Fulton et de l'hématocrite.

* $P < 0.05$ et *** $P < 0.001$.

Isolation des MPs

Une fois les animaux sacrifiés, le sang était rapidement prélevé à partir du cœur et placé dans un tube citraté (3.8 % de citrate de sodium). Les tubes de sang ont été centrifugés à 1900 *g* pendant 3 minutes. Le plasma riche en plaquettes a été récupéré et centrifugé à 5.000 *g* pendant 4 minutes pour obtenir le plasma pauvre en plaquettes (PPP). Cent μ l ont été stockés à -80°C pour réaliser le phénotypage de MPs. Le volume restant a été soumis à trois étapes de centrifugation à 15.000 *g* pendant 30 minutes. Le culot final était suspendu dans 150 μ l de solution saline (NaCl 0.9 %) et conservé à $+4^{\circ}\text{C}$. Du sang des rats normoxiques étaient extraites les MPs normoxiques et du sang des rats hypoxiques étaient extraites les MPs hypoxiques.

Cette partie du projet a été réalisée à l'INSERM U1045 (Bordeaux) et les échantillons de MPs ont ensuite été transportés à Angers où les expériences ont été réalisées.

1.2. Cellules endothéliales d'aorte et d'artère pulmonaire de rat

Dissociation cellulaire

Les cellules utilisées étaient des CE d'aortes et d'artères pulmonaires de rats Wistar âgés de 8 à 12 semaines et pesant environs 350 à 450 g. La méthode d'extraction a été adaptée à partir du protocole de Kobayashi *et al.* [152]. Brièvement, après anesthésie du rat à l'isoflurane, une incision thoracique était pratiquée afin d'exposer le cœur et les poumons. L'aorte et les artères pulmonaires étaient alors isolées et immergées dans une solution de « dulbecco's modified eagle's medium » (DMEM, Lonza, Walkersville, Etats-Unis) contenant 20 % de sérum de veau fœtal (SVF, Lonza). Une canule de 19 gauges était alors insérée et attachée au niveau proximal de chaque artère afin de permettre le lavage de la lumière artérielle avec du DMEM. Le niveau distal était alors ligaturé et une solution de collagénase de type II (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) à 2 mg/ml était perfusée. Après 45 minutes d'incubation à 37°C , les CE étaient décollées avec une solution de DMEM/20 % SVF. Les cellules CE étaient alors récupérées par centrifugation (1.200 *g*, 5 minutes) et le culot resuspendu dans une solution de DMEM/20 % SVF.

Culture cellulaire

Les cellules étaient ensuite cultivées dans un puits de 9,6 cm² (Corning Incorporated, New-York, Etats-Unis), et après 2 heures d'incubation à 37°C, le milieu était remplacé par le milieu de culture « endothelial basal cell medium-2 »/5 % SVF (EBM-2, Lonza). Le milieu de culture a été changé tous les deux jours. Une fois à confluence, les cellules étaient repiquées dans une flask de 75 cm² (Corning Incorporated) pour les amplifier jusqu'au 5^{ème} passage. Les cellules étaientensemencées à 10.000 cellules par cm².

Vérification du phénotype endothélial

Le phénotype endothélial a été vérifié en utilisant les lipoprotéines de basse densité acétylées couplées au 1,1'-dioctadecyl-3,3',3'-tetraméthyl-indocarbocyanine perchlorate (Dil-Ac-LDL) (Harbor Bio-products, Norwood, Etats-Unis). Puisque seules les CEs sont perméables aux Ac-LDL, l'identification des CEs est basée sur leur capacité d'absorption des Ac-LDL. Ainsi, les cellules ont été incubées en absence ou en présence de Dil-Ac-LDL (10 µg/ml) pendant 3 heures à 37°C. Les cellules étaient ensuite traitées avec de la trypsine (Lonza) puis centrifugées afin d'être analysées au cytomètre en flux. En moyenne, 95 % des cellules isolées correspondaient à des CEs.

Traitement des cellules

Les cellules (5.10⁴ cellules/cm²) ont été traitées pendant 24 heures à la concentration circulante de MPs retrouvée pour chaque groupe d'animaux et déterminée par cytométrie en flux.

2. Cytométrie en flux

Principe

La cytométrie en flux permet l'énumération et l'analyse de particules en suspension dans un milieu liquide. Elle est généralement appliquée à des cellules, mais elle est une méthode de référence au laboratoire pour la quantification et le phénotypage des MPs. Cette technique consiste à faire défiler très rapidement (plusieurs centaines/seconde), les MPs en suspension devant un faisceau laser. Pour chaque MP sont mesurées : la fluorescence émise à diverse

longueurs d'ondes et la lumière diffusée, recueillie dans deux directions différentes. On peut ainsi calculer le nombre total de MPs et le pourcentage de MPs marquées.

Dispositif expérimental

Le phénotypage de MPs a été réalisé à partir du PPP suivant l'expression des antigènes membranaires spécifiques. Pour cela, 8 µl de plasma étaient incubés en présence d'un anticorps (1 ng/µl) dirigé contre l'antigène CD61 couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (BioLegend, San Diego, Etats-Unis), CD45 couplé au FITC (BioLegend), CD54 couplé à la biotine (BioLegend) ou erythroid couplé à la biotine (BD Biosciences) respectivement pour l'identification de l'origine plaquettaire, leucocytaire, endothéliale ou érythrocytaire. Pour les anticorps couplés à la biotine, un marquage secondaire avec la streptavidine couplée au FITC (Rockland, Gilbertsville, Etats-Unis) était réalisé. Des anticorps isotypiques contrôles ont été utilisés pour déterminer le marquage aspécifique pour chaque anticorps. Après 45 minutes d'incubation, 8 µl de billes Flow-count (Beckman Coulter, Roissy, France) étaient ajoutées pour quantifier la concentration de MPs dans chaque échantillon. Cela permettait de déterminer la concentration circulante en MPs pour chaque groupe de rat. Les échantillons (10.000 événements) étaient ensuite analysés au cytomètre en flux (Beckman Coulter).

3. Western Blot

Extraction des protéines

Après le traitement par les MPs, les cellules étaient lavées au « phosphate buffer saline » (PBS), puis traitées par du tampon de lyse de composition suivante : 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.8 % Nonidet P-40, pH = 7.8, 40 µl d'antiprotéase pendant 20 minutes sur la glace. Le lysat était récupéré et placé dans des eppendorfs. Le lysat était centrifugé (15.000 *g*, 10 minutes, 4°C) et le surnageant contenant les protéines conservé à -80°C.

La mesure de la concentration protéique de ces échantillons a été faite à partir d'une gamme de concentrations croissantes d'albumine sérique bovine (BSA) (0, 0.2, 0.5, 0.8, 1, 1.5 et 2 mg/ml) selon la méthode de Lowry *et al.* [153] sur plaque 96 puits et mesurées au spectrophotomètre (Biotek, Winooski, Etats-Unis) à la longueur d'onde de 575 nm. Les protéines étaient ensuite dénaturées par incubation dans le tampon contenant du NuPAGE®

LDS Sample Buffer et NuPAGE® Reducing Agent (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis), 10 minutes à 70°C.

Migration sur gel et transfert sur membrane

Trente microgrammes de protéines étaient déposés sur des gels précoulés NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini gels (Invitrogen). L'électrophorèse permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Les protéines sont dénaturées dans un tampon fortement chargé négativement, afin de neutraliser les charges propre de la protéine. La migration des protéines dénaturées dépend alors uniquement de la longueur de la chaîne protéique et elles se répartiront uniquement en fonction de leur poids moléculaire. La migration était réalisée dans une cuve d'électrophorèse (Invitrogen) sous un voltage constant de 150 V et un ampérage variant de 100-125 mA au début à 60-80 mA en fin de migration pendant 70 minutes selon les instructions du fabricant. Les gels étaient ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose ayant des pores de 0.2 µm dans une cuve de transfert verticale (BioRad, Hercules, Etats-Unis). Le transfert des protéines du gel vers la membrane s'effectuait sous une tension constante de 100 V pendant 2 heures à 4°C.

Marquage immunologique et révélation

A la fin du transfert, les membranes étaient rincées, trois fois 10 minutes dans un tampon TBS-Tween (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.1 % Tween-20) à température ambiante, puis incubées 90 minutes à température ambiante dans le tampon TBS-Tween contenant 5 % de BSA afin de saturer les sites de liaison non spécifiques des anticorps. Les membranes étaient ensuite exposées toute la nuit à 4°C, ou 2 heures à température ambiante avec l'un des anticorps primaires dilués dans le tampon TBS-Tween contenant 5 % de BSA (Tableau 5, Annexes). Après trois lavages de 10 minutes dans le tampon TBS-Tween, les membranes étaient incubées 90 minutes avec un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase de Raifort. Les membranes ont été également strippées et l'expression de la β-actine a été évaluée en utilisant un premier anticorps spécifique contre la β-actine suivi d'un anticorps conjugué à une peroxydase. L'immunoréactivité était révélée par un kit de détection (Santa Cruz Technology, Santa Cruz, Etats-Unis), avec production de luminol, visualisée et quantifiée, en chambre noire. La quantification s'effectuait par analyse densitométrique par

rapport à l'expression de l'actine ou de la protéine totale à l'aide du logiciel Image Reader Las-3000 (Fujifilm, Tokyo, Japon).

4. Dosage des radicaux libres par résonnance paramagnétique électronique

Principe

La résonnance paramagnétique électronique (RPE) est une technique spectroscopique permettant d'étudier des molécules ou des ions possédant un ou plusieurs électrons non appariés. Le paramagnétisme résultant de la résonnance du spin électronique de l'électron électronique est à la base de la détection par la RPE. L'échantillon à analyser est placé dans une cavité située au centre d'un champ magnétique externe et soumis à un champ magnétique oscillant [154].

Protocole

Dosage de la production de monoxyde d'azote

Pour mesurer le radical NO, nous avons utilisé le capteur de spin, le diéthylthiocarbamate de fer $\text{Fe}(\text{DETC})_2$, qui forme le complexe $\text{NO-Fe}(\text{DETC})_2$ dont les propriétés paramagnétiques sont détectables par RPE. Les cellules étaient mises en culture dans une plaque 6 puits en absence ou en présence des MPs pendant 24 heures, puis elles étaient récoltées et incubées pendant 45 minutes à 37°C en présence d'un tampon d'incubation (5 mM HEPES, 1 mM L-Arginine, 3 mM CaCl_2 , 0,3 M BSA, pH 7,4). Les cellules étaient ensuite incubées dans les mêmes conditions (37°C, 45 minutes) avec le capteur de spin, diéthylthiocarbamate (DETC, 1,5 mM) en présence de FeSO_4 . Les échantillons étaient ensuite congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

Dosage de la production d'anion superoxide

Les cellules étaient mises en culture dans une plaque 6 puits en absence ou en présence des MPs pendant 24 heures, puis elles étaient récoltées et incubées pendant 45 minutes à 37°C en présence d'un tampon d'incubation Krebs-Hepes contenant du 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine (CMH, Noxygen, Mainz, Allemagne) (10 mM), de la deferoxamine (25 μM) et du DETC (5 μM). La réaction a été stoppée en déposant les échantillons pendant 5 minutes à 4°C. Les échantillons étaient ensuite congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

L'analyse était réalisée à l'aide d'un spectromètre Miniscope MS 200 (Magnetech, Berlin, Allemagne). Les enregistrements ont été faits à 77°K, en utilisant un vase Dewar. L'instrumentation a été calibrée à 10 mW du pouvoir des micro-ondes, à 1mT de modulation d'amplitude, à 100 kHz de la fréquence de modulation avec un temps d'enregistrement d'un spectre de 100 secondes répété 4 fois de suite. La quantité de NO et d'O₂⁻ mesurée était exprimée en unités arbitraires d'absorbance par microgramme de protéine par microlitre. La quantité de protéines dans chaque échantillon était mesurée par dosage colorimétrique de Lowry et déterminé au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 575 nm.

5. Dosage de l'activité de la xanthine oxydase

Après incubation avec les MPs, les CEs d'artères pulmonaires ont été lysées et l'activité de la xanthine oxydase a été mesurée grâce à un kit adapté (BioVision Research Products, Mountain View, Californie). L'activité de la xanthine oxydase a été exprimée en mU/mg de protéine, avec une unité de xanthine oxydase définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse l'oxydation de la xanthine en peroxyde d'hydrogène par minute à 25°C.

6. Réactivité vasculaire

La contraction isométrique a été mesurée dans les aortes et les artères extra-pulmonaires de rats injectés ou non avec des MPs à la concentration circulante déterminée dans le plasma des rats. Nous avons alors pesé chaque rat pour déterminer le volume sanguin et la quantité de MPs à injecter. En effet un rat Wistar male possède 6,4 ml de sang pour 100 g de poids [155]. Vingt-quatre heures après l'injection, des anneaux d'aortes ou d'artères pulmonaires d'environ 2 mm ont été isolés et montés dans des cuves à organe isolé d'un myographe Mulvany (Danish Myo Technology, Aarhus, Danemark) contenant la solution de Krebs adaptée à 37°C, équilibrée avec un mélange carbogène (95 % O₂, 5 % CO₂, pH = 7,4) (Tableau 6, Annexes).

Au début de chaque expérience, les anneaux étaient équilibrés contre une charge de 2 g pour les aortes et 1 g pour les artères pulmonaires. Des études préalables ont montré que ces valeurs de charge étiraient les anneaux à leur longueur maximale, c'est à dire la longueur pour laquelle la contraction isométrique développée était maximale après stimulation avec une solution riche en potassium [156,157]. L'équilibrage de cette charge durait environ 1 heure au cours de laquelle la solution de Krebs était changée toutes les 15 minutes. A la fin de

l'équilibration, les anneaux étaient stimulés deux fois par une solution riche en potassium pour éliminer les effets de l'hystérésis. La fonctionnalité de l'endothélium était ensuite vérifiée par la présence d'effet relaxant de l'acétylcholine (1 μ M) pour l'aorte ou du carbachol (1 μ M) pour les artères pulmonaires après une pré-contraction des anneaux à la phényléphrine (1 μ M). Des courbes concentrations cumulative-réponses aux agonistes ont ensuite été construites.

7. Analyse statistique

Les résultats ont été exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM) de n observations indépendantes. Les données ont été ensuite analysées par le test non paramétrique de Mann-Whitney.

Les comparaisons statistiques entre les courbes concentrations cumulatives-réponse ont été réalisées avec une analyse globale de la variance (ANOVA), suivi d'un test post hoc de Bonferroni. Dans les cas où l'ANOVA montre une différence significative des courbes, il a été réalisé un test Mann-Whitney sur les valeurs de l'effet maximal (E_{max}) et de pD_2 .

$pD_2 = -\log EC_{50}$, EC_{50} étant la concentration molaire d'agoniste qui produit 50 % de l'effet maximal.

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel GrapPad Prism (GrapPad Software, San Diego, Etats-Unis). Les différences sont considérées comme significative lorsque $P < 0,05$ quelque soit le test statistique employé.

III. Résultats

Taux circulants et origines cellulaires des MPs

Les résultats obtenus du dosage de MPs réalisé par cytométrie en flux montrent que le taux circulant de MPs chez les rats hypoxiques est le double que celui de rats normoxiques (1568 ± 174 versus 852 ± 80 MPs/ μ l de plasma ; $p < 0.01$) (Figure 22 A). Ces concentrations ont été utilisées pour la suite de nos expériences.

De plus, le phénotypage de ces MPs a montré que les MPs circulantes sont principalement d'origine plaquettaire ($CD61^+$) (87 ± 2 % et 85 ± 4 % chez les rats hypoxiques et normoxiques, respectivement) et érythrocytaires (7 ± 2 % et 7 ± 1 % chez les rats hypoxiques et normoxiques, respectivement). Les MPs d'origine leucocytaire ($CD45^+$) et celles issues des CEs ($CD54^+$) ne dépassent pas le taux de 3 % dans les deux groupes. Enfin, nous avons remarqué que les taux de MPs plaquettaires et érythrocytaires, et non ceux d'origines leucocytaires et endothéliales sont plus élevés chez les rats hypoxiques par rapport aux rats normoxiques (Figure 22 B-E).

Bien que les artères pulmonaires soient les vaisseaux les plus atteints dans l'HTAP, la circulation systémique peut également être affectée [158]. C'est pour cela que dans cette étude nous avons isolé deux types cellulaires représentatifs de ces deux circulations : les cellules endothéliales d'aortes de rats et les cellules endothéliales d'artères pulmonaires de rats que nous avons traitées par les MPs à la concentration circulante déterminée par cytométrie en flux.

Implication des MPs dans la production de NO

La production de NO étant un des éléments clés de la fonction endothéliale, nous avons commencé par l'évaluer par RPE. Pour plus de clarté, nous distinguerons les effets sur les deux types cellulaires.

Le traitement des CEs d'aorte avec les MPs montre que les MPs issues de rats normoxiques ne modifient pas la production de NO. Cependant, les MPs issues de rats hypoxiques réduisent la production de NO de 45% (Figure 23 A). A la lumière de ces résultats, nous nous sommes alors intéressés à l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans cette diminution de production de NO. Nous avons alors étudié par Western blot l'expression et l'activation de la eNOS, enzyme responsable de la biosynthèse du NO dans les CEs. Dans les

CEs d'aorte de rat, le traitement avec les MPs n'induit pas de changement dans l'expression de la eNOS. Cependant, le traitement par les MPs hypoxiques induit une augmentation de la phosphorylation de la eNOS sur son site inhibiteur (Thr 495), ainsi qu'une diminution significative de la phosphorylation de la eNOS sur son site activateur (Ser 1177) (Figure 23 B-C). De plus, les MPs hypoxiques entraînent une diminution de la phosphorylation de l'Akt sur la Ser 473, kinase impliquée dans la phosphorylation de la eNOS et ainsi de son activation (Figure 23 D). En revanche, aucun effet n'a été observé concernant l'expression de la cavéoline-1, protéine régulatrice de la eNOS (Figure 23 E).

Dans les CEs d'artères pulmonaires nous retrouvons sensiblement le même schéma, à savoir une diminution de 20% de la production de NO uniquement par les MPs hypoxiques (Figure 24 A). De plus, nous n'avons pas observé de modification dans l'expression de la eNOS, alors que seules les MPs hypoxiques sont capables de diminuer son activation. En effet le traitement par les MPs hypoxiques induit une augmentation de la phosphorylation de la eNOS sur son site inhibiteur et une diminution de la phosphorylation sur son site activateur (Figure 24 B-C). En revanche, contrairement aux CEs d'aorte, nous n'avons pas observé de changement dans l'état d'activation d'Akt par les différents traitements (Figure 24 D). De plus l'expression de la cavéoline-1 est diminuée par le traitement par les MPs hypoxiques (Figure 24 E). Ces données suggèrent ainsi que le mécanisme de diminution de production de NO diffère dans les deux types cellulaires.

Implication des MPs dans la production d'O₂⁻

Un autre aspect prépondérant dans la fonction endothéliale concerne le stress oxydant. Nous avons donc mesuré par RPE la production d'O₂⁻ par les CEs traitées par les MPs.

La figure 24 nous montre que les MPs d'origine normoxique ne modifient pas la production d'O₂⁻ par les CEs. En revanche, bien que les MPs hypoxiques ne modifient pas la production d'O₂⁻ par les CEs d'aorte (Figure 25 A), nous pouvons observer que dans les CEs d'artère pulmonaire, les MPs hypoxiques augmentent d'environ 36 % la production d'O₂⁻ (Figure 25 B). Ces données soulignent à nouveau une différence entre les deux types cellulaires.

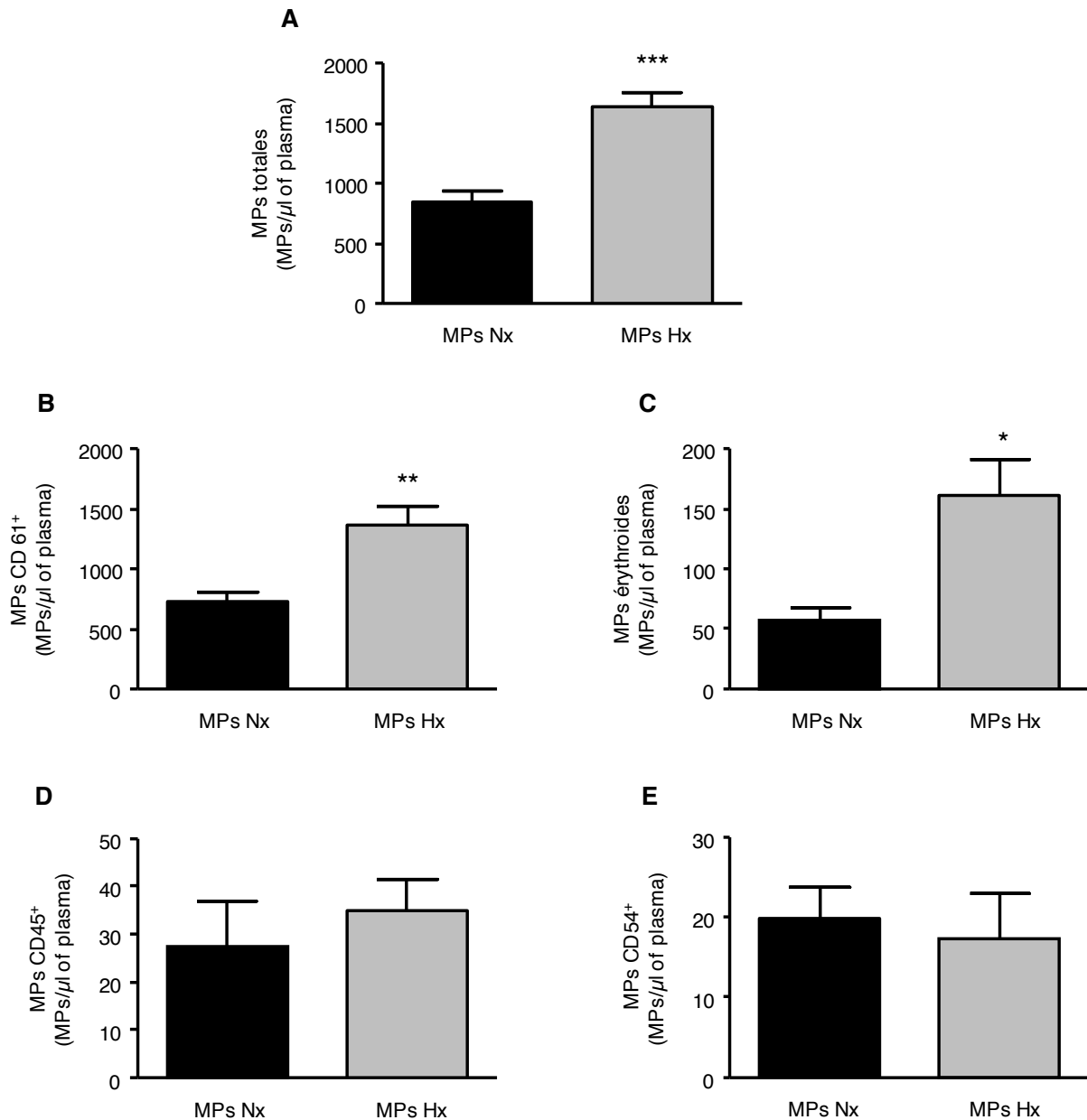


Figure 22 : Taux circulants de microparticules chez les rats normoxiques et hypoxiques.

Les histogrammes montrent le taux total de MPs circulantes (A) et l'origine des différentes populations de MPs: plaquettaire (CD61⁺, B), érythrocytaire (Erythroïdes, C), leucocytaire (CD45⁺, D) et endothéliale (CD54⁺, E) issues des rats normoxiques (MPs Nx, $n=15$) et des rats hypoxiques (MPs Hx, $n=22$). Les résultats sont exprimés en nombre de MPs/ μ L de plasma. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ et *** $P<0.001$.

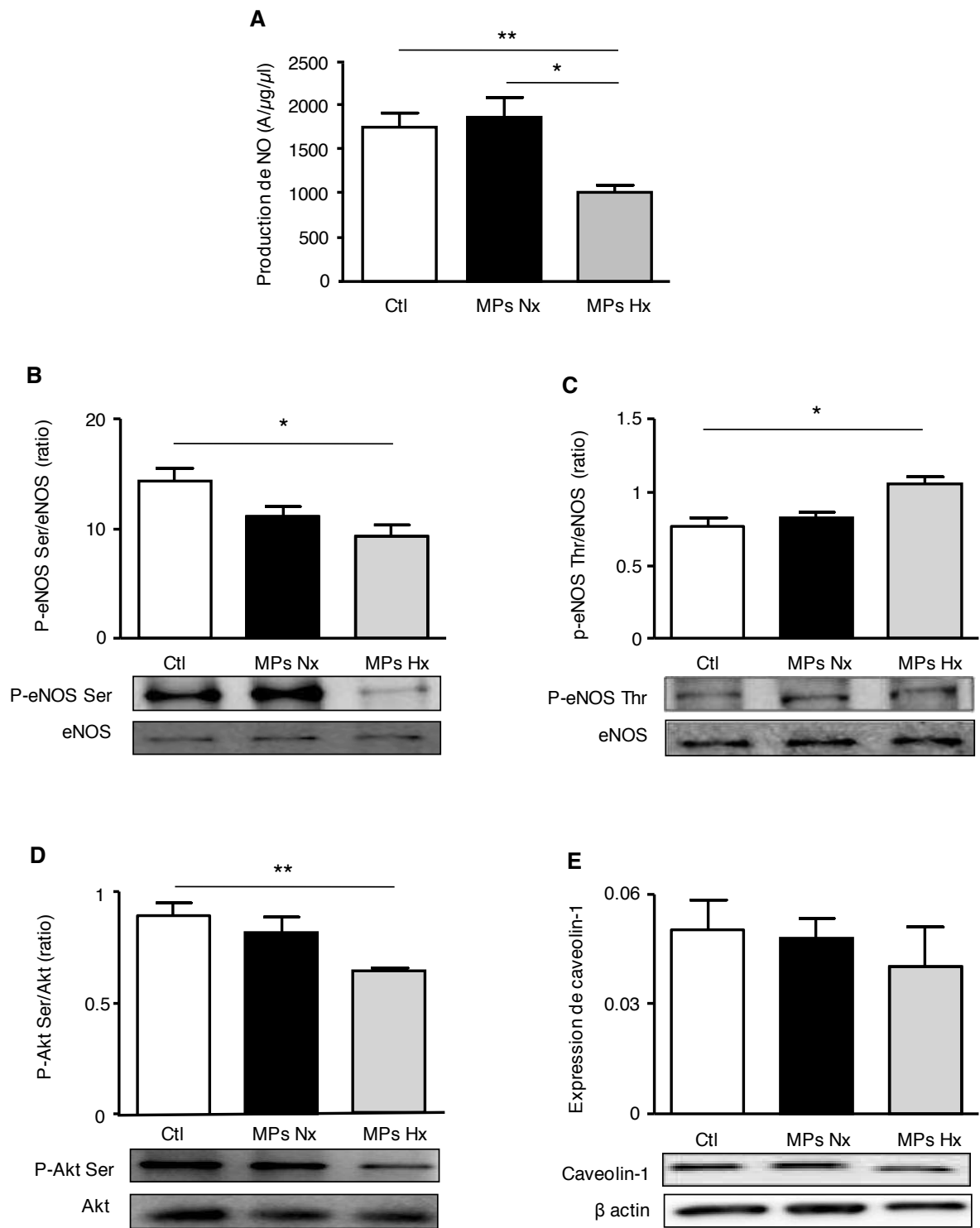


Figure 23 : Les microparticules issues des rats hypoxiques diminuent la production de NO dans les cellules endothéliales d'aorte.

Les cellules ont été incubées pendant 24 heures en absence (Ctl) ou en présence des MPs issues des rats normoxiques (MPs Nx) ou hypoxiques (MPs Hx). Quantification de l'amplitude du signal NO-Fe(DETC)₂ dans les CEs d'aorte (A). Les valeurs sont exprimés en amplitude/μg/μL de protéines (*n*=8-9). Les histogrammes montrent le ratio de la phosphorylation de l'eNOS Ser 1177 (B) et eNOS Thr 495 (C) *vs* l'eNOS totale (D), phospho-Akt Ser 473 (D) *vs* Akt totale et l'expression de la cavéoline-1 (E). Les immunoblots sont quantifiés par analyse densitométriques et normalisés soit sur la forme totale de la protéine correspondante soit sur la β actine (*n*=6-8). * *P*<0.05 et ***P*<0.01.

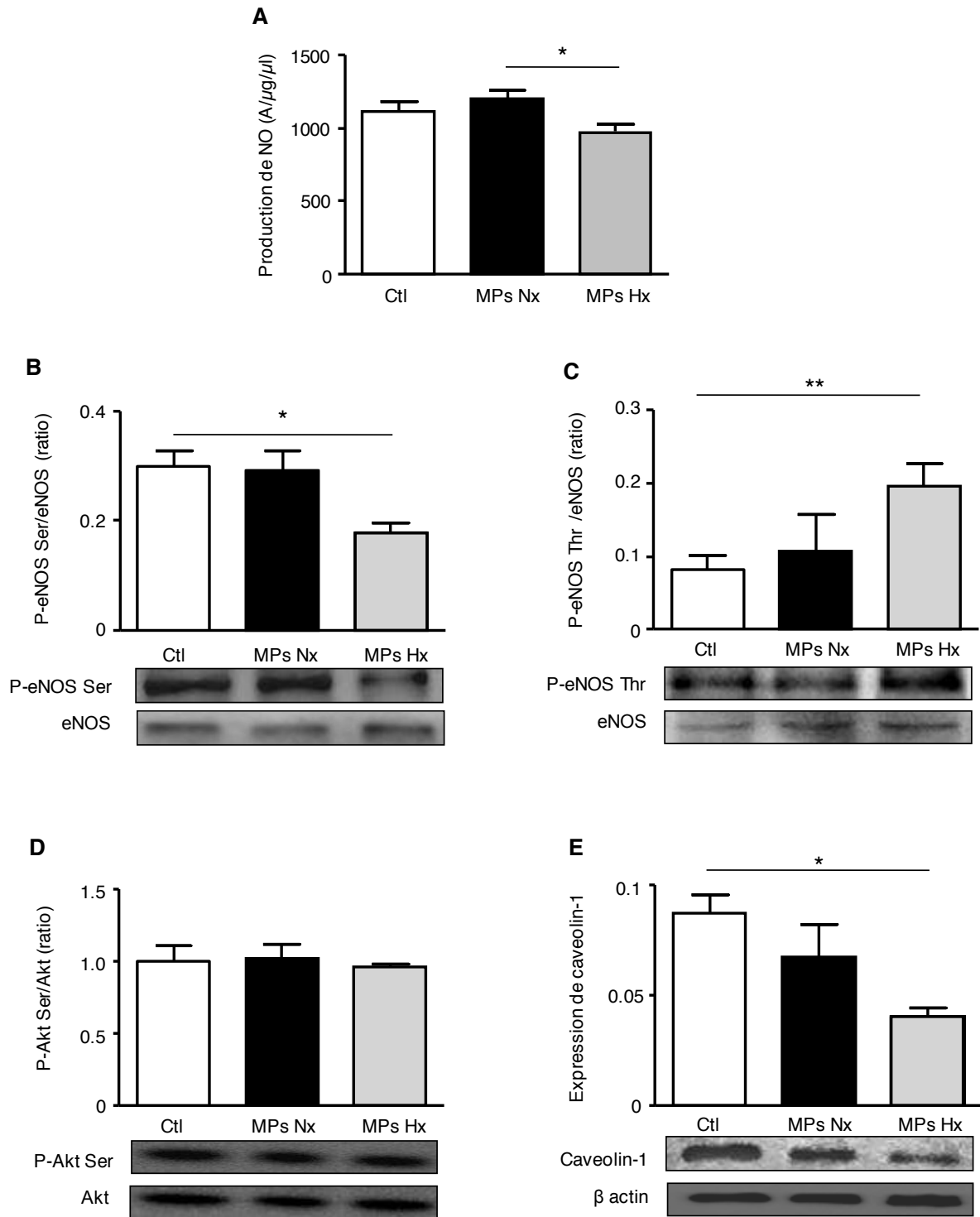


Figure 24 : Les microparticules issues des rats hypoxiques diminuent la production de NO dans les cellules endothéliales d'artère pulmonaire.

Les cellules ont été incubées pendant 24 heures en absence (Ctl) ou en présence des MPs issues des rats normoxiques (MPs Nx) ou hypoxiques (MPs Hx). Quantification de l'amplitude du signal NO-Fe(DETC)₂ dans les CE d'artère pulmonaire (A). Les valeurs sont exprimés en amplitude/ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de protéines ($n=8-9$). Les histogrammes montrent le ratio de la phosphorylation de l'eNOS Ser 1177 (B) et eNOS Thr 495 (C) *vs* l'eNOS totale (D), phospho-Akt Ser 473 (D) *vs* Akt totale et l'expression de la cavéoline-1 (E). Les immunoblots sont quantifiés par analyse densitométriques et normalisés soit sur la forme totale de la protéine correspondante soit sur la β actine ($n=6-8$). * $P<0.05$ et ** $P<0.01$.

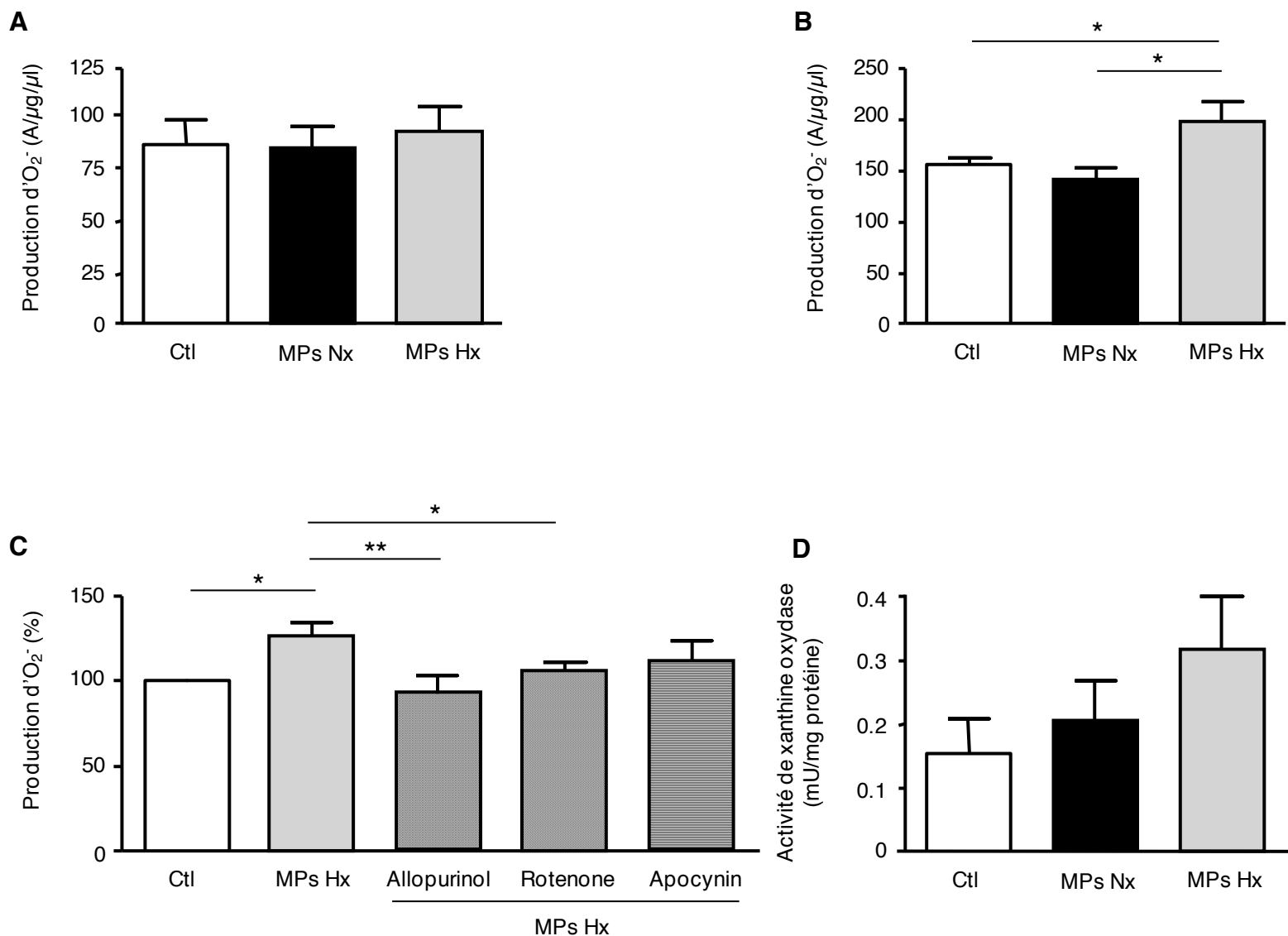


Figure 25 : Les microparticules de rats hypoxiques diminuent la production d'O₂⁻ uniquement dans les cellules endothéliales d'artère pulmonaires.

Les cellules ont été incubées pendant 24 heures en absence (Ctl) ou en présence des MPs issues des rats normoxiques (MPs Nx) ou hypoxiques (MPs Hx). Mesure de la production d'O₂⁻ dans les CE d'aorte (A) ou d'artère pulmonaire (B). Pour déterminer l'origine de l'augmentation d'O₂⁻ dans les CE d'artère pulmonaire, les cellules ont été prétraitées pendant 45 minutes avec l'allopurinol (50 μM), la roténone (5 μM) ou l'apocynine (100 μM) puis pendant 24 heures par les MPs hypoxiques (C). Les données sont exprimées en amplitude/μg/μL de protéines par échantillon (A et B) ou en amplitude/μg/μL de protéines par échantillon normalisé par rapport au Ctl (C) (*n* = 8-12). Après 24 heures d'incubation des cellules avec les MPs, les protéines sont extraites et l'activité de la xanthine oxydase est mesurée. Les données sont exprimées en mUnité/mg de protéines par échantillon (*n* = 7). * *P*<0.05 et ***P*<0.01.

Nous avons alors voulu déterminer la source de cette production d'ERO. Les CEs d'artère pulmonaire traitées par les MPs hypoxiques ont donc été pré-incubées en présence d'inhibiteur de la xanthine oxydase (allopurinol), du complexe I de la mitochondrie (roténone) et de la NADPH oxydase (apocynine), trois sources d'ERO connues pour être altérées dans l'HTAP. Seules l'allopurinol et la roténone ont la capacité de diminuer la production d'ERO induite par les MPs hypoxiques (Figure 25 C). L'apocynine ne modifie pas significativement cette production, et nous n'avons pas observé de changement dans l'expression de gp91, sous unité catalytique de la NADPH oxydase (donnée non montrée). La quantification de l'activité de la xanthine oxydase conforte ces résultats et montre que seul le traitement par les MPs hypoxiques est capable d'augmenter cette activité (Figure 25 D).

Implication des MPs dans la fonction vasculaire *ex vivo*

Pour analyser la pertinence physiopathologique de l'effet des MPs hypoxiques, les rats ont reçu une injection de MPs à la concentration circulante déterminée. Il est à noter que l'injection des MPs n'induit pas de changement dans la PAP moyenne au bout de 24 heures par rapport aux rats normoxiques.

Pour analyser la relaxation dépendante de l'endothélium, l'étude de la réponse à des concentrations croissantes d'acétylcholine pour l'aorte, ou de carbachol pour l'artère pulmonaire a été réalisée. L'injection de MPs hypoxiques induit un déplacement vers la droite de la courbe concentration-réponse dans l'aorte (pD2 : $7,35 \pm 0,04$ vs $6,72 \pm 0,04$; normoxique vs MPs hypoxiques) (Figure 26 A) et également dans l'artère pulmonaire (pD2 : $7,59 \pm 0,04$ vs $6,66 \pm 0,05$; normoxique vs MPs hypoxiques) (Figure 26 B), sans changement de l'effet maximal. Par ailleurs lorsque l'on mesure la production de NO dans l'aorte, celle-ci semble être altérée par le traitement aux MPs hypoxiques (Figure 26 C). Pour vérifier si cet effet était dû à une différence qualitative entre la composition des MPs ou juste dû à une augmentation du taux de MPs, nous avons injecté deux fois plus de MPs normoxiques dans le but d'avoir la même quantité que les MPs hypoxiques et réalisé les expériences de relaxation sur les artères pulmonaires, lit vasculaire qui semble le plus atteint. Seulement l'injection de MPs hypoxiques conduit à un déplacement vers la droite de la courbe concentration-réponse au carbachol comparé à la double quantité de MPs normoxiques (pD2 : $7,16 \pm 0,04$) (Figure 26 B). Ces résultats suggèrent que l'effet des MPs est principalement dû à une différence qualitative dans la composition des MPs.

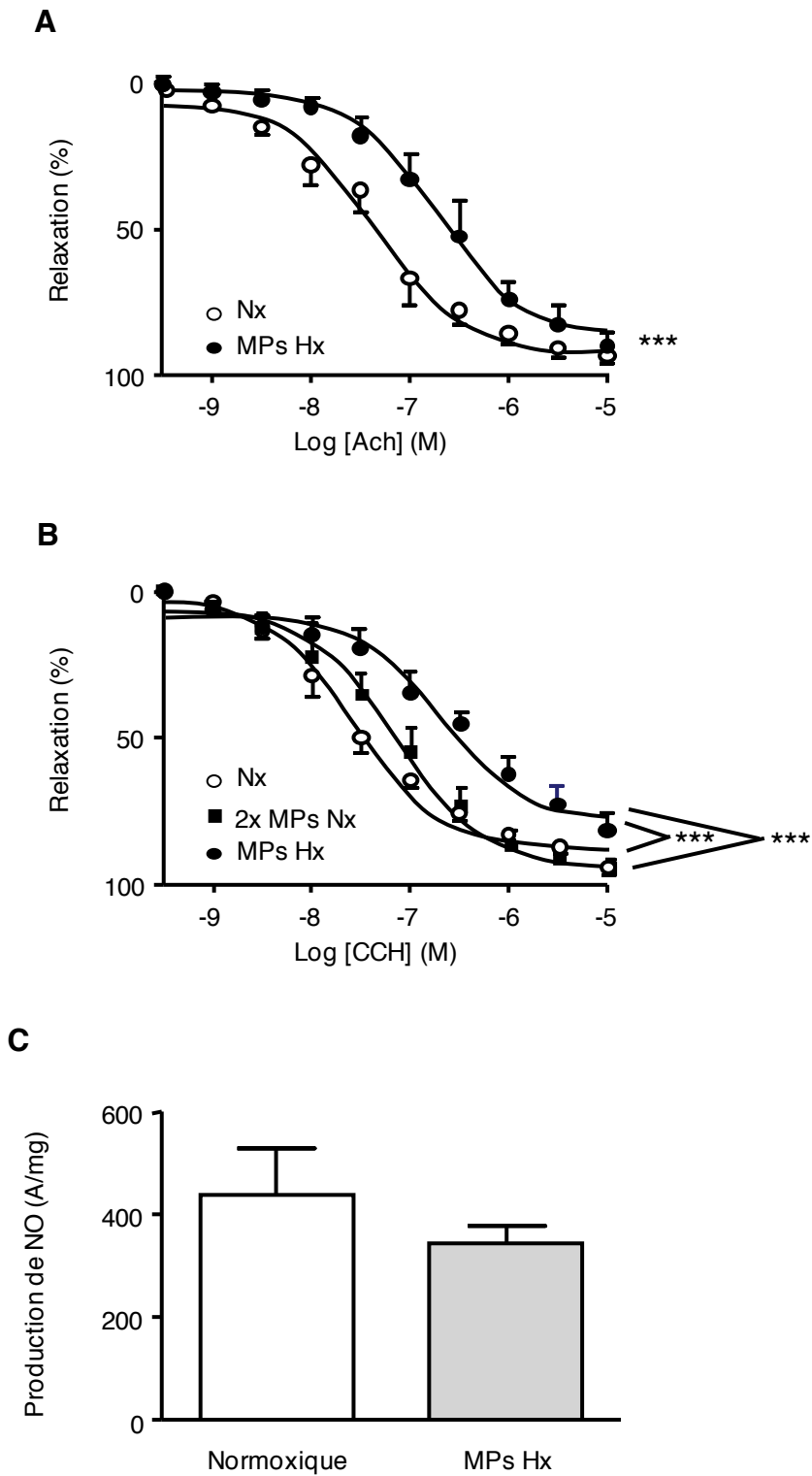


Figure 26 : Les microparticules hypoxiques diminue la relaxation dépendante de l'endothélium.

L'acétylcholine induit une relaxation de l'aorte chez les rats normoxique (Nx) ou injectées par des MPs hypoxiques (MPs Hx) (A). Le carbachol induit une relaxation de l'artère pulmonaire chez les rats Nx, injectées par une double quantité de MPs Nx, ou par des MPs Hx (B). Les résultats sont exprimés en pourcentage de précontraction à la phényléphrine. Production de NO par l'aorte exprimée en amplitude/mg de poids sec (C) ($n=4$). *** $P<0.001$.

La réactivité des vaisseaux aux agonistes vasoconstricteurs a également été étudiée. La phényléphrine induit une contraction dépendante de la concentration des aortes et des artères pulmonaires des rats normoxiques ou traités par les MPs hypoxiques. Les vaisseaux traités par les MPs hypoxiques présentent un déplacement de la courbe vers la droite dans l'aorte (pD_2 : $6,92 \pm 0,02$ *vs* $6,52 \pm 0,03$; normoxique *vs* MPs hypoxiques) (Figure 27 A) et également dans l'artère pulmonaire (pD_2 : $7,99 \pm 0,03$ *vs* $7,28 \pm 0,05$; normoxique *vs* MPs hypoxiques) (Figure 27 B) ainsi qu'une diminution de l'effet maximal dans l'aorte (E_{max} : $8,27 \pm 0,07$ *vs* $6,21 \pm 0,08$; normoxique *vs* MPs hypoxiques) et dans l'artère pulmonaire (E_{max} : $2,77 \pm 0,02$ *vs* $1,80 \pm 0,03$; normoxique *vs* MPs hypoxiques). Cependant cette hypo-réactivité est dépendante de l'agoniste. En effet, la 5-HT induit une contraction dépendante de la concentration des artères pulmonaires similaire chez les rats normoxiques ou traités par les MPs hypoxiques, alors que nous observons dans l'aorte une augmentation de l'effet maximal dans les animaux traités par les MPs hypoxiques (E_{max} : $8,72 \pm 0,02$ *vs* $12,6 \pm 0,03$; normoxique *vs* MPs hypoxiques) (Figure 27 C-D). Par ailleurs, la réponse au potassium est identique dans l'aorte, alors que les artères pulmonaires des animaux traités présentent une diminution significative de cette réponse (Figure 27 E).

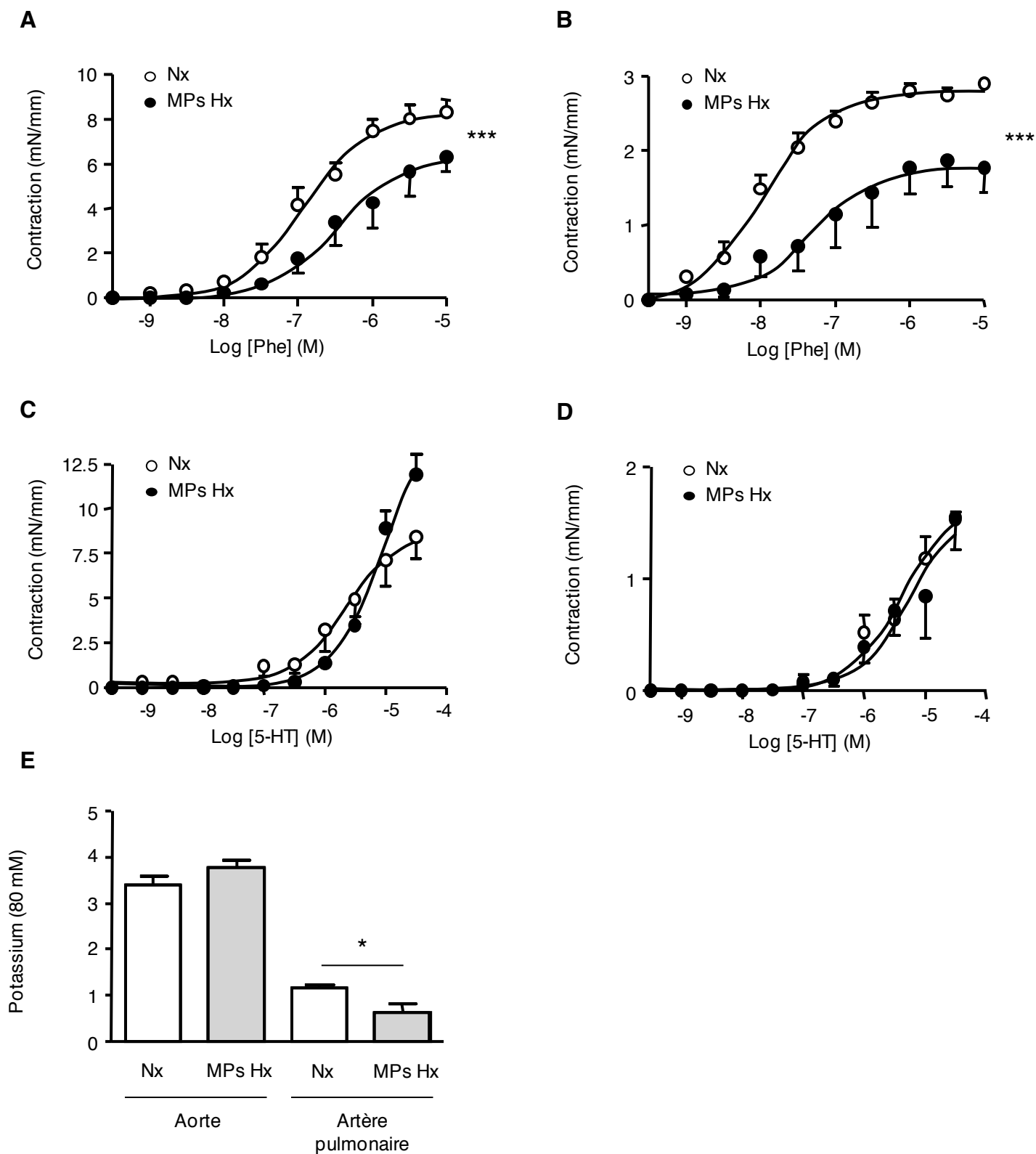


Figure 27 : Réactivité vasculaire chez les rats normoxiques et injectés par les microparticules hypoxiques.

La phényléphrine (Phe) induit une contraction de l'aorte chez les rats normoxique (Nx) ou injectées par des MPs hypoxiques (MPs Hx) de l'aorte (A) et de l'artère pulmonaire (B). La sérotonine (5-HT) induit une contraction de l'aorte chez les rats Nx ou injectées par des MPs Hx de l'aorte (C) et de l'artère pulmonaire (D). Réponse contractile à une solution hyperpotassique de l'aorte et de l'artère pulmonaire de rats Nx ou injectées par des MPs Hx ($n=4$). * $P<0.05$ et *** $P<0.001$.

IV. Discussion

L'objectif général de ce travail était d'acquérir des informations sur le rôle des MPs issues des rats hypoxiques afin d'évaluer leurs effets potentiels dans la fonction vasculaire lors de l'HTAP. Afin de déterminer l'impact des MPs *in vitro*, nous avons mis au point au laboratoire une technique permettant d'isoler les CEs d'aorte ou d'artère pulmonaire, puis nous avons injecté ces MPs dans des rats pour évaluer leur pertinence physiopathologique *in vivo*.

Dans cette étude, le taux circulant de MPs est plus élevé chez les rats hypoxiques que chez les rats normoxiques, et les MPs hypoxiques sont majoritairement d'origine plaquettaire et érythrocytaire. Les principaux résultats montrent que les MPs hypoxiques ont des effets différents selon le territoire vasculaire étudié. Ainsi, dans la circulation systémique, les MPs hypoxiques entraînent une diminution de la production de NO par réduction de l'activité de la eNOS, sans modification du stress oxydant. Tandis qu'au niveau pulmonaire, les MPs hypoxiques, en plus de diminuer la production de NO, augmentent le stress oxydant par un mécanisme sensible à l'allopurinol et à la roténone. L'ensemble de ces résultats soulignent bien un effet délétère des MPs hypoxiques spécifique au territoire vasculaire pulmonaire en termes de stress oxydant. Par ailleurs, l'injection de MPs hypoxiques diminue la relaxation dépendante de l'endothélium à la fois dans l'aorte et dans l'artère pulmonaire, et affecte la contraction vasculaire de façon dépendante de l'agoniste.

Un taux élevé de MPs est retrouvé chez les patients atteints d'HTAP, mais des différences sont retrouvées au niveau de l'origine phénotypique. Ainsi, un taux élevés de MPs endothéliales et leucocytaires a été retrouvés par le groupe d'Amabile [124], alors que celui de Bakouboula a montré une élévation des MPs procoagulantes [125]. Récemment, Diehl *et al.* ont remarqué que les MPs d'origines plaquettaires, endothéliales et leucocytaires étaient augmentées chez ces patients [159]. Ici, nous avons montré dans modèle animal d'HTAP hypoxique une augmentation du taux de MPs, mais que celles-ci étaient principalement d'origines plaquettaires et érythrocytaires. Ces différences observées peuvent s'expliquer par l'utilisation de cohortes de patients très hétérogènes et ne ressemblant pas exactement à une HTAP hypoxique. Par ailleurs, différentes méthodes de centrifugation ainsi que différents marqueurs membranaires pour identifier les MPs ont été utilisés pour l'isolation et la caractérisation des MPs, un consensus international sur ces méthodes n'existant pas encore à l'heure actuelle. De plus, étant donné que les rats hypoxiques présentent un hémocrite plus élevé que les rats normoxiques [151], cette augmentation de cellules sanguines pourrait

expliquer l'augmentation du taux de MPs totales et notamment le taux de MPs érythrocytaires. Cependant, les taux de MPs d'origine leucocytaires ou endothéliales n'augmentent pas, suggérant que l'augmentation du taux de MPs plaquettaires et érythrocytaires est spécifique de ces populations. Enfin, nous avons montré que seules les MPs hypoxiques étaient capables d'induire une dysfonction endothéliale des artères pulmonaires indiquant que les effets des MPs étaient indépendants de leur quantité, mais plutôt de leurs probables compositions et origines différentes.

Dans la majorité des maladies cardio-vasculaires, la paroi artérielle voit ses possibilités de sécrétion des facteurs relaxants diminuer, tandis que ses capacités de libération de facteurs contracturants restent inchangées ou augmentées. Le déséquilibre endothélial lié à la réduction de la synthèse du NO dépendante de la eNOS peut retentir non seulement sur le tonus vasomoteur, mais aussi sur l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. La dysfonction endothéliale devient dès lors un des éléments primordiaux des maladies vasculaires. Une exposition prolongée à l'hypoxie diminue ainsi l'expression de la eNOS au niveau de l'aorte et diminue la relaxation dépendante de l'endothélium à l'acétylcholine [160]. Le rôle de la eNOS dans la pathogénèse de l'HTAP est très bien documenté ; une surproduction de la eNOS dans des souris transgéniques prévient l'HTAP induite par l'hypoxie [161], alors que les souris déficientes pour la eNOS développent une sévère HTAP dans des conditions d'hypoxie modérées [162]. Dans cette étude, la fonction endothéliale *in vitro* a été évaluée par une technique permettant de mesurer *in situ* la production de NO. Les résultats ont montré une diminution de cette production aussi bien au niveau des CE de l'aorte que des artères pulmonaires traitées avec les MPs hypoxiques, et suggèrent que les MPs participeraient à la dysfonction endothéliale observée lors de l'hypoxie chronique par inhibition de la production de NO.

Dans les CE, l'enzyme responsable de la synthèse de NO, la eNOS subit des modifications post-traductionnelles mettant en évidence son activité. Ainsi, la phosphorylation ou la déphosphorylation de certains acides aminés est un mécanisme important de régulation post-traductionnelle de l'activité de la eNOS. Deux acides aminés sont particulièrement importants dans la régulation de l'activité de la eNOS, un résidu sérine dans le domaine réductase (Ser 1177) et un résidu thréonine dans le domaine de liaison à la calmoduline (Thr 495) [163]. Le Ser 1177 peut être phosphorylé par différentes protéines kinases, dont l'Akt [164]. Quand ce résidu est phosphorylé, le flux d'électrons à partir du domaine réductase et la production de

NO sont augmentés de deux à trois fois par rapport au niveau de base. D'autre part, le résidu Thr 495 est au contraire constitutivement phosphorylé, sa phosphorylation par la PKC est associée à une diminution de l'activité de l'enzyme [165,166]. Ainsi, la double phosphorylation de la Ser 1177 et de la Thr 495 détermine l'activité de la eNOS dans les CEs stimulées. Nous avons observé que dans les CEs d'aorte et d'artère pulmonaire, seules les MPs hypoxiques modifient l'activité de la eNOS, sans changer son expression. L'augmentation de la phosphorylation de la Thr 495 et la diminution de la phosphorylation du résidu Ser 1177 se traduisent par une diminution de l'activation de la eNOS, concordant avec la diminution de production de NO dans ces conditions expérimentales. Ces résultats sont confirmés par la diminution de l'activité de l'Akt, protéine kinase intervenant dans la phosphorylation de la Ser 1177 dans les cellules endothéliales d'aorte. Cependant, bien que la voie Akt-eNOS ait été reportée comme étant altérée dans les artères pulmonaires de rats [167], les MPs hypoxiques ne possèdent pas la capacité de modifier la phosphorylation d'Akt des CEs d'artères pulmonaires. D'autres kinases telles l'AMP kinase ou PKC pourraient éventuellement être impliquées dans la phosphorylation de la eNOS sur son site inhibiteur [168,169]. La diminution de l'activité de la eNOS est probablement responsable de la diminution de la production de NO par les CEs.

De plus, la localisation subcellulaire de la cavéoline-1 est critique pour la régulation optimale de l'activité de la eNOS. Ainsi, la eNOS fonctionnelle peut-être détectée dans deux compartiments membranaires : les cavéoles et l'appareil de Golgi [170]. Dans les cavéoles (dont les principales protéines de structures sont les cavéolines), l'interaction entre la cavéoline-1 et la eNOS inhibe l'activité de cette dernière en empêchant son activation par la calmoduline [171]. De plus, si l'interaction entre la cavéoline-1 et la eNOS est altérée, l'intégrité et la fonction vasculaire s'en retrouvent affectées. En revanche, dans l'appareil de Golgi, l'activité de la eNOS n'est pas régulée par la cavéoline-1 [172]. Ici, nous démontrons une diminution de l'expression de la cavéoline-1 uniquement dans les CEs d'artère pulmonaire traitées par les MPs hypoxiques. Cette diminution de l'expression de la cavéoline-1 indiquerait soit une augmentation de l'activité de la eNOS par diminution de leur interaction dans les cavéoles, soit que l'activité de la eNOS se déroule en majeure partie dans l'appareil de Golgi. Une troisième hypothèse pourrait consister en une modification de la phosphorylation de la cavéoline-1 par les MPs, et de ce fait, une modification de la production de NO. Cependant, plusieurs travaux ont décrit une altération de l'interaction eNOS-cavéoline-1 dans l'HTAP, aboutissant à une altération de l'intégrité vasculaire et une

diminution de la production du NO. Ainsi, la réduction de l'expression de la cavéoline-1 a été reportée dans l'HTAP primaire [173], ainsi que dans les modèles expérimentaux d'HTAP hypoxique [174] ou celui de la monocrotaline [175]. Ainsi le déséquilibre de l'interaction eNOS-cavéoline dans l'HTAP pourrait être favorisé par les MPs et participer à la dysfonction endothéliale observée. L'ensemble de ces données renforce la notion que les MPs hypoxiques participent au changement de l'intégrité de l'endothélium durant l'HTAP.

L'O₂⁻ a de nombreux effets, soit direct, soit par la formation ou par l'interaction avec d'autres radicaux. L'O₂⁻ interagit avec le NO avec des constantes de vitesses très élevées, ce qui conduit à l'inactivation du NO et à la formation de ONOO⁻, ERO de nature non radicalaire, mais potentiellement cytotoxique. L'inactivation rapide du NO endothélial par l'O₂⁻ semble jouer un rôle majeur dans la dysfonction endothéliale associée à diverses pathologies vasculaires [50,176]. Si le rôle des ERO en physiopathologie vasculaire est assez bien documenté au niveau des artères systémiques, leur rôle dans la physiopathologie de l'HTAP est moins bien caractérisé, bien qu'il soit généralement admis que la production d'ERO participe à la pathogénèse de l'HTAP chez les patients et dans les modèles expérimentaux [177-179]. Cependant, la source de ces ERO dans les artères hypoxiques n'est pas encore complètement défini [180]. Plusieurs études ont montré une implication de la NADPH oxydase dans l'hyperréactivité et la dysfonction endothéliale observée [178,181]. Par ailleurs, dans d'autres modèles d'HTAP, l'augmentation de la production d'ERO avait pour origine la NADPH oxydase et la mitochondrie [182,183]. Dans les poumons des rats adultes, l'activité de la xanthine oxydase est augmentée dans les conditions hypoxiques et spécialement dans la phase d'induction de l'exposition à l'hypoxie [184]. Il a également été rapporté que la xanthine oxydase participait à la dysfonction endothéliale et au remodelage vasculaire chez des rats néonataux exposés à l'hypoxie [185]. Nos résultats montrent que la production d'O₂⁻ ne s'effectue que dans les CE d'artère pulmonaire après traitement par les MPs hypoxiques, démontrant à nouveau une spécificité tissulaire des MPs hypoxiques envers le lit vasculaire pulmonaire. Nous avons également pu montrer que cette modulation du stress oxydant dans ces cellules était due à une participation à la fois de la xanthine oxydase et du complexe I de la mitochondrie.

Enfin, pour évaluer la pertinence physiopathologique des MPs, les MPs hypoxiques ont été injectées à des rats normoxiques. Bien que les MPs hypoxiques ne modifient pas la PAP, elles sont capables de réduire la capacité des agonistes muscariniques à réduire la relaxation

dépendante de l'endothélium à la fois dans l'aorte, mais également dans l'artère pulmonaire. Ces résultats sont en accord avec la littérature où est largement reportée la diminution de la relaxation dépendante de l'endothélium dans la circulation pulmonaire [186] ou systémique [160]. Il faut noter qu'une élévation de la PAP décrite chez les animaux hypoxiques est associée à une hypertrophie des cellules musculaires lisses aboutissant à une augmentation des résistances vasculaires. Il est raisonnable de penser que le traitement avec les MPs hypoxiques n'est pas capable d'affecter la prolifération des CML.

Bien que trois semaines d'hypoxie chronique ne modifient pas de façon significative la réponse à la 5-HT des anneaux d'artères extra-pulmonaires de rat [187], des études de réactivité vasculaire ont montré une forte augmentation de la réponse contractile aux agents activant des récepteurs ($\text{PGF}_{2\alpha}$) ou non (solution hyperpotassique) dans les artères extra-pulmonaires de souris hypoxiques. Les mécanismes contractiles situés en aval de l'augmentation de calcium dans les CML sont donc probablement affecté par l'hypoxie chronique [178]. Plusieurs autres groupes ont également rapporté ce phénomène d'hyperréactivité dans divers modèles d'HTAP et pour différents agonistes utilisés, et montré une différence régionale selon le territoire étudié [181,188-190]. Plusieurs mécanismes pourraient contribuer à l'hyperréactivité des vaisseaux dans l'HTAP parmi lesquels l'activation de la voie Rho-kinases [188], l'augmentation de la génération des anions superoxydes [181], la participation de COX-2 [191], l'implication des connexines ou des gap junctions [192,193], ou encore une diminution du NO endothélial. Il a été démontré que les MPs pouvaient agir indépendamment sur ces facteurs dans de nombreuses pathologies vasculaires, nous avons donc étudié le rôle des MPs hypoxiques sur la contraction vasculaire. Nous avons obtenues des données contradictoires avec celle de la littérature, puisque la réponse à la phényléphrine est diminuée dans les deux types de vaisseaux, et que la réponse au potassium est également diminuée dans les artères pulmonaires. En revanche, la réponse à la 5-HT qui est inchangée dans les artères pulmonaires, est augmentée dans l'aorte. Les MPs semblent donc participer à la réactivité vasculaire de façon différentielle, selon le territoire étudié et l'agoniste utilisé.

En conclusion, les rats hypoxiques développant une HTAP possèdent une élévation du taux de MPs, principalement d'origine plaquettaire et érythrocytaire. Les MPs hypoxiques altèrent directement la fonction endothéliale à la fois dans l'aorte et dans les artères pulmonaires de rats en réduisant l'activité de la eNOS et en limitant la biodisponibilité du NO, et dans le

territoire pulmonaire seulement en participant au stress oxydant. L'ensemble de cette étude suggère fortement que les MPs hypoxiques sont capables de participer à la dysfonction endothéliale, et contribuent en partie au processus physiopathologique de l'HTAP par les mécanismes présentés sur la figure 28.

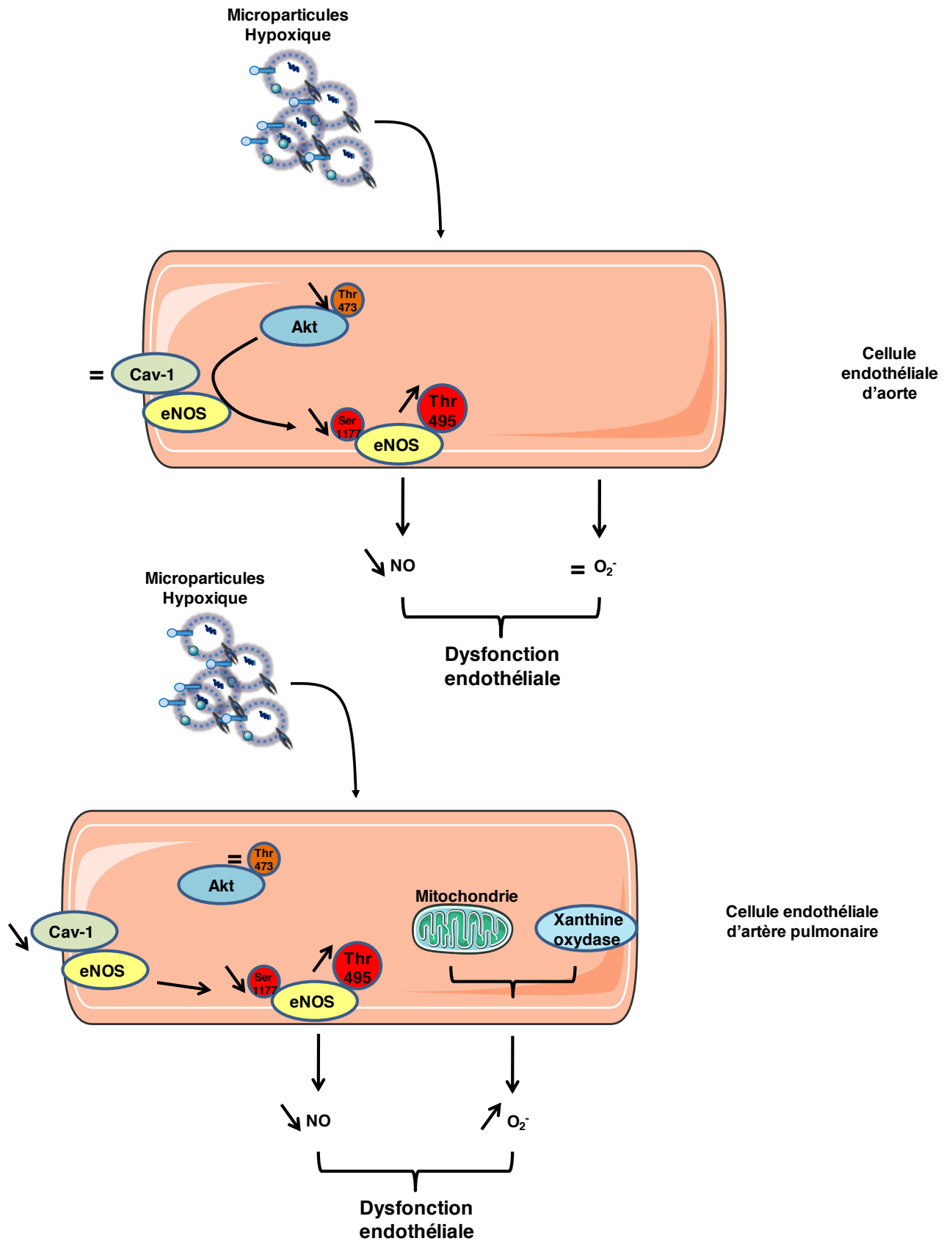


Figure 28 : Mécanismes impliqués dans la dysfonction endothéliale induite par les microparticules hypoxiques dans l'HTAP.

Cav-1 : cavéoline-1; eNOS : monoxyde d'azote synthase endothélial; Ser : sérine; Thr : thréonine; NO : monoxyde d'azote; O_2^- : anion superoxyde.

Partie II :

Microparticules issues de patients syndrome d'apnées obstructives du sommeil et hyperréactivité vasculaire : rôle de l'endothélium.

I. But de l'étude

Des travaux précédemment réalisés au laboratoire en collaboration avec le service de Pneumologie du CHU d'Angers ont établi que le taux circulant de MPs était identique chez les patients SAOS et les sujets témoins. Cependant la caractérisation de ces MPs par cytométrie en flux a montré une augmentation des taux de MPs granulocytaires (CD66b⁺) et celles issues des leucocytes activés (CD62L⁺), et que ces dernières corrélaient positivement avec l'index de désaturation de l'oxyhémoglobine (IDO), un des paramètres mesurée dans le SAOS. Le traitement des CEs par ces MPs a montré que les MPs issues de patients SAOS diminuaient la production de NO par inhibition de l'activité de la eNOS et augmentation de l'expression de la cavéoline-1. Par ailleurs cette production de NO corrèle négativement avec les MPs CD62L⁺ et l'IDO. De plus, les MPs augmentent l'expression génique et protéique de molécules d'adhésion et de COX-2. Enfin, la pertinence physiopathologique de ces MPs a été mise en évidence par leur capacité à diminuer la relaxation dépendante de l'endothélium en réponse à l'acétylcholine dans l'aorte, ainsi que la dilatation au flux des artères mésentériques [93].

Des données contradictoires existent dans la littérature concernant la vasoconstriction des vaisseaux chez les patients SAOS, mais généralement la réactivité vasculaire est altérée quel que soit le territoire étudié [132]. De plus, la part des MPs sur l'influence de la réactivité vasculaire est avérée et reconnue dans de nombreuses pathologies cardio-vasculaires [194,195].

En partant de ces constatations, l'objectif principal de ce travail a été d'étudier la possible implication des MPs dans la régulation de la réactivité vasculaire et, pour cela, les MPs issues du sang de patients SAOS ou de sujets sains ont été injectés par voie intraveineuse à des souris et la réactivité vasculaire a été étudiée.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

Microparticules issues de sujets présentant une suspicion de syndrome d'apnée du sommeil

Population

34 individus mâles (19 à 69 ans) ont été recrutés parmi les patients se présentant au laboratoire du sommeil du Département de Pneumologie au CHU d'Angers pour une polysomnographie (enregistrement nocturne du sommeil et de la ventilation) devant une suspicion clinique de SAOS entre novembre 2009 et juin 2011. Les critères d'exclusion étaient : l'existence d'un facteur de risque cardio-vasculaire (dyslipidémie, diabète, hypertension), une co-morbidité cardio-vasculaire associée, une obésité avec un indice de masse corporelle supérieur à 35 kg/m^2 , une maladie chronique grave quelle qu'elle soit, un traitement récent par anti-inflammatoires non stéroïdiens, l'aspirine, et tout traitement antérieur pour le SAOS.

La polysomnographie a été réalisée grâce à un système d'enregistrement (CID 102™, Cidelec, Angers, France). Les mesures incluaient les phases du sommeil (électroencéphalogramme, électrooculogramme, électromyogramme), le flux d'air nasal (canules nasales) et le flux d'air oral (thermistance oral), les mouvements de la cage thoracique et abdominale (plethymographie), ainsi que la SaO_2 [196]. Les événements respiratoires étaient également enregistrés et évalués manuellement selon les critères recommandés [131]. Les apnées sont définies par une cessation du flux aérien pendant au moins 10 secondes, et les hypopnées doivent être associées à une désaturation en oxygène supérieure à 4 %.

Les individus étaient ensuite séparés en deux groupes. Les sujets avec un IAH d'au moins cinq événements par heure étaient inclus dans le groupe SAOS. Les sujets présentant moins de cinq événements par heure formaient le groupe témoin Non-SAOS (N-SAOS). Tous les sujets faisaient l'objet d'une évaluation clinique et la somnolence diurne était mesurée par l'échelle de somnolence d'Epworth [197]. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'Université d'Angers et tous les patients devaient donner leur consentement éclairé.

Isolation des MPs

Une ponction veineuse à jeun était réalisée le lendemain de la polysomnographie, avec une aiguille 21G pour minimiser le risque d'activation plaquettaire. Trois tubes EDTA (acide éthylène diamine tétracétique) (Vacutainers, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) étaient prélevés et destinés à l'isolation des MPs, par le biais de quatre centrifugations successives réalisés dans les deux heures suivant le prélèvement. La première centrifugation (15 minutes, 260 *g*) permettait de retirer les cellules nucléées, la seconde (20 minutes, 1500 *g*) éliminait les plaquettes afin d'obtenir le PPP riche en MPs dont 200 μ l étaient conservées à -80°C pour phénotypage ultérieur des MPs. Les dernières centrifugations (45 minutes, 15.000 *g*) permettaient de laver et concentrer les MPs. Les MPs ont ensuite été resuspendues dans 150 μ l de solution saline (NaCl 0.9 %) et conservées à +4°C.

2. Cytométrie en flux

A partir du PPP, un comptage et un phénotypage des MPs a été réalisé par cytométrie en flux. Les MPs plaquettaires, leucocytaires, érythrocytaires, granulocytaires et endothéliales ont été marquées par des anticorps anti-CD41, CD45, CD235a, CD66b et CD146, respectivement. Les MPs pro-coagulantes étaient marquées à l'annexine V. Les MPs porteuses de L-sélectine et P-sélectine étaient marquées avec l'aide des anticorps anti-CD62L et CD62P. Des anticorps isotypiques contrôles étaient utilisés pour déterminer le marquage aspécifique pour chaque anticorps. Après 45 minutes d'incubation, des microbilles Flow-count étaient ajoutées pour la numération des MPs dans chaque échantillon. Les échantillons (10.000 événements) étaient analysés au cytomètre en flux. Les MPs concentrées ont également été quantifiées grâce aux microbilles, afin de pouvoir utiliser les MPs à la même concentration sérique que celle du patient.

3. Réactivité vasculaire

La contraction isométrique a été mesurée dans les aortes de souris injectées ou non avec des MPs à la concentration circulante déterminée dans le plasma de chaque patient. Comme lors de la première partie, 24 heures après l'injection, les anneaux d'aortes d'environ 2 mm ont été isolés et montés dans des cuves à organe isolé d'un myographe contenant la solution de Krebs adapté à 37°C, équilibrée avec un mélange carbogène. Au début de chaque expérience, les anneaux d'aorte étaient équilibrés contre une charge de 1 g puis stimulés par la solution

riche en potassium. Lorsque le vaisseau atteignait le plateau de contraction après la seconde stimulation potassique, 1 μM de U-46619 (Sigma) était ajouté pour avoir la contraction maximale du vaisseau. La fonctionnalité de l'endothélium était ensuite vérifiée par la présence d'effet relaxant de l'acétylcholine (1 μM) après une pré-contraction des anneaux au U-46619 à 80 % de leur contraction maximale déterminée. Des courbes cumulative concentrations-réponses aux agonistes ont été ensuite construites en présence ou non d'inhibiteur pré-incubé pendant 30 minutes : l'inhibiteur des NO Synthase N^{G} -nitro-L-arginine (L-NA, 100 μM ; Sigma-Aldrich), l'inhibiteur sélectif de COX-2 N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl) methansulfonamide (NS-398, 10 μM ; Sigma-Aldrich), l'indométacine, inhibiteur non sélectif des COX (100 μM ; Sigma-Aldrich), le SQ-29548, antagoniste sélectif du récepteur au TXA_2 (5 μM ; Sigma-Aldrich) ou le L-NA plus indométacine.

4. Western Blot

Après prélèvement et nettoyage, l'aorte était conservée dans un cryotube à -80°C . Le jour de l'extraction, l'aorte a été broyée dans un mortier, avec un peu d'azote liquide pour la maintenir rigide, et réduite sous forme de poudre. Deux cent μl de tampon de lyse de composition suivante : 500 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 20 % SDS P-40, $\text{pH} = 7.4$ et 400 μl d'antiprotéase étaient ajoutés progressivement. Une fois le broyage terminé, les échantillons sont laissés pendant 20 minutes sur la glace. Le lysat était récupéré et placé dans des eppendorfs, puis centrifugé (15.000 g , 10 minutes, 4°C) et le surnageant contenant les protéines a été conservé à -80°C . Le dosage protéique, la migration, le transfert et l'immunorévélation étaient réalisés suivant le protocole indiqué dans la première partie expérimentale.

5. Dosage du monoxyde d'azote par résonance paramagnétique électronique

Le jour du sacrifice, un anneau d'environ 5 mm d'aorte était mis à incuber pendant 45 minutes à 37°C en présence d'un tampon d'incubation (5 mM HEPES, 1 mM L-Arginine, 3 mM CaCl_2 , 0,3 M BSA, $\text{pH} 7,4$). L'aorte était ensuite incubée dans les mêmes conditions (37°C , 45 minutes) avec le capteur de spin, DETC (1,5 mM) en présence de FeSO_4 . Les échantillons étaient ensuite congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C . L'analyse par RPE a été réalisée comme indiquée précédemment.

6. Dosage des divers prostanoïdes

Le dosage du métabolite du TXA₂ (TXB₂) du métabolite du PGI₂ (6-keto PGF_{1α}), des métabolites du PGE₂ et le 8-isoprostane a été réalisé dans un milieu d'incubation contenant les aortes stimulées dans une solution de Krebs contenant 1 μM de 5-HT pendant 30 minutes. Le milieu a ensuite été congelé et placé à -80°C jusqu'à l'analyse par des kits commerciaux (Cayman Chemical Company, Ann Harbor, Etats-Unis) basés sur la technique ELISA.

Le principe du dosage est identique pour chaque prostanoïde. En prenant l'exemple du dosage du TXB₂, le métabolite stable du TXA₂, le dosage est basé sur une compétition entre le TXB₂ endogène présent dans l'échantillon et le TXB₂ traceur (couplé à une enzyme, l'acétylcholinestérase) de concentration connue et constante. La quantification consiste à mesurer l'activité de l'acétylcholinestérase avec le réactif d'Ellman à 412 nm. Ainsi la quantité de thromboxane B₂ traceur est inversement proportionnelle à la quantité de thromboxane B₂ présent dans l'échantillon. Les concentrations des divers prostanoïdes ont été présentées en pg/ml rapportées à la quantité de poids sec des aortes (mg).

7. Analyse statistique des résultats

Comme dans la première partie, les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM de *n* expériences indépendantes, *n* étant le nombre de souris. Les résultats ont été analysés en utilisant le test Mann-Whitney ou l'analyse de variance ANOVA lorsque cela était approprié. Le coefficient de Spearman a été utilisé pour corrélérer le taux de MPs aux données d'IAH. La différence est considérée comme significative lorsque $P < 0.05$.

III. Résultats

Données cliniques et caractéristiques biologiques des patients

Pour réaliser cette étude, 34 patients ont été inclus. Ces patients ont été séparés en deux groupes : N-SAOS (n=17) et SAOS (n=17) selon leur IAH déterminé par polysomnographie. Comme montré dans le tableau 2, exceptés pour l'âge, les deux groupes ne présentent pas de différence entre le poids, l'indice de masse corporelle, la pression sanguine ou encore le métabolisme lipidique et glucidique. Ces deux groupes ne présentent donc aucun facteur de risque cardiovasculaire, les patients ont donc été considérés comme des SAOS « purs ».

MPs circulantes et leurs origines

Les résultats du taux circulants et de la caractérisation phénotypique des MPs pour cette pathologie ont déjà été publiés par notre laboratoire [93]. Avec cette cohorte, nous ne retrouvons pas de différences significatives entre le nombre de MPs totales, ainsi que dans les différentes sous-populations (Tableau 2). Cependant, nous avons établi une corrélation positive entre l'IAH et les MPs CD62L⁺ (Figure 29).

Les MPs SAOS augmentent la réponse des anneaux aortiques de souris aux agents vasoconstricteurs

Pour vérifier si les MPs ont un effet sur la contraction vasculaire, nous avons injectés des souris avec les MPs ou le sérum physiologique. Vingt-quatre heures après, les animaux ont été sacrifiés et les anneaux d'aorte montés sur un myographe pour étudier la réponse aux différents agonistes vasoconstricteurs. La sérotonine produit une augmentation de la tension des anneaux aortiques selon une réponse dépendante de la concentration aussi bien dans les souris contrôles que dans celles traitées avec les MPs N-SAOS ou SAOS. Cependant la réponse vasculaire à cet agoniste est clairement augmentée chez les souris traitées avec les MPs SAOS (E_{max}, 3.1 ± 0.2 mN/mm) comparé à celles traitées avec les MPs N-SAOS (E_{max}, 2.2 ± 0.2 mN/mm) ou le groupe non traités (E_{max}, 2.4 ± 0.2 mN/mm). En revanche la sensibilité à cet agoniste vasoconstricteur semble inchangée entre les différents traitements. Le traitement par les MPs SAOS induit donc une hyperréactivité des anneaux d'aorte à la 5-HT (Figure 30A).

Tableau 2: Caractéristiques cliniques des patients utilisés dans cette étude

	N-SAOS	SAOS	<i>P</i>
n	17	17	
Age, années	41.7 ± 3	53.8 ± 2	0.0143
Indice de masse corporelle, kg/m ²	25.8 ± 1	26.7 ± 0.5	NS
Poids, kg	82.8 ± 4	82 ± 2	NS
Pression systolique, mmHg	124.1 ± 4.1	137.7 ± 4.9	NS
Pression diastolique, mmHg	72.9 ± 2	80 ± 3.1	NS
Fumeurs, n	5	2	NS
Glucose plasmatique, mmol/L	5.3 ± 0.2	5.8 ± 0.3	NS
Hémoglobine A1c (%)	5.7 ± 0.1	5.8 ± 0.1	NS
Cholestérol total, mmol/dL	5.5 ± 0.3	5.7 ± 0.2	NS
Triglycérides, g/L	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2	NS
Cholestérol HDL, g/dL	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.1	NS
Cholestérol LDL, g/dL	3.7 ± 0.3	3.7 ± 0.2	NS
Echelle de somnolence d'Epworth	9.3 ± 1.5	9.9 ± 1	NS
Index d'apnées-hypopnées, n/h	1.3 ± 0.3	19 ± 3.8	<0.0001
SaO ₂ moyenne, %	93.7 ± 0.4	93 ± 0.4	NS
4% IDO, n/h	1.5 ± 0.5	13.3 ± 2.5	<0.0001

Toutes les valeurs sont exprimées en moyenne ± SEM. HDL: lipoprotéines de haute densité; LDL: lipoprotéines de basse densité; SaO₂: saturation artérielle en oxygène; IDO: index de désaturation en oxygène.

Tableau 3: Taux de microparticules circulantes

	N-SAOS	SAOS	<i>P</i>
n	17	17	
MPs circulantes totales	13125 ± 2058	20957 ± 3617	NS
MPs CD41 ⁺	10647 ± 2016	19251 ± 3602	NS
MPs Annexine V ⁺	4283 ± 842	5733 ± 2843	NS
MPs CD45 ⁺	356 ± 124	408 ± 121	NS
MPs CD66b ⁺	174 ± 40	180 ± 26	NS
MPs CD62L ⁺	193 ± 38	266 ± 51	NS
MPs CD62P ⁺	257 ± 48	219 ± 107	NS
MPs CD146 ⁺	306 ± 64	360 ± 102	NS
MPs CD235a ⁺	818 ± 161	612 ± 89	NS

Les valeurs sont exprimées à la moyenne ± SEM. MPs CD41⁺: MPs plaquettaires, MPs AnnexineV⁺: MPs pro-coagulante, MPs CD45⁺: MPs leucocytaires, MPs CD66b⁺: granulocytaire, MPs CD62L⁺: MPs L-sélectine⁺, MPs CD62P⁺: MPs P-sélectine⁺, MPs CD146⁺: MPs endothéliales, MPs CD235a⁺: MPs érythrocytaires.

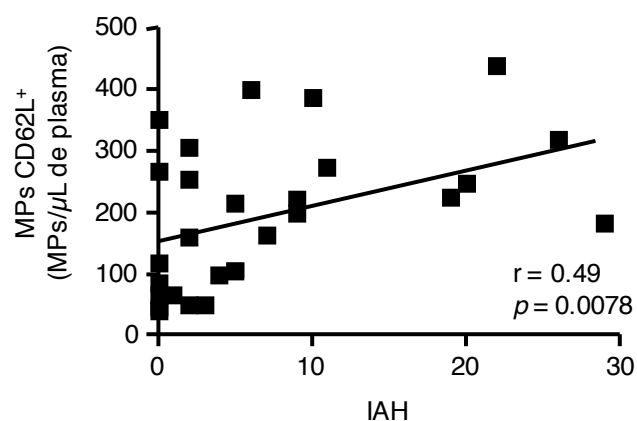


Figure 29 : **Corrélation entre l'index d'apnées-hypopnées (IAH) et le nombre de microparticules issues des leucocytes activées (CD62L⁺).**

Nous avons ensuite voulu savoir si cette hyperréactivité était dépendante de l'agoniste. Nous avons comparé les différentes réponses à une solution riche en potassium, et le traitement par les MPs SAOS a montré une augmentation significative de la réponse par rapport aux souris non traitées (Figure 30 B). Nous avons ensuite utilisé l'U-46619, un analogue du TXA₂, qui produit une augmentation de la tension des anneaux aortiques selon une réponse dépendante de la concentration. L'utilisation de cette agoniste provoque une réponse similaire à la 5-HT. En effet, nous avons observé une augmentation de la réponse vasculaire à l'U-46619 chez les souris traitées avec les MPs SAOS (E_{max}, 6.4 ± 0.4 mN/mm) comparés à celles traitées avec les MPs N-SAOS (E_{max}, 4.9 ± 0.3 mN/mm) ou le groupe non traité (E_{max}, 5 ± 0.2 mN/mm). En revanche la sensibilité à cet agoniste vasoconstricteur semble inchangée entre les différents traitements (Figure 30 C). Le traitement par les MPs SAOS induit donc une hyperréactivité des anneaux d'aorte indépendamment de l'agoniste utilisé.

Pour plus de clarté, nous nous sommes par la suite seulement intéressés à la réponse à la 5-HT, et nous avons voulu déterminer l'origine de cette hyperréactivité (endothéliale ou musculaire lisse).

Pour répondre à cette question, la réponse à la 5-HT a été étudié sur des anneaux d'aorte dépourvus d'endothélium. Nous avons ainsi observé un profil de la réponse à la 5-HT tout à fait différent. En effet, l'hyperréactivité due aux MPs SAOS est complètement abolie et est même significativement diminuée par rapport aux souris non traitées (E_{max}, 1.4 ± 0.2 mN/mm *vs* E_{max}, 0.7 ± 0.1 mN/mm) (Figure 30 D). Ces résultats suggèrent que l'endothélium joue un rôle prépondérant dans la réponse induite par les MPs SAOS.

Afin de déterminer si l'hyperréactivité vasculaire induite par la 5-HT était la résultante d'une libération de produits vasoactifs ainsi que l'origine de ces produits, nous avons utilisé différents inhibiteurs des voies des NOS et des COX.

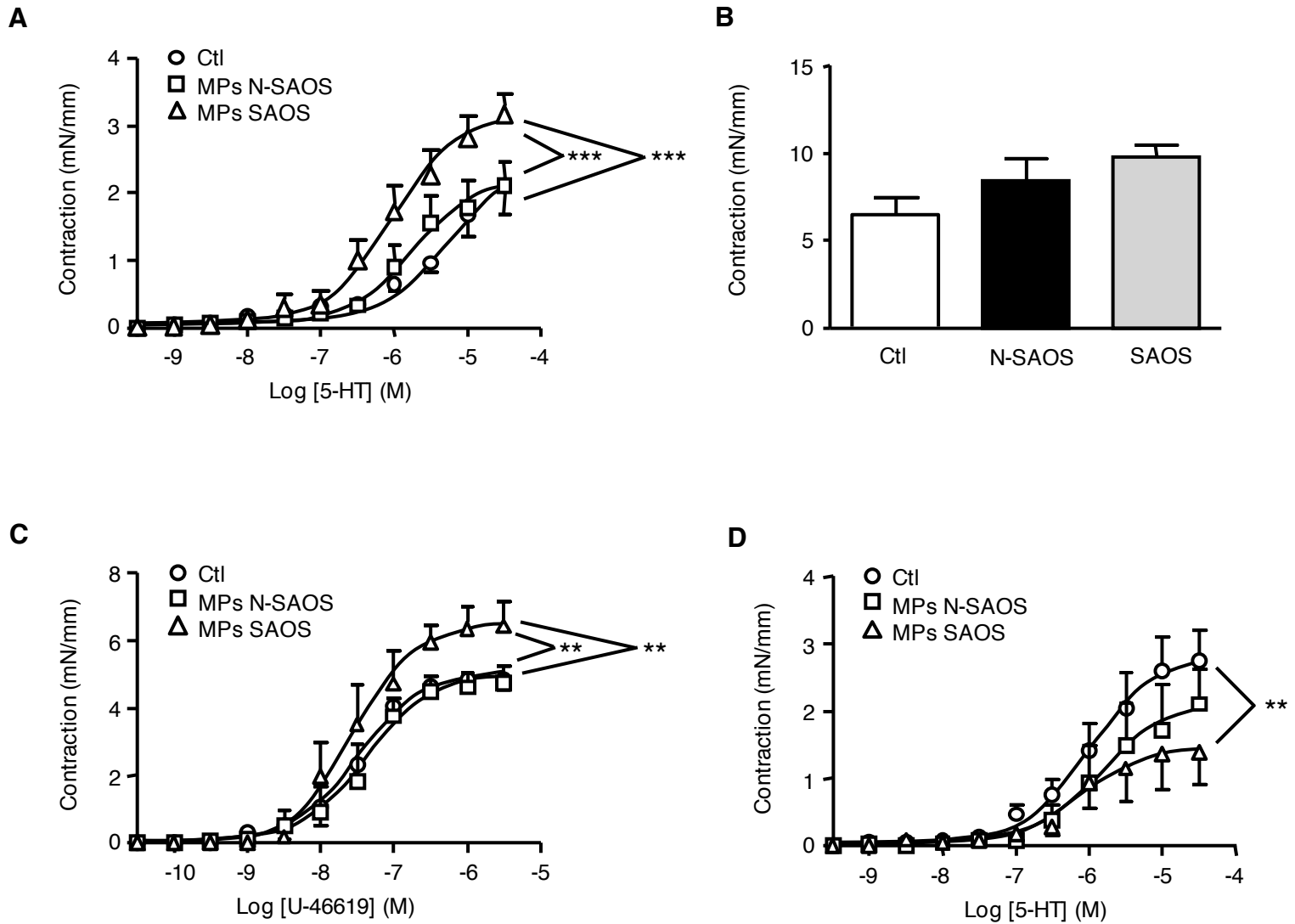


Figure 30 : Les microparticules SAOS augmentent la réponse contractile aux agents vasoconstricteurs.

Courbe concentration-réponse à la 5-HT avec endothélium fonctionnel (A, $n=8$) des anneaux d'aortes issues des souris non traitées ou traitées par les MPs N-SAOS ou SAOS. Réponse contractile à une solution hyperpotassique (B, $n=6$) et courbe concentration-réponse au U-46619 (C, $n=5$) des anneaux d'aortes issues des souris non traitées ou traitées par les MPs N-SAOS ou SAOS. Courbe concentration-réponse à la 5-HT avec endothélium ou non fonctionnel (D, $n=8$) des anneaux d'aortes issues des souris non traitées ou traitées par les MPs N-SAOS ou SAOS. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ et *** $P<0.001$.

Implication de la voie du NO dans l'hyperréactivité vasculaire induite par les MPs SAOS

Pour étudier, le rôle du NO, les effets de l'inhibiteur des NOS, le L-NA a été étudié en réponse à la 5-HT. Nous avons observé que l'abolition de la production du NO sur le tonus vasomoteur provoquait une hyperréactivité à la 5-HT dans le groupe contrôle ou traité par les MPs N-SAOS. En revanche, nous avons observé que l'inhibition de la production de NO n'avait aucun effet sur l'hyperréactivité vasculaire induite par les MPs SAOS, comparé aux MPs N-SAOS ou au contrôle suggérant une altération de la voie du NO (Figure 31 A-C). Par ailleurs, la mesure de la production de NO réalisée par RPE a montré une forte diminution de cette production dans les anneaux d'aorte de souris traités par les MPs SAOS comparés aux anneaux non traités ou à ceux traités par les MPs N-SAOS (Figure 32 A).

Afin d'identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans cette diminution de la production de NO, nous avons analysé par Western blot sur les aortes des souris, l'expression et l'état d'activation de la eNOS. Les différents traitements par les MPs n'affectent pas significativement l'expression de la eNOS (Figure 32 B). En revanche, uniquement le traitement par les MPs SAOS provoque une diminution de la phosphorylation sur le site activateur, ainsi que sur le site inhibiteur de la eNOS (Figure 32 C-D). Ainsi le ratio entre l'état d'inhibition et l'état d'activation montre clairement une diminution de l'activation de la eNOS (Figure 32 E).

Implication des métabolites des COX dans l'hyperréactivité vasculaire induite par les MPs SAOS

L'étude du rôle potentiel des COX et de leurs métabolites dans la réactivité vasculaire a été réalisée à l'aide de l'inhibiteur non sélectif des COX, l'indométacine, et l'inhibiteur sélectif de la COX-2, le NS-398. En présence d'indométacine, la réponse contractile à la 5-HT a été réduite dans les anneaux d'aorte provenant des trois groupes, même si la diminution était plus importante dans le groupe SAOS (60 %) comparé aux groupes N-SAOS et contrôle (47 et 48 %, respectivement) (Figure 33 A-C). Ces résultats suggèrent que des métabolites sensibles à l'indométacine participent à la contraction induite par la 5-HT, et ceci spécialement dans les aortes des animaux traités par les MPs SAOS.

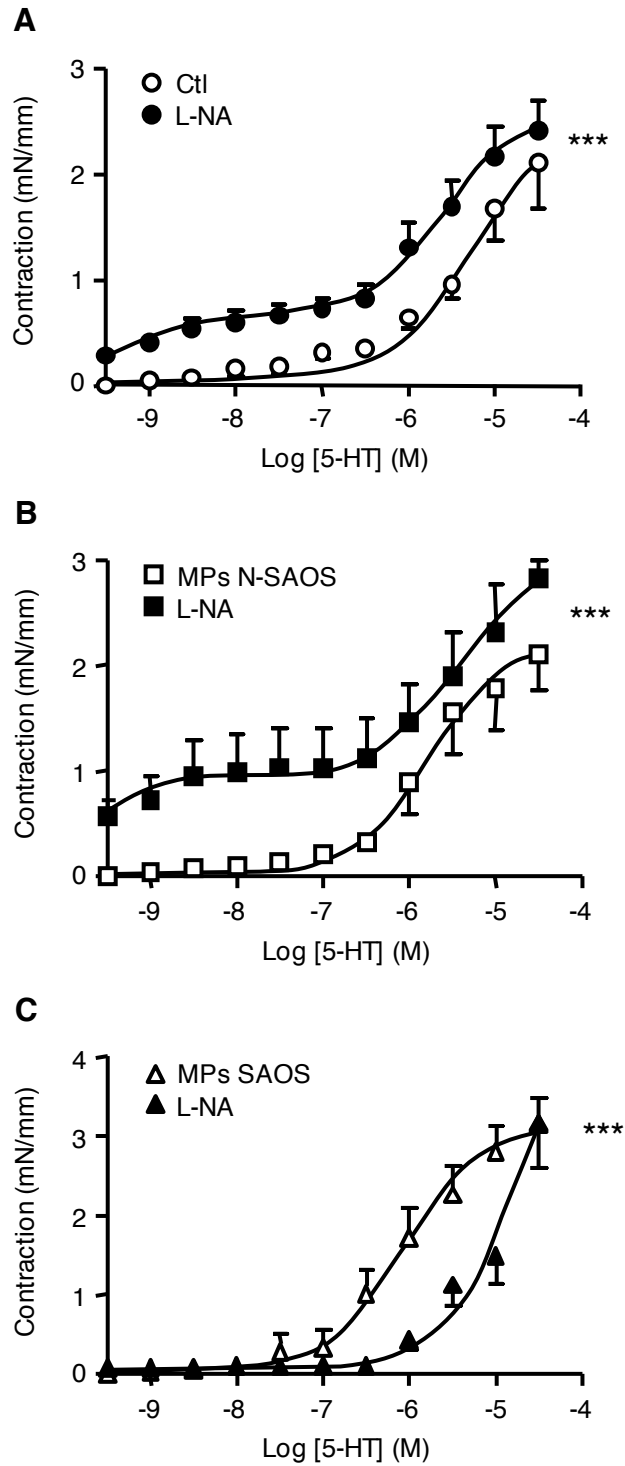


Figure 31 : Implication de la voie du NO dans l'hyperréactivité induite par les microparticules SAOS.

Courbe concentration-réponse à la 5-HT des anneaux d'aortes issues des souris non traitées (Ctl, n =5) ou traitées par les MPs N-SAOS (B, n =5) ou SAOS (C, n =5) en présence ou en absence de l'inhibiteur des NOS (L-NA). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$.

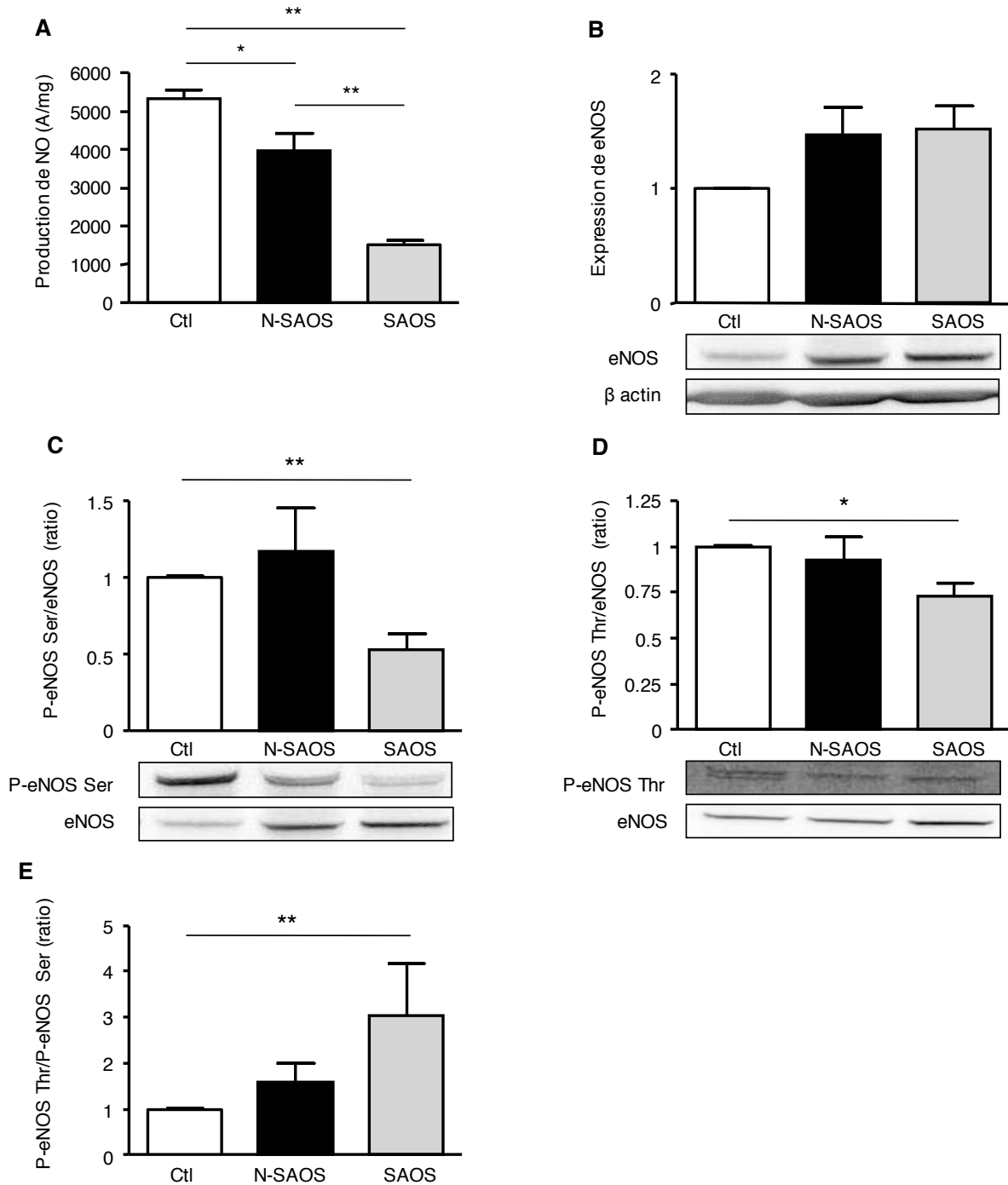


Figure 32 : Dérégulation de l'eNOS dans l'hyperréactivité induite par les microparticules SAOS.

Quantification de l'amplitude du signal NO-Fe(DETC)₂ dans l'aorte issus des souris non traitées ou traitées par les MPs N-SAOS ou SAOS (A). Les valeurs sont exprimées en amplitude/mg de poids sec ($n=6$). Western blot représentant l'expression de la eNOS (B), et le ratio de la phosphorylation de l'eNOS Ser 1177 (C) et eNOS Thr 495 (D) vs l'eNOS totale. Les immunoblots ($n=5$) sont quantifiés par analyse densitométriques et exprimés en unité arbitraire (A.U.). Ratio de la phosphorylation de la eNOS sur le site inhibiteur et activateur exprimés en unité arbitraire (A.U.). * $P<0.05$ et ** $P<0.01$.

Pour aller plus loin, l'inhibition spécifique de COX-2 par le NS-398, nous a montré un profil identique, à savoir une réponse à la 5-HT diminuée dans les trois groupes, avec cependant une inhibition qui semble plus forte dans le groupe SAOS (Figure 33 D-F). L'ensemble de ces données nous indique que le traitement par les MPs SAOS est accompagné d'une augmentation de la libération de produits vasoconstricteurs d'origine COX.

L'analyse par Western blot montre effectivement que les MPs SAOS sont capables d'augmenter l'expression protéique de COX-1 et COX-2, comparée au traitement N-SAOS ou au groupe contrôle (Figure 34 A-B). Par ailleurs, nous n'avons observé aucun changement dans l'état de phosphorylation d'I κ B α , la protéine inhibitrice du facteur de transcription NF- κ B, impliquée dans les voies d'activation des COX et de l'inflammation (donnée non montrée).

Finalement, pour tester l'hypothèse que l'activité des COX peut également être modifiée par le traitement, nous avons réalisé des tests ELISA pour détecter les métabolites des COX. Nous avons ainsi pu montrer une augmentation de la production de TXA₂ et des PGI₂ dans les aortes traitées par les MPs SAOS, comparées au groupe N-SAOS et au groupe non traité (Figure 34 C). En revanche, nous n'avons pas observé de différence significative dans la libération de PGE₂ ou de 8-isoprostane entre les trois groupes (Figure 34 D-F). L'hyperréactivité vasculaire observée pourrait donc être due à une surproduction de TXA₂ provoquée par les MPs SAOS.

Pour s'assurer de ce mécanisme, nous avons utilisé le SQ-29548, un antagoniste hautement sélectif du récepteur TP. En présence de SQ-29548, la réponse contractile à la 5-HT a été réduite dans les anneaux d'aorte provenant des groupes N-SAOS et contrôle (26 et 48 %, respectivement) (Figure 35 A-C). En revanche, cet antagoniste n'a aucun effet sur la contraction des anneaux d'aorte traités par les MPs SAOS.

Ces résultats suggèrent que l'hyperréactivité vasculaire observée est principalement due à un déficit de production de NO par les CEs des aortes des souris traitées par les MPs SAOS.

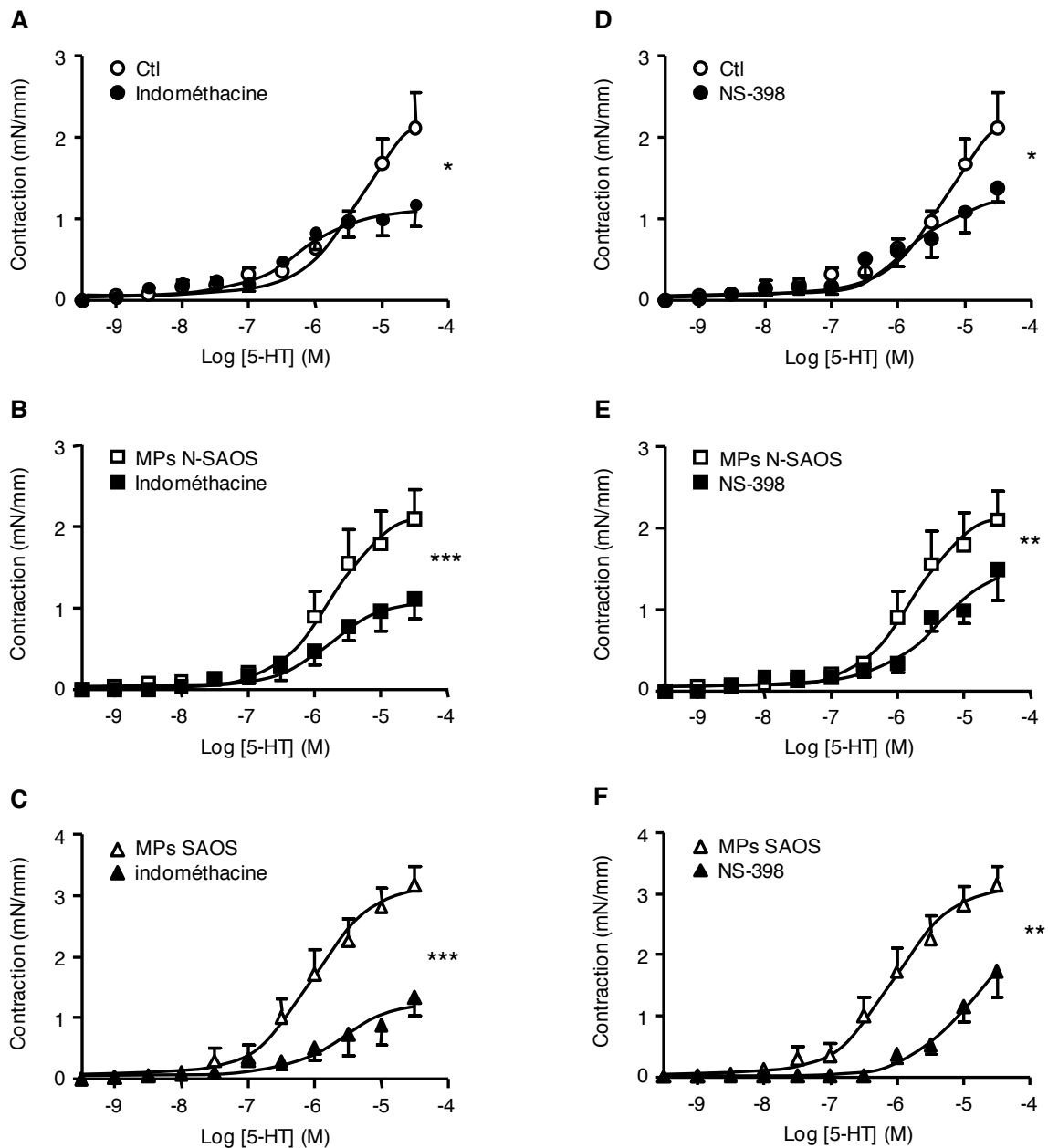


Figure 33 : Implication des métabolites des COX dans l'hyperréactivité induite par les microparticules SAOS.

Courbe concentration-réponse à la 5-HT des anneaux d'aortes issues des souris non traitées (Ctl, A, n=5) ou traitées par les MPs N-SAOS (B, n=5) ou SAOS (C, n=5) en présence ou en absence de l'inhibiteur des COX (Indométhacine). Courbe concentration-réponse à la 5-HT des anneaux d'aortes issues des souris non traitées (Ctl, D, n=5) ou traitées par les MPs N-SAOS (E, n=5) ou SAOS (F, n=5) en présence ou en absence de l'inhibiteur des COX-2 (NS-398). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ et *** $P < 0.001$.

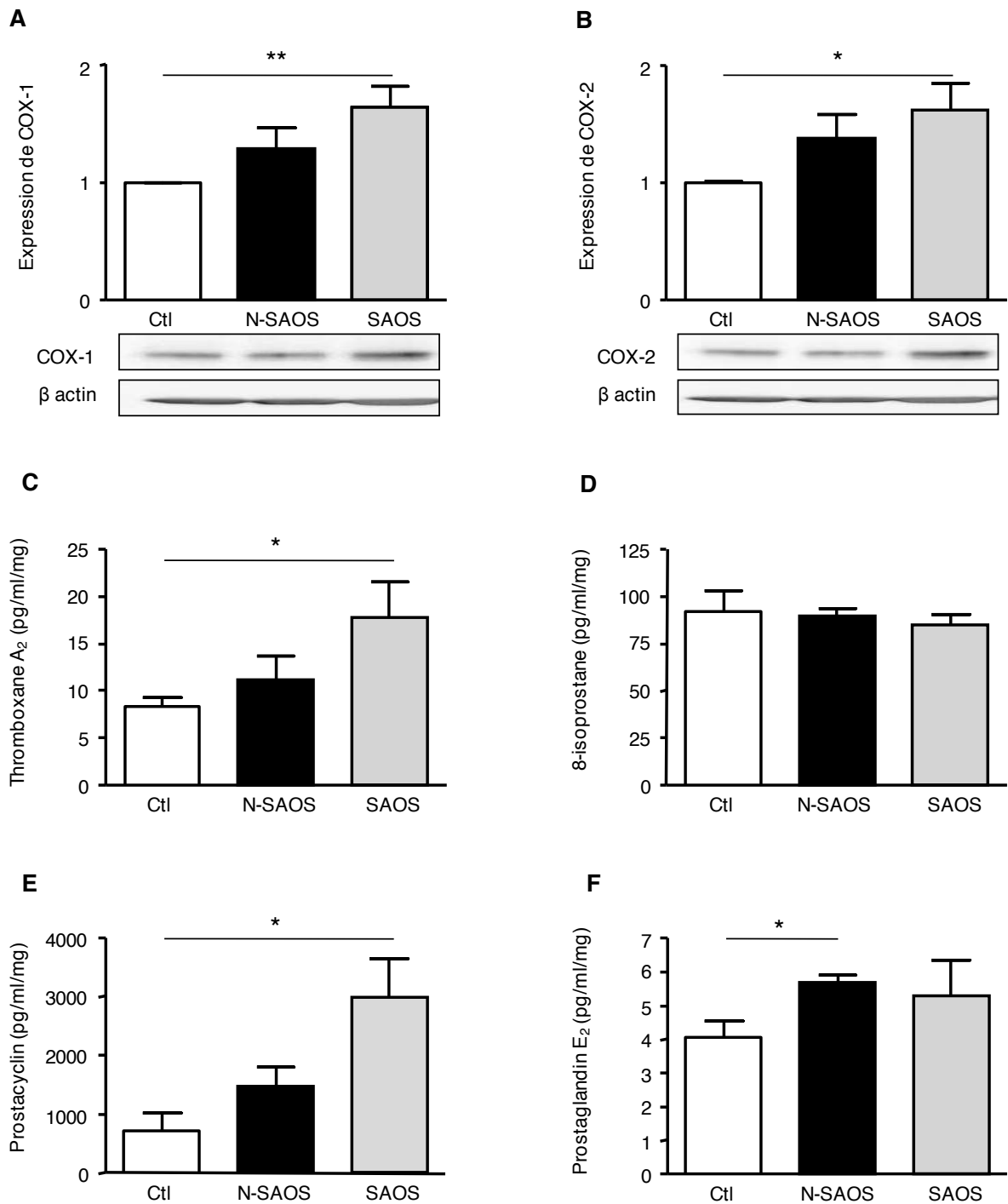


Figure 34 : Microparticules SAOS et métabolites des COX.

Expression de COX-1 (A) et COX-2 (B) dans l'aorte de souris non traitées (Ctl) ou traitées par les MPs N-SAOS ou SAOS ($n=6$). Concentration des dérivées des COX, le thromboxane A₂ (C), le 8-isoprostane (D), les prostacyclines (E) et la prostaglandine E₂ (F) présents dans le surnageant des aortes de souris stimulés par la 5-HT ($n=5$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

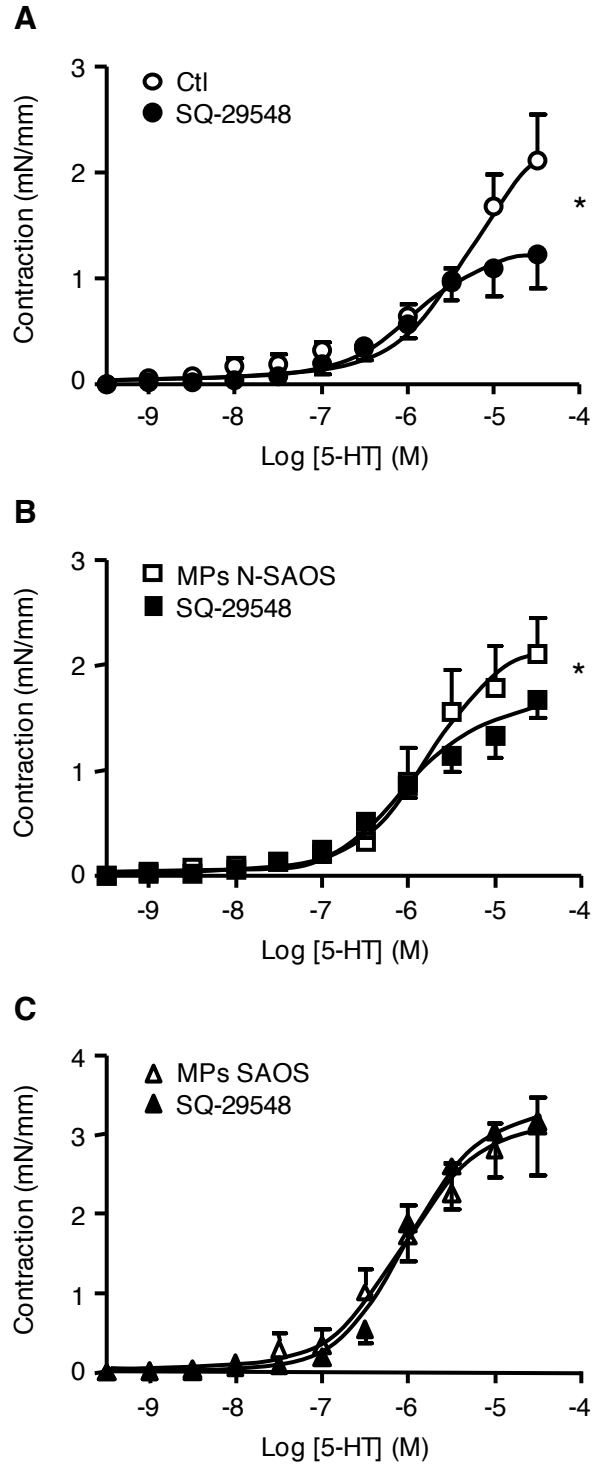


Figure 35 : Effet de l'antagoniste du thromboxane A_2 dans l'hyperréactivité induite par les microparticules SAOS.

Courbe concentration-réponse à la 5-HT des anneaux d'aortes issues des souris non traitées (Ctl, A, n =5) ou traitées par les MPs N-SAOS (B, n =5) ou SAOS (C, n =5) en présence ou en absence de l'antagoniste du thromboxane A_2 (SQ-29548). * $P < 0.05$.

Interaction de la voie du NO et des COX

Finalemment, pour étudier une éventuelle interaction entre les deux voies, nous avons utilisé en combinaison l'inhibiteur des NOS (L-NA) et celui des COX (indométacine). Nous avons observé d'une part une hyperréactivité à la 5-HT dans les aortes des animaux contrôles et ceux traités par les MPs N-SAOS. D'autre part, l'effet inhibiteur de l'indométacine est toujours effectif après l'inhibition des NOS dans les vaisseaux des souris traitées par les MPs SAOS (Figure 36). L'ensemble de ces données confirment que l'hyperréactivité induite par les MPs SAOS est liée à la fois à un mécanisme sensible à la voie du NO, mais également à la voie des COX.

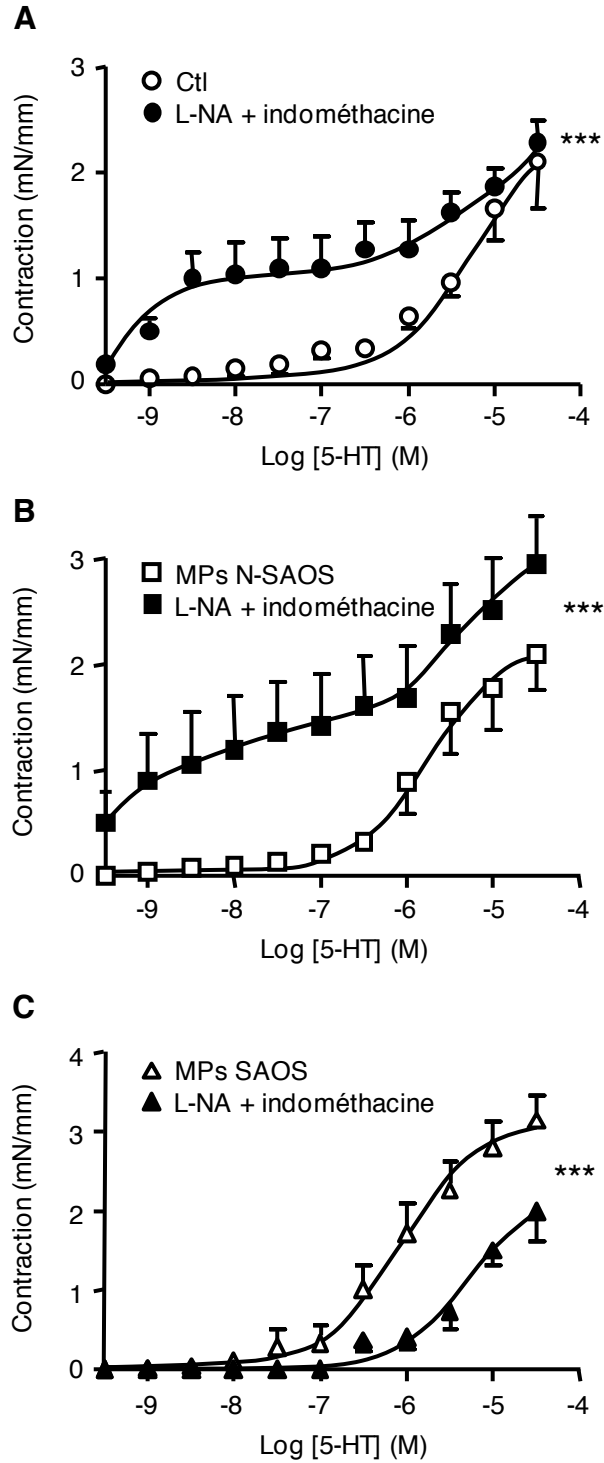


Figure 36 : Interaction entre les voies du NO et des COX.

Courbe concentration-réponse à la 5-HT des anneaux d'aortes issues des souris non traitées (Ctl, A, n =5) ou traitées par les MPs N-SAOS (B, n =5) ou SAOS (C, n =5) en présence ou en absence de L-NA plus indométacine. *** $P < 0.001$.

IV. Discussion

Ce travail a fait suite à celui initié au sein du laboratoire par le Dr Priou sur le rôle essentiel joué par les MPs issues de patients SAOS dans la dysfonction endothéliale observée dans cette pathologie. L'objectif principal de cette étude était de compléter l'étude de l'implication des MPs dans la fonction vasculaire. Pour cela, afin d'apprécier la pertinence physiopathologique des MPs sur l'animal entier, nous avons étudié la réactivité vasculaire des aortes de souris injectées par des MPs issues du sang de patients SAOS ou de sujets sains.

Notre étude a permis de mettre en évidence un rôle des MPs dans l'hyperréactivité retrouvée chez les patients SAOS. En effet, l'injection par voie *i.v.* de MPs SAOS dans les souris favorise l'hyperréactivité vasculaire en diminuant la production de médiateur vasodilatateur tel que le NO, et en augmentant la production des métabolites des COX. Cette hyperréactivité est dépendante de l'endothélium et est associée à une diminution de l'activation de la eNOS ainsi qu'à une augmentation de l'expression de COX-1 et COX-2. L'ensemble de ces données nous apportent des informations pour comprendre le rôle des MPs comme vecteur d'échange inter-cellulaire en favorisant la dysfonction vasculaire durant le SAOS.

De nombreuses pathologies cardiovasculaires sont associées à une dysfonction vasculaire incluant une diminution de la vasodilatation dépendante de l'endothélium et/ou une altération de la réponse vasoconstrictrice des CML. Il est maintenant largement accepté que les MPs contribuent, en partie, à l'altération de cette réponse vasculaire [194,195]. Concernant le SAOS, le laboratoire a précédemment rapporté une association entre l'augmentation du taux de MPs provenant des leucocytes activés et leur capacité à induire une dysfonction endothéliale *in vitro* et *ex vivo* [93]. Peu de données existent dans la littérature sur la réponse constrictrice chez les patients SAOS et ces données sont très contradictoires. Cependant la prévalence de l'hypertension chez les patients SAOS est de 30 % [198] et un lien entre la sévérité du SAOS et l'incidence de l'hypertension a été démontré [199], lien confirmé grâce aux modèles animaux [200,201]. La vasoconstriction induite par les apnées a été observée dans l'avant bras [202] et les doigts [203] des patients SAOS. Ces données sont surprenantes car les effets aigus de l'hypoxie et de l'hypercapnie causent une vasodilatation dans la plupart des lits vasculaires [204,205] suggérant que les épisodes d'hypoxie répétés favorisent une altération des mécanismes de base du contrôle du tonus vasculaire. Effectivement, dans l'avant bras de patients SAOS, l'équipe de Hedner a observé une diminution de la réponse à la norépinephrine [206] et une augmentation de la vasoconstriction à l'angiotensine [207]. Dans

un modèle animal, l'hypoxie intermittente chez le rat atténue la vasoconstriction induite par la norépinephrine. Le traitement *in vivo* par un mimétique des superoxydes dismutases prévient cette atténuation, laissant suggérer qu'une augmentation du stress oxydant et/ou nitrosatif est l'origine de l'altération de la contraction [208]. A l'inverse, dans les poumons isolés de ces rats, la vasoconstriction produit par l'U-46619 est augmentée [209]. Par ailleurs, il a été montré que la réponse à l'ET-1 était plus élevée dans la circulation mésentérique [210], suggérant une possible contribution de ce vasoconstricteur à l'hypertension qui peut survenir chez les patients SAOS. Enfin, Tahawi *et al.* ont montré une réponse similaire à la norépinephrine et l'ET-1 dans les artérioles de rats soumis ou non à une hypoxie intermittente [211]. La réponse de l'aorte de souris à des concentrations cumulatives d'ET-1 étant très faible [212], nous avons dû nous tourner vers d'autres agonistes constricteurs d'intérêts. Il apparait que les effets de la réponse aux agents vasoconstricteurs dans cette pathologie semblent dépendants du territoire vasculaire et de la substance vasoactive utilisée. Cependant, les mécanismes cellulaires de cette altération vasculaire n'ont pas encore été complètement élucidé, et particulièrement en ce qui concerne le rôle des MPs. Avec cette étude, nous avons montré que les MPs SAOS possédaient la capacité à augmenter la réponse maximale vasoconstrictrice à la 5-HT dans l'aorte de souris. Nous avons également montré que cette réponse était dépendante de l'endothélium et indépendante de l'agoniste. L'ensemble des effets pourraient donc être due à une altération de la balance entre les effets des produits vasoconstricteurs et relaxants sur les CML.

Des travaux précédents avaient déjà montré une altération de la voie du NO dans les CEs traitées par les MPs SAOS par une diminution de l'activation de la eNOS, ainsi qu'une diminution de la capacité de l'acétylcholine à induire une relaxation dépendante de l'endothélium dans l'aorte de souris traitées par les MPs SAOS [93]. Pour étudier les mécanismes associés à l'augmentation de la réponse vasculaire à la 5-HT, nous avons donc commencé par nous intéresser à la voie du NO. L'inhibition des NOS avec le L-NA ne modifie pas l'hyperréactivité induite par les MPs SAOS, indiquant un déficit dans la production de NO par l'aorte. Effectivement, la mesure de la production de NO dans l'aorte des souris traitées par les MPs SAOS confirme cette hypothèse et laisse suggérer que les MPs participent à la diminution du taux basal de NO observé notamment chez les animaux exposés à l'hypoxie intermittente [211]. Dans les vaisseaux, l'endothélium est la source principale de NO grâce à l'activation de la eNOS afin de maintenir le tonus vasculaire. La diminution de

l'activation de la eNOS retrouvée dans les aortes des souris traitées par les MPs SAOS indique clairement que l'altération de la voie du NO participe à l'hyperréactivité observée.

Une seconde voie connue pour être altérée dans la réactivité vasculaire induite par des MPs est la voie des COX que nous avons étudiée. De façon intéressante, le traitement par l'indométacine, l'inhibiteur non-sélectif des COX, diminue de façon plus importante la réponse à la 5-HT dans les anneaux d'aortes traités par les MPs SAOS, comparé au traitement par les MPs N-SAOS ou l'absence de traitement. Ces résultats suggèrent l'implication de métabolites vasoconstricteurs d'origine COX, et très probablement de COX-1 et COX-2 car le NS-398 diminue également cette contraction mais de façon moins prononcée. Ainsi, les effets des MPs SAOS sont associés à une augmentation de l'expression de COX-1 et de COX-2, et également une augmentation du TXA₂ et de PGI₂ sans modifier le 8-isoprastane ou la PGE₂. L'augmentation de la production de PGI₂ et du TXA₂ a déjà été montrée chez les patients SAOS, et il a été suggéré que la hausse de PGI₂ était un mécanisme compensatoire et protecteur contre l'installation d'une hypertension associée au SAOS [213]. Il est raisonnable de penser alors que l'augmentation de la réponse maximale des agents vasoconstricteurs en réponse aux MPs SAOS pourrait être la conséquence de l'augmentation de TXA₂. Cependant, l'antagoniste spécifique du TXA₂ ne modifie pas la contraction en réponse à la 5-HT des anneaux d'aortes des souris traitées par les MPs SAOS. Ces résultats suggèrent que l'hyperréactivité vasculaire observée est principalement due à un déficit de la production de NO par les CEs des aortes des souris traitées par les MPs SAOS.

Même si elles sont complexes et pas encore très bien comprises, des interactions entre le NO et les COX ont été reportées dans la littérature dans un contexte d'inflammation [214,215]. Par ailleurs, de nombreuses évidences montrent que le SAOS affecte l'endothélium en favorisant l'inflammation [216]. Nous avons donc étudié les possibles interactions entre ces deux voies en utilisant en combinaison l'inhibiteur des NOS et de COX. Alors que l'effet de l'inhibition des NOS prédomine dans les aortes de souris non traitées ou traitées par les MPs N-SAOS favorisant une hyperréactivité à la 5-HT, le traitement des MPs SAOS provoque une diminution de la réactivité des aortes. Il a été montré que le NO produit était capable de diminuer la production de COX en inhibant la voie des « mitogen-activated protein kinase » (MAPK) [217]. A partir de ces données, nous pouvons formuler l'hypothèse selon laquelle la diminution du NO ne peut plus réguler cette voie provoquant ainsi une surexpression des COX. Ces résultats suggèrent cependant que le NO et les COX agissent en combinaison selon

un mécanisme encore inconnu et participent tous les deux à l'hyperréactivité induite par les MPs SAOS.

En résumé, avec ce travail nous apportons des preuves selon lesquelles les MPs SAOS participent à l'hyperréactivité aux agents vasoconstricteurs dans l'aorte en diminuant la production de NO et en activant la voie des COX. Par ailleurs, une éventuelle interaction entre ces deux voies pourrait être à l'origine de cette hyperréactivité. Le rôle critique des MPs comme vecteur de la dysfonction vasculaire dans le SAOS est ainsi clairement souligné et résumé sur la figure 37. Les effets combinés des MPs SAOS sur la relaxation et la contraction des vaisseaux nous montrent clairement que les MPs ne doivent pas être considérées uniquement comme des marqueurs de l'atteinte vasculaire, mais comme des vecteurs capables d'amplifier les dysfonctions préexistantes. Dans cette optique, il ne serait pas surprenant que les MPs affectent d'autres mécanismes pathologiques intervenant au niveau des CEs comme l'angiogenèse que nous allons étudier dans la partie suivante.

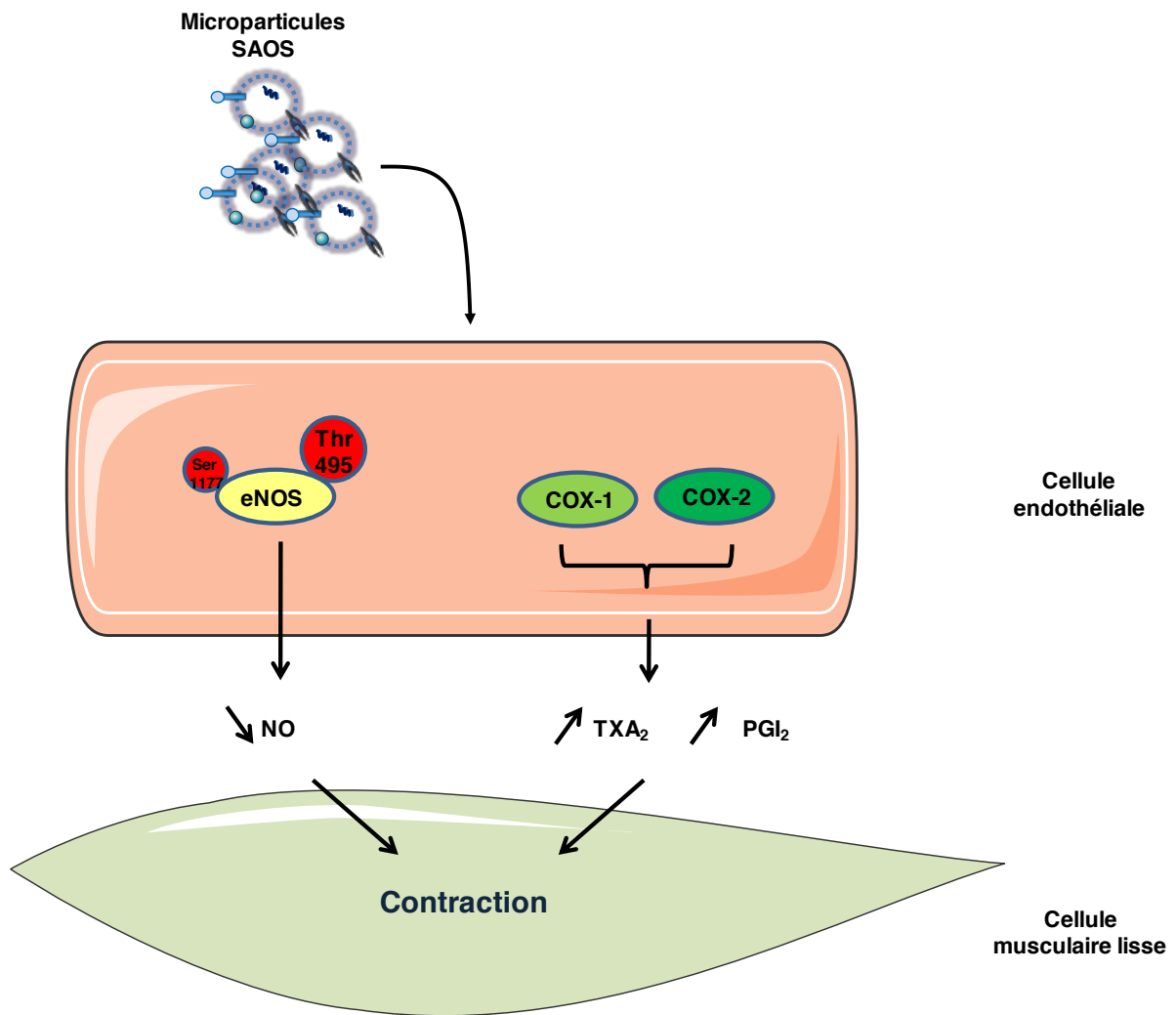


Figure 37 : Mécanismes impliqués dans la dysfonction vasculaire induite par les micoparticules SAOS.

eNOS : monoxyde d'azote synthase endothélial; Ser : sérine; Thr : thréonine; NO : monxyde d'azote; COX : cyclooxygénase; TXA₂ : thromboxane A₂; PGI₂ : prostacycline.

Partie III :

**Microparticules issues de patients syndrome d'apnées
obstructives du sommeil et angiogenèse.**

I. But de l'étude

Les travaux précédents effectués en collaboration avec le service de Pneumologie du CHU d'Angers ont déjà montré une altération du taux de MPs, ainsi qu'une participation des MPs à la dysfonction endothéliale et à l'augmentation de la réactivité vasculaire observé dans le SAOS.

Le SAOS est une pathologie caractérisée notamment par une hypoxie intermittente, et l'hypoxie est un des éléments déclencheurs de l'angiogenèse. Il a ainsi été rapporté des éléments contradictoires sur l'activité angiogénique chez les patients SAOS, avec un déséquilibre des facteurs angiogénique dans le sérum des patients [218,219]. L'angiogenèse participerait ainsi à l'augmentation de la prévalence des maladies cardio-vasculaires chez les patients SAOS. Par ailleurs, un des principaux effets des MPs sur le système cardio-vasculaire est leur capacité à moduler le programme angiogénique en intervenant sur ses différentes étapes, les effets étant différentiels selon l'origine des MPs.

Nous avons donc voulu dans cette étude établir un lien entre les MPs issues de patients SAOS et leur éventuelle participation à l'angiogenèse.

II. Matériel et méthodes

1. Matériel biologique

1.1. Microparticules issues de sujets présentant une suspicion de syndrome **d'apnée du sommeil**

Les patients utilisés pour cette étude sont issus de la même cohorte que pour le travail sur la réactivité vasculaire. Le recrutement des patients, le prélèvement, l'isolation et la caractérisation des MPs ont donc été semblables au protocole décrit dans la partie expérimentale.

1.2. Cellules endothéliales d'aorte humaine

Culture cellulaire

Les CEs utilisées sont des CEs d'aorte humaines isolées à partir de tissus humains d'adultes (Promocell, Heidelberg, Allemagne). Les cellules ont été cultivées dans une flask de 75 cm² et le milieu « Endothelial cell growth medium » (MV2) (Promocell) était changé tous les 2 jours pour les amplifier jusqu'au 10^{ème} passage. Les cellules étaient ensuite réensemencées à une densité de 10.000 cellules par cm².

Traitement des cellules

Les cellules ont été traitées pendant 24 heures à la concentration circulante de MPs déterminée pour chaque patient par cytométrie en flux. Lors des expériences utilisant l'antagoniste du récepteur à l'ET-1, les cellules étaient prétraitées pendant 45 minutes avec le BQ-788 (5 µM, Sigma-Aldrich) puis les MPs étaient ajoutées.

2. Mesure du taux de VEGF

Le taux de VEGF a été mesuré sur le PPP récupéré lors de la préparation des MPs à l'aide d'un kit ELISA (Pierce Biotechnology, Rockford, Etats-Unis). Ce kit permettait la détection du facteur de croissance polypeptidique de 165 acides aminés.

3. Western blot

MPs

Les MPs concentrées étaient dosées directement par la méthode de Bradford afin de déterminer la quantité de protéines à charger pour la migration.

Cellules

Après incubation avec les MPs pendant 24 heures, les cellules ont été lavées avec du PBS, et traitées avec le tampon de lyse pendant 20 minutes sur la glace. Le lysat était récupéré et placé dans des eppendorfs, puis centrifugé (15.000 *g*, 10 minutes, 4°C) et le surnageant contenant les protéines était conservé à -80°C.

Le dosage protéique, la migration, le transfert et l'immunorévélation ont été réalisés suivant le protocole indiqué dans la partie expérimentale I.

4. Prolifération cellulaire

Principe

Pour étudier la prolifération cellulaire, nous avons utilisé le kit CyQUANT® NF Cell Proliferation Assay. Se basant sur le fait que l'ADN cellulaire est constant, ce kit permet la détermination du nombre de cellules en utilisant cet ADN grâce à une sonde fluorescente qui va s'y lier.

Protocole

Les cellules ont étéensemencées dans une plaque 96 puits à raison de $5 \cdot 10^4$ cellules par cm^2 , puis stimulées par les MPs. Après 24 heures, le milieu était aspiré doucement pour être remplacé par 50 μl d'une sonde (dye binding solution). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, l'intensité de la fluorescence a été mesurée au spectrophotomètre (Biotek) à une longueur d'onde d'excitation à 485 nm et une longueur d'onde d'émission à 530 nm. Chaque condition était réalisée en duplicat.

5. Mesure de la formation de capillaire sur Matrigel®

Principe

Le Matrigel® est une mixture protéique gélatineuse sécrétée par les cellules de sarcomes murins. Le Matrigel® ressemble fortement à l'environnement extracellulaire et peut être ainsi utilisé comme matrice extracellulaire pour la culture cellulaire. Ainsi les CEs sont capables de s'organiser en réseau uniquement sur le Matrigel®.

Protocole

Après 24 heures d'incubation avec les MPs ou du VEGF (Santa Cruz Biotechnology, 20 ng/ml) servant de contrôle positif, les cellules étaient détachées avec de la trypsine (Lonza). Les cellules étaient ensuite réensemencées à une densité de $15 \cdot 10^4$ cellules par cm^2 dans une plaque 4 puits précoatés avec du Matrigel®.

Après avoir mis à $+4^\circ\text{C}$ le Matrigel pendant 16 heures, le coating s'effectuait de la manière suivante : sur la glace, 150 μl de Matrigel dilué dans du milieu sans sérum (dilution 1:1) étaient déposés par puits dans une plaque 4 puits, en faisant bien attention à éviter les bulles. Après solidification pendant 90 minutes à 37°C , 40 μl de Matrigel pur était rajouté pendant 60 minutes à 37°C pour bien homogénéiser la surface du coating.

La formation des tubes a été observée après 24 heures à l'aide d'un microscope à contraste de phase (MOTIC AE21). La longueur des capillaires formés ont été ensuite quantifiés à l'aide du logiciel ImageJ et représente la moyenne de 4 images différentes par expériences.

6. Analyse statistique des résultats

Les résultats étaient exprimés en moyenne \pm SEM de n expériences, n représentant le nombre de mesure pour les cellules. Un test Mann-Whitney (non paramétrique) a été utilisé. La différence est considérée comme significative lorsque $P < 0.05$.

III. Résultats

Données cliniques et caractéristiques biologiques des patients

Pour réaliser cette étude, 28 patients ont été inclus. Ces patients ont été séparés en groupes N-SAOS (n=13) et SAOS (n=15) selon leur IAH déterminé par polysomnographie. Comme montré dans le Tableau 4, les deux groupes ne présentent aucun facteur de risque cardiovasculaire, les patients seront donc considérés comme des SAOS « purs ».

Implication du VEGF dans la pathologie du SAOS

Des données contradictoires existant dans la littérature sur une élévation du taux de VEGF dans le plasma des patients présentant un SAOS, nous devions d'abord vérifier si dans notre cohorte nous retrouvions cette augmentation. Comme observé sur la Figure 38, les patients SAOS présentent un taux de VEGF circulant 2.5 fois plus élevé que les témoins.

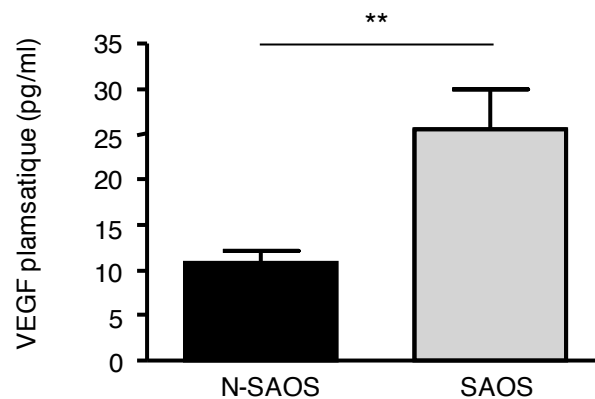


Figure 38 : Taux plasmatique de VEGF

Mesure du taux plasmatique de VEGF sur le plasma pauvre en plaquettes de sujets sains (N-SAOS, $n=7$) et de patients (SAOS, $n=9$). ** $P<0.01$.

Tableau 4: Caractéristiques cliniques des sujets

	N-SAOS	SAOS	<i>P</i>
n	13	15	
Age, années	37.7 ± 3	47.8 ± 2.4	NS
Indice de masse corporelle, kg/m ²	24.9 ± 0.9	27.4 ± 1.1	0.0348
Poids, kg	80.1 ± 4.1	82 ± 4.4	NS
Glucose plasmatique, mmol/L	5.1 ± 0.3	5.2 ± 0.1	NS
Hémoglobine A1c (%)	5.6 ± 0.1	5.8 ± 0.1	0.0183
Cholestérol total, mmol/dL	5.8 ± 0.3	5.7 ± 0.3	NS
Triglycérides, g/L	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.2	NS
Cholestérol HDL, g/dL	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1	NS
Cholestérol LDL, g/dL	3.9 ± 0.3	3.7 ± 0.2	NS
Echelle de somnolence d'Epworth	8.7 ± 1.5	10.3 ± 1	NS
Index d'apnées-hypopnées, n/h	2 ± 0.5	25.5 ± 4.1	<0.0001
SaO ₂ moyenne, %	94.3 ± 0.4	93 ± 0.3	0.0127
4% IDO, n/h	0.8 ± 0.4	22.3 ± 4	<0.0001

HDL: lipoprotéines de haute densité, LDL: lipoprotéines de basse densité, SaO₂: saturation artérielle en oxygène, IDO: index de désaturation en oxygène.

Puisque le PPP est un plasma riche en MPs, nous avons alors vérifié par Western blot si les MPs concentrées portaient le VEGF. Cette caractérisation des MPs nous a montré que les MPs SAOS présentait une nette augmentation du VEGF par rapport aux MPs N-SAOS. Il est à noter que aussi bien l'expression de l'actine, que celle de la tubuline est augmentée dans les MPs SAOS. Cependant, la normalisation du VEGF par rapport à l'une ou l'autre de ces protéines nous montrent toujours une augmentation de l'expression du VEGF (Figure 39).

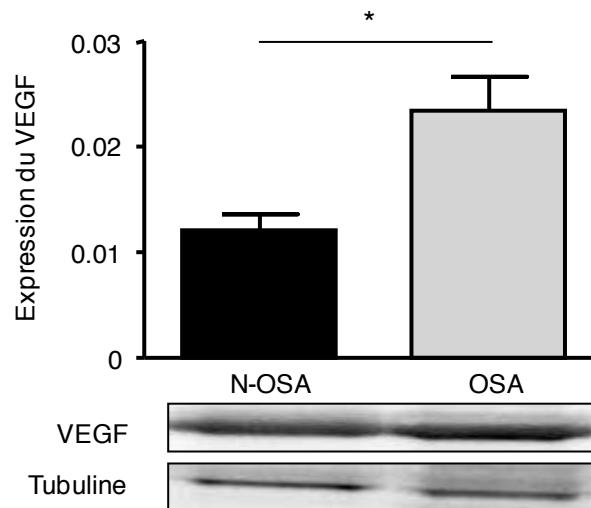


Figure 39 : Expression du VEGF dans les microparticules SAOS.

Western blot représentant l'expression du VEGF portée par les MPs issues de sujets sains (N-SAOS, $n=4$) et de patients (SAOS, $n=4$). * $P<0.05$.

Implication des MPs SAOS dans le processus angiogénique

Avec ces données, nous avons voulu alors savoir si les MPs SAOS pouvaient être un vecteur de l'angiogenèse dans cette pathologie. Pour cela nous avons étudié les effets des MPs sur différentes étapes clefs du processus angiogénique.

Pour étudier ces effets, nous avons traités des CEs d'aorte humaine pendant 24 heures avec les MPs à la concentration circulante déterminée pour chaque sujet et nous avons étudié la formation *in vitro* de capillaires. En absence de traitement, les CEs sont capables de s'organiser en structures capillaires, mais le traitement avec le VEGF induit une augmentation de la longueur des capillaires formés. De la même façon, le traitement avec les MPs N-SAOS n'a pas d'effet par rapport aux cellules non traitées, alors que les MPs SAOS augmentent de façon similaire au VEGF la longueur des capillaires (Figure 38).

Lors de l'hypoxie, les CEs sont capables de libérer de nombreux médiateurs autocrines angiogéniques et notamment l'ET-1. Nous avons alors voulu tester l'hypothèse selon laquelle le traitement des cellules endothéliales par les MPs SAOS induirait la production d'ET-1, qui serait responsable de l'augmentation de la formation des capillaires.

Pour vérifier cette hypothèse nous avons prétraité les CEs avec le BQ-788, l'antagoniste des récepteurs ET_B présent sur ces cellules. Le traitement seul des CEs avec le BQ-788 n'induit aucun effet par rapport au contrôle. De la même façon, le traitement des CEs avec le BQ-788 ne modifie pas la formation de capillaires induite par les MPs N-SAOS. En revanche, le traitement avec le BQ-788 est capable d'inhiber la formation des capillaires induit par les MPs SAOS (Figure 40). Ces résultats suggèrent que les MPs SAOS seraient capables de stimuler la production d'ET-1 par les CEs.

Une autre étape clef de l'angiogenèse est la prolifération des CEs. Nous avons ainsi observé que 24 heures de traitement par les MPs SAOS permettaient une augmentation significative de la prolifération par rapport aux cellules traitées par les MPs N-SAOS ou non traitées.

L'ensemble de ces résultats suggère que les MPs SAOS pourraient participer au processus angiogénique décrit dans le SAOS.

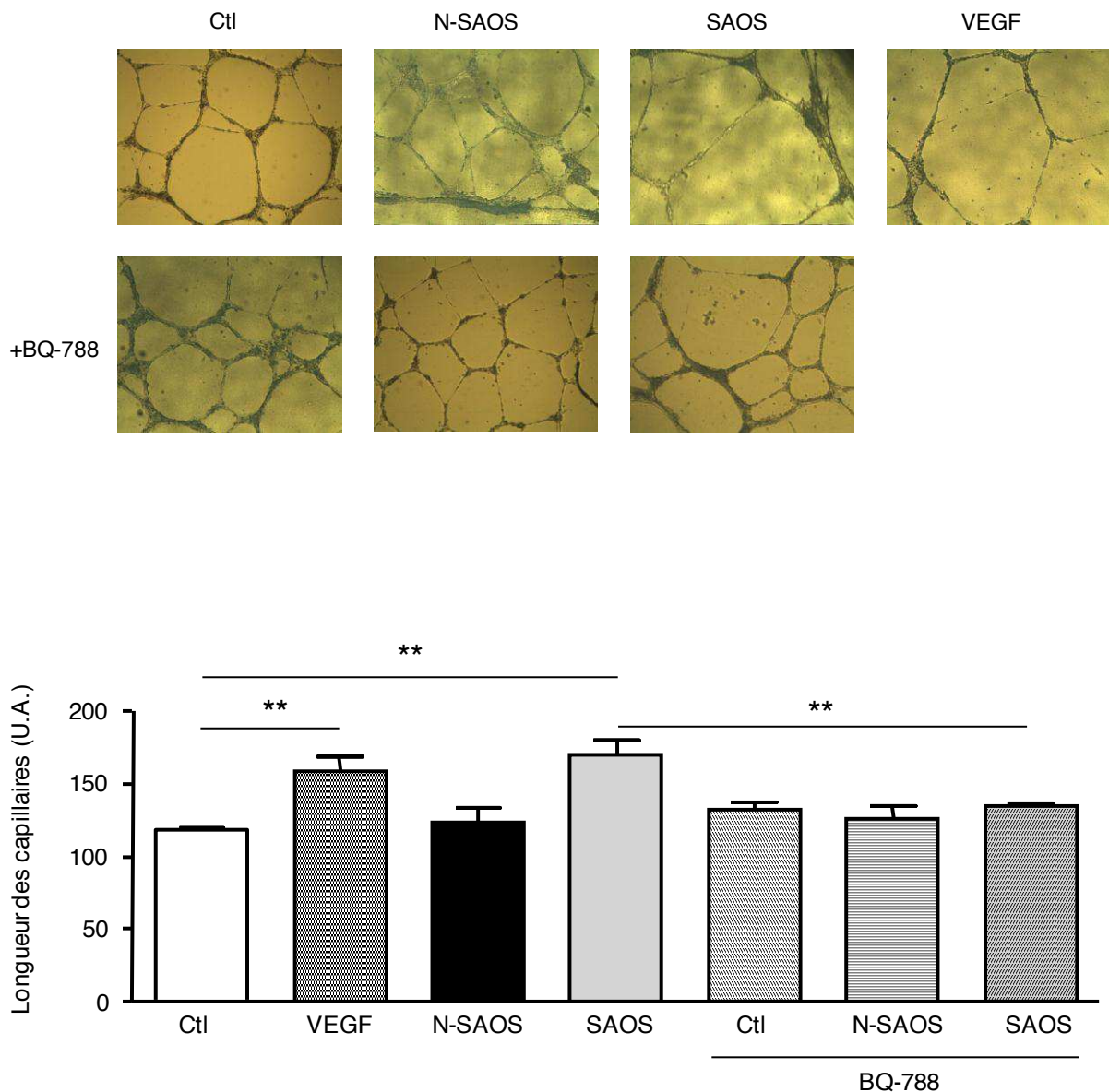


Figure 40 : L'augmentation de la formation des capillaires par les microparticules SAOS est prévenue par l'antagoniste du récepteur à l'endothéline-1.

Images représentant la formation de réseau sur Matrigel par les cellules endothéliales en absence (Ctl) ou en présence de MPs de sujets sains (N-SAOS) ou de patients (SAOS), ou de VEGF. L'implication de l'endothéline-1a été déterminée en prétraitant les cellules à l'aide de l'antagoniste de son récepteur, le BQ-788 (A). La longueur des capillaires a été quantifiée pour mesurer l'angiogenèse (B, n=5). ** $P < 0.01$.

IV. Discussion

Notre étude a permis de mettre en évidence un rôle des MPs dans différentes étapes de l'angiogenèse. Tout d'abord nous avons vérifié que les patients présentaient bien une hausse du VEGF, un facteur hautement angiogénique, dans leur plasma. Nous avons ensuite établi que les MPs transportaient cette protéine, et que l'expression de cette protéine était plus importante chez les MPs issus de patients SAOS. Ces deux expériences nous ont permis de supposer que les MPs pouvaient donc être impliquées dans le processus angiogénique. Nous avons alors évalué la capacité des MPs à induire la formation de tubules par les CEs, et nous avons remarqué que le traitement par les MPs SAOS augmentait la longueur des structures capillaires. De façon intéressante, lorsque l'on traite les cellules avec un antagoniste du récepteur à l'ET-1, la formation de capillaires n'est plus augmentée indiquant une possible production d'ET-1 par les CEs en réponse à la stimulation par les MPs. Enfin, nous avons également montré que les MPs étaient capables d'agir sur une autre étape de l'angiogenèse qui est la prolifération des CEs.

L'implication de l'angiogenèse dans la pathogénèse du SAOS n'a été pour l'instant que très peu étudié, et concerne principalement la mesure de paramètres biochimiques. Parmi ces paramètres, le taux de VEGF circulant, facteur induit par l'hypoxie [220], a été mesuré chez les patients. Le VEGF est un vasodilatateur qui induit la prolifération des CEs, augmente la perméabilité vasculaire, et favorise la production de NO, qui pourrait jouer un rôle dans la pathogénèse de nombreuses maladies hypoxiques [221]. Un travail démontrant un rôle du VEGF dans le SAOS serait très pertinent, puisque le SAOS est considéré comme un facteur de risque cardiovasculaire aggravant [222]. Par ailleurs, puisque le VEGF est un facteur induit par l'hypoxie, le VEGF pourrait être une partie de la mécanistique du SAOS. Ainsi les travaux montrant une altération du taux de VEGF suggèrent que le VEGF pourrait être un marqueur sérique chez les patients SAOS [223].

En effet, il a été rapporté une augmentation du taux de VEGF dans le sérum des patients corrélé à la sévérité du SAOS [224-226]. Ces études ont été assez critiquées et souffrent cependant de deux limites majeures. Tout d'abord, les cohortes utilisées ne sont pas accordées sur le poids des sujets, il a en effet été rapporté une élévation du taux de VEGF chez les patients obèses [227]. La seconde limite concerne le fait que le VEGF a été mesuré dans le sérum, qui n'est pas l'échantillon le plus approprié puisque les plaquettes sont le principal transporteur de VEGF [228], même si le décompte en plaquettes étaient le même dans les

deux populations. Deux autres études ont alors étudié le taux de VEGF dans le plasma des patients, et ces études retrouvent un taux de VEGF beaucoup plus faible que les taux des études précédentes. Lavie *et al.* ont ainsi montré une augmentation du taux de VEGF corrélé à l'IAH, corrigé par un an de PPC [229], mais une fois de plus les cohortes n'étaient pas appariées. A l'opposé, le travail de Valipour effectué sur le plasma des patients issus de cohortes appariées ne démontre plus cette augmentation de VEGF, suggérant que cette augmentation n'est due qu'à l'obésité [230]. Pour s'affranchir du fait que les plaquettes sont le principal transporteur de VEGF, nous avons mesuré le VEGF sur le plasma PPP de patients issus d'une cohorte appariée. Dans notre étude, nous montrons que les patients SAOS présentent un taux plasmatique de VEGF significativement plus élevé par rapport aux sujets témoins. Aucun travail n'a pu démontrer l'origine de cette augmentation de VEGF circulant. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce VEGF pouvait être porté par les MPs. Nous avons alors vérifié que les MPs exprimaient le VEGF, et nous avons observé que les MPs SAOS exprimaient plus fortement le VEGF que les MPs issus des sujets témoins. Les MPs pourraient donc être une des explications possibles à la hausse du VEGF circulant.

Nous avons ensuite vérifié si les MPs possédaient une activité angiogénique. De nombreuses données dans la littérature démontrent en effet une participation des MPs dans le processus angiogénique, en favorisant ou en inhibant la formation de structures capillaires [86,231] et cet effet est dépendant de l'origine des MPs [55]. Les MPs des patients SAOS ont la capacité d'augmenter de la même façon qu'un traitement au VEGF la longueur des capillaires formés par les CEs suggérant une activité pro-angiogénique portée par les MPs SAOS. Puisque le taux d'ET-1 est souvent rapporté comme étant plus élevé chez les patients SAOS, et que l'ET-1 peut engendrer une réponse angiogénique par les CEs *in vitro* [232], nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les MPs SAOS sont capables d'augmenter la longueur des capillaires par une voie dépendante de l'ET-1. En utilisant l'antagoniste du récepteur à l'ET-1 présent sur les CEs, nous avons remarqué que la réponse des CEs aux MPs SAOS était abolie. Ces résultats suggèrent que les MPs stimulent la production d'ET-1 par les CEs, et que l'ET-1 va alors activer les CEs en se fixant sur le récepteur ET_B. Par ailleurs, nous avons également pu montrer que les MPs étaient capables d'augmenter la prolifération des CEs, une autre étape clef du processus angiogénique. Cependant en étudiant l'expression à 24 heures de différentes protéines impliquées dans ces voies de signalisation, nous n'avons observé aucun

changement, indiquant probablement une régulation plus précoce de ces voies de signalisation (résultats non montrés).

Le processus angiogénique dans le SAOS est très peu détaillé dans la littérature. Chez les patients atteints d'occlusions coronaires, il a été observé une forte augmentation du développement des vaisseaux coronaires collatéraux lorsque ces patients présentaient également un SAOS [233]. Par ailleurs, l'augmentation de réseau capillaire a été observée dans les muscles squelettiques de patients SAOS, et ces capillaires expriment fortement les marqueurs de prolifération des CE. Ce réseau pourrait probablement favoriser l'augmentation de la circulation sanguine afin d'améliorer les performances physiques, grandement diminuées, de ces patients [234]. Selon ces observations, il a été suggéré l'existence d'un mécanisme compensateur qui protège les patients SAOS de complications cardio-vasculaires et le VEGF pourrait contribuer ainsi à ce mécanisme protecteur. L'angiogenèse dans le SAOS pourrait donc être bénéfique et un des vecteurs pourraient être les MPs (Figure 41).

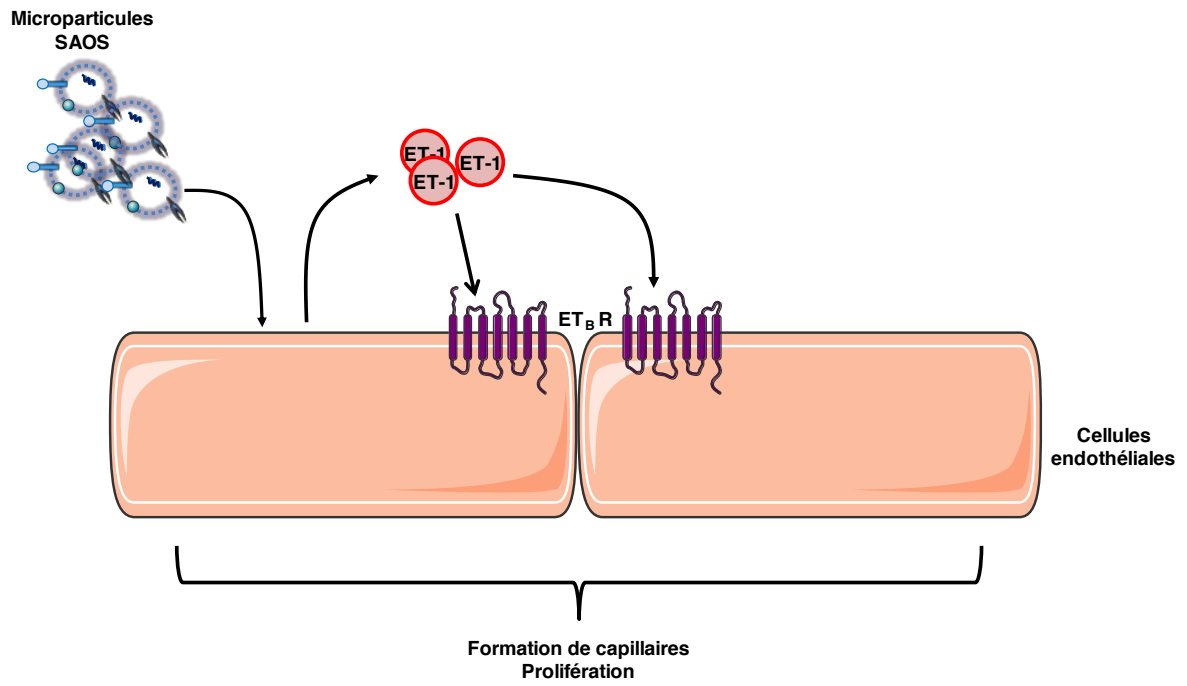


Figure 41 : Implication des microparticules SAOS dans le processus angiogénique.

ET-1 : endothéline-1; ETBR : récepteur endothéliale à l'endothéline-1.

CONCLUSION & PERSPECTIVES

Les travaux de ces 15 dernières années ont montré que les MPs jouent un rôle dans la communication intercellulaire et sont capables de moduler d'importantes fonctions de régulations cellulaires. Les MPs sont capables d'induire et/ou de maintenir une dysfonction vasculaire et d'être ainsi impliquées dans la progression des complications cardiovasculaires, les MPs peuvent donc être une nouvelle cible thérapeutique. Paradoxalement, il existe des preuves que les MPs peuvent avoir des effets bénéfiques, et les MPs pourraient être potentiellement développés comme nouvel outil thérapeutique. Il y a ainsi un équilibre fragile entre les effets bénéfiques et délétères des MPs dans la physiopathologie vasculaire.

Ce travail de thèse avait pour objectif d'apporter des connaissances supplémentaires sur ce nouvel aspect important de la physiologie vasculaire et a permis de mettre en évidence de nombreux points communs entre les deux pathologies vasculaires hypoxiques étudiées et les MPs.

Nos premiers résultats ont mis en évidence une augmentation du taux circulant de MPs dans un modèle animal d'HTAP, le rat hypoxique chronique. Cette augmentation du taux de MPs hypoxiques est associée à un effet propre de ces MPs sur les CEs en diminuant la production de NO. Les MPs ont également un effet différentiel selon le territoire vasculaire étudié en augmentant le stress oxydant uniquement dans les CEs d'artères pulmonaires. Enfin, ces MPs sont capables d'atténuer la relaxation dépendant de l'endothélium aussi bien dans l'aorte que dans l'artère pulmonaire. Nous avons donc établi que les MPs participaient à la dysfonction endothéliale observée dans ce modèle. La question se pose maintenant de savoir si les MPs pourraient être à l'origine de cette dysfonction. L'injection des MPs hypoxiques dans des rats normoxiques pendant 3 semaines (durée du traitement de l'hypoxie chronique) et le suivi de ces rats par échographie permettrait de déterminer si les MPs participent à l'origine de la pathologie ou amplifient la dysfonction préexistante.

La seconde partie des résultats a confirmé des résultats préalablement établis dans la pathologie du SAOS, à savoir une corrélation positive entre les MPs issues des leucocytes activés et la sévérité de cette pathologie. Par ailleurs, avec cette étude, nous avons également montré que l'injection de MPs SAOS dans les souris favorisait une hyperréactivité vasculaire en réponse à divers agents vasoconstricteurs avec un rôle obligatoire de l'endothélium. Cet effet est associé à une diminution de l'activité de la eNOS et une diminution de production de NO d'une part, et à une augmentation des métabolites des COX d'autre part. Nous avons donc

établi un effet délétère des MPs en participant à la dysfonction vasculaire observée dans le SAOS.

Dans la dernière partie de nos résultats, nous avons montré que les MPs SAOS étaient capables d'induire la prolifération et d'augmenter la formation de structures capillaires par les CEs. Nous avons également montré que ce dernier mécanisme était dépendant du récepteur à l'ET-1. Les MPs SAOS pourraient alors participer à l'angiogenèse observée dans le SAOS. A l'heure actuelle, peu d'éléments existent sur le processus angiogénique dans le SAOS, cependant ces éléments seraient en faveur d'une angiogenèse bénéfique pour contrer le processus d'hypoxie. Les MPs SAOS pourraient alors avoir un rôle antagoniste (ange et démon) dans le SAOS, elles seraient délétères au niveau de la fonction vasculaire, et bénéfiques au niveau de l'angiogenèse.

L'ensemble de nos travaux a donc mis en évidence une altération du taux et/ou du phénotype des MPs lors des pathologies étudiées. Puisque le taux de MPs circulantes est très fréquemment corrélé à la sévérité d'une pathologie, le contrôle du taux de MPs devient dès lors un enjeu primordial dans le traitement des pathologies. En effet, nous avons ainsi montré que dans deux pathologies présentant l'hypoxie comme caractéristique commune, le profil des MPs était tout à fait différent. Ainsi, une élévation du taux circulants ou d'une population particulière de MPs pourrait être un des marqueurs précoces d'un dysfonctionnement dans des pathologies, telle l'HTAP, où le diagnostic est délicat et souvent tardif.

Par ailleurs, une réduction du taux de MPs totale ou spécifiques d'une population pourrait ainsi être un indicateur de l'efficacité d'un traitement. Egalement, la modulation du taux de MPs pourrait diminuer les effets délétères induits par les MPs. Dans cet optique, de nombreux essais cliniques sont actuellement en cours afin d'évaluer l'évolution dans le temps du taux de MPs après l'initiation de différentes thérapies (www.clinicaltrials.gov). Cependant, il est important de souligner que les changements des taux plasmatiques de MPs peuvent être dus directement à l'effet du traitement sur la génération des MPs ou sur la demi-vie et l'élimination de ces MPs, et non sur l'ensemble général de la pathologie.

Les études menées ont également mis en évidence la relevance physiopathologique des MPs en tant que vecteur d'échanges transcellulaires d'un message de dysfonctions vasculaires dans les pathologies étudiées. Il serait donc intéressant de pouvoir cibler directement les MPs. Cependant, les mécanismes impliqués dans la libération des MPs dépendent de l'origine

cellulaire et de la stimulation appliquée. L'inhibition spécifique de la formation des MPs devient dès lors compliquée car les acteurs impliqués dans la formation des MPs (kinases, phosphatases, calcium) sont ubiquitaires et le ciblage spécifique de ces acteurs est impossible à l'heure actuelle.

Egalement, nous ne connaissons pas encore exactement les différentes interactions entre les MPs et leurs cellules cibles, et les récepteurs impliqués, et les effets induits par les MPs. Des analyses du transcriptome, du protéome et des ARNmi sont ainsi nécessaires pour identifier tous les composants des MPs et accroître nos connaissances dans les effets biologiques que les MPs peuvent induire.

La compréhension du rôle précis des MPs dans les fonctions cardio-vasculaires peut être utile non seulement dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques, mais peut également avoir des implications dans les traitements futurs de ces pathologies.

ANNEXES

Tableau 5 : Anticorps utilisés en Western Blot.

Anticorps primaire	Références	Espèce	Dilution	PM (kDa)	Fournisseur
β -Actine	A5316	mouse	1/2000	42	Sigma
Akt	9272	rabbit	1/1000	60	Cell Signaling
phospho-Akt (Ser 473)	4058	rabbit	1/1000	60	Cell Signaling
AMPK	2532	rabbit	1/1000	62	Cell Signaling
Cavéoline-1	610407	mouse	1/1000	22	BD Biosciences
phospho-cavéoline-1 (Tyr 14)	3251	rabbit	1/1000	23/25	Cell Signaling
COX-1	sc-1754	goat	1/500	72	Santa Cruz
COX-2	610203	mouse	1/500	70	BD Biosciences
Cycline D ₁	556470	mouse	1/500	36	BD Biosciences
FAK	06-543	rabbit	1/500	116	Cell Signaling
phospho-FAK (Tyr 925)	3284	rabbit	1/500	125	Cell Signaling
Flt1	sc-31173	goat	1/500	180	Santa Cruz
eNOS	610297	mouse	1/1000	140	BD Biosciences
phospho-eNOS (Thr 495)	9574	rabbit	1/1000	140	Cell Signaling
phospho-eNOS (Ser 1177)	9571	rabbit	1/1000	140	Cell Signaling
gp91 ^{phox}	611415	mouse	1/500	58	BD Biosciences
HIF-1 α	sc-53546	mouse	1/200	132	Santa Cruz
ICAM-1	sc-7891	rabbit	1/500	85/110	Santa Cruz
phospho-I κ B (Ser32/36)	12500-06A	mouse	1/1000	40	US Biological
Integrine α 5	sc-10729	rabbit	1/500	150	Santa Cruz
p42/44 MAPK	9102	rabbit	1/500	42/44	Cell Signaling
phospho-p42/44 MAPK	9101	rabbit	1/500	42/44	Cell Signaling
MMP-2	sc-6838	goat	1/500	63/72	Santa Cruz
PECAM-1	sc-1506R	rabbit	1/500	130	Santa Cruz
Tubuline	sc-31779	goat	1/500	55	Santa Cruz
VEGF	sc-507	rabbit	1/500	21/42	Santa Cruz
Anticorps secondaire	Références		Dilution		Fournisseur
Rabbit anti-goat	A5420		1/1000		Sigma
Goat anti-rabbit IgG	31460		1/2000		Thermo scientific
Anti-mouse	31430		1/5000		Thermo scientific

Tableau 6 : Composition des solutions salines de Krebs et hyperpotassique.

	Krebs Aorte	Krebs Artère pulmonaire	KCL
Produits	Concentration (mM)	Concentration (mM)	Concentration (mM)
NaCl	130	118,4	55,7
KCl	3,7	4,7	80
MgSO ₄	1,2	1,2	1,2
NaHCO ₃	14,9	25	14,9
KH ₂ PO ₄	1,2	1,2	1,2
CaCl ₂	1,6	2,5	1,6
Glucose	11	11,1	11

BIBLIOGRAPHIE

1. Carmeliet P (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9(6):653-660.
2. Barnes PJ and Liu SF (1995) Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev* 47(1):87-131.
3. Bolotina VM (2004) Store-operated channels: diversity and activation mechanisms. *Sci STKE* 2004(243):pe34.
4. Pozzan T, Rizzuto R, Volpe P and Meldolesi J (1994) Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol Rev* 74(3):595-636.
5. Somlyo AP and Somlyo AV (2003) Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83(4):1325-1358.
6. Katsuki S and Murad F (1977) Regulation of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate and guanosine cyclic 3',5'-monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle. *Mol Pharmacol* 13(2):330-341.
7. Friebe A and Koesling D (2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* 93(2):96-105.
8. Nakashima S, Tohmatsu T, Hattori H, Okano Y and Nozawa Y (1986) Inhibitory action of cyclic GMP on secretion, polyphosphoinositide hydrolysis and calcium mobilization in thrombin-stimulated human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 135(3):1099-1104.
9. Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA and Lincoln TM (1991) Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 40(6):923-931.
10. Furukawa K, Ohshima N, Tawada-Iwata Y and Shigekawa M (1991) Cyclic GMP stimulates Na⁺/Ca²⁺ exchange in vascular smooth muscle cells in primary culture. *J Biol Chem* 266:12337-12341.
11. Mery PF, Lohmann SM, Walter U and Fischmeister R (1991) Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(4):1197-1201.
12. Milbourne EA and Bygrave FL (1995) Do nitric oxide and cGMP play a role in calcium cycling? *Cell Calcium* 18(3):207-213.
13. Meisheri KD, Taylor CJ and Saneii H (1986) Synthetic atrial peptide inhibits intracellular calcium release in smooth muscle. *Am J Physiol* 250:C171-174.
14. Hirata M, Kohse KP, Chang CH, Ikebe T and Murad F (1990) Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 265(3):1268-1273.
15. Adelstein RS and Hathaway DR (1979) Role of calcium and cyclic adenosine 3':5' monophosphate in regulating smooth muscle contraction. Mechanisms of excitation-contraction coupling in smooth muscle. *Am J Cardiol* 44(5):783-787.

16. Feletou M and Vanhoutte PM (2000) Endothelium-dependent hyperpolarization of vascular smooth muscle cells. *Acta Pharmacol Sin* 21(1):1-18.
17. Busse R, Edwards G, Feletou M, Fleming I, Vanhoutte PM and Weston AH (2002) EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci* 23(8):374-380.
18. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM and Stern DM (1998) Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91(10):3527-3561.
19. Kibria G, Heath D, Smith P and Biggar R (1980) Pulmonary endothelial pavement patterns. *Thorax* 35(3):186-191.
20. Drexler H (1998) Factors involved in the maintenance of endothelial function. *Am J Cardiol* 82(10A):3S-4S.
21. Furchgott RF and Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789):373-376.
22. Furchgott RF and Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *Faseb J* 3:2007-2018.
23. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE and Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24):9265-9269.
24. Palmer RM, Ferrige AG and Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(6122):524-526.
25. Palmer RM, Ashton DS and Moncada S (1988) Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333(6174):664-666.
26. Alderton WK, Cooper CE and Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357(Pt 3):593-615.
27. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B and Rami J (1999) Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol Life Sci* 55(8-9):1078-1087.
28. Toda N, Ayajiki K and Okamura T (2007) Interaction of endothelial nitric oxide and angiotensin in the circulation. *Pharmacol Rev* 59(1):54-87.
29. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM (1999) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399(6736):601-605.
30. Schini-Kerth VB (1999) Vascular biosynthesis of nitric oxide: effect on hemostasis and fibrinolysis. *Transfus Clin Biol* 6(6):355-363.

31. Bunting S, Gryglewski R, Moncada S and Vane JR (1976) Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* 12(6):897-913.
32. Kawabe J, Ushikubi F and Hasebe N Prostacyclin in vascular diseases. - Recent insights and future perspectives. *Circ J* 74(5):836-843.
33. Fetalvero KM, Shyu M, Nomikos AP, Chiu YF, Wagner RJ, Powell RJ, Hwa J and Martin KA (2006) The prostacyclin receptor induces human vascular smooth muscle cell differentiation via the protein kinase A pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290(4):H1337-1346.
34. Fetalvero KM, Martin KA and Hwa J (2007) Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 82(1-4):109-118.
35. White DG and Martin W (1989) Differential control and calcium-dependence of production of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin by pig aortic endothelial cells. *Br J Pharmacol* 97(3):683-690.
36. Niwano K, Arai M, Tomaru K, Uchiyama T, Ohyama Y and Kurabayashi M (2003) Transcriptional stimulation of the eNOS gene by the stable prostacyclin analogue beraprost is mediated through cAMP-responsive element in vascular endothelial cells: close link between PGI₂ signal and NO pathways. *Circ Res* 93(6):523-530.
37. Radomski MW, Palmer RM and Moncada S (1987) Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 92(1):181-187.
38. Smyth EM and FitzGerald GA (2002) Human prostacyclin receptor. *Vitam Horm* 65:149-165.
39. Feletou M and Vanhoutte PM (2006) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(6):1215-1225.
40. Nagao T and Vanhoutte PM (1992) Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *J Physiol* 445:355-367.
41. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H and Takeshita A (2000) Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106(12):1521-1530.
42. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ and Weston AH (1998) K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396(6708):269-272.
43. Cohen RA and Vanhoutte PM (1995) Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* 92(11):3337-3349.
44. Bauersachs J, Popp R, Hecker M, Sauer E, Fleming I and Busse R (1996) Nitric oxide attenuates the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation* 94(12):3341-3347.

45. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K and Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332(6163):411-415.
46. Sabry S, Mondon F, Levy M, Ferre F and Dinh-Xuan AT (1995) Endothelial modulation of vasoconstrictor responses to endothelin-1 in human placental stem villi small arteries. *Br J Pharmacol* 115(6):1038-1042.
47. Zellers TM, McCormick J and Wu Y (1994) Interaction among ET-1, endothelium-derived nitric oxide, and prostacyclin in pulmonary arteries and veins. *Am J Physiol* 267(1 Pt 2):H139-147.
48. Mombouli JV and Vanhoutte PM (1999) Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. *J Mol Cell Cardiol* 31(1):61-74.
49. Li JM and Shah AM (2004) Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(5):R1014-1030.
50. Cai H and Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87(10):840-844.
51. Lekakis J, Abraham P, Balbarini A, Blann A, Boulanger CM, Cockcroft J, Cosentino F, Deanfield J, Gallino A, Ikonomidis I, Kremastinos D, Landmesser U, Protogerou A, Stefanadis C, Tousoulis D, Vassalli G, Vink H, Werner N, Wilkinson I and Vlachopoulos C Methods for evaluating endothelial function: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Peripheral Circulation. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*.
52. Wolf P (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol* 13:269-288.
53. Bastida E, Ordinas A, Escolar G and Jamieson GA (1984) Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation, and thrombogenesis. *Blood* 64:177-184.
54. Martinez MC, Tesse A, Zobairi F and Andriantsitohaina R (2005) Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288:H1004-1009.
55. Mostefai HA, Andriantsitohaina R and Martinez MC (2008) Plasma membrane microparticles in angiogenesis: role in ischemic diseases and in cancer. *Physiol Res* 57:311-320.
56. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A and Ratajczak MZ (2006) Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* 20:1487-1495.
57. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL and Ahn YS (2003) Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 109:175-180.

58. Pasquet JM, Dachary-Prigent J and Nurden AT (1996) Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur J Biochem* 239:647-654.
59. Miyoshi H, Umeshita K, Sakon M, Imajoh-Ohmi S, Fujitani K, Gotoh M, Oiki E, Kambayashi J and Monden M (1996) Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* 110:1897-1904.
60. Wiedmer T, Shattil SJ, Cunningham M and Sims PJ (1990) Role of calcium and calpain in complement-induced vesiculation of the platelet plasma membrane and in the exposure of the platelet factor Va receptor. *Biochemistry* 29:623-632.
61. Bevers EM, Tilly RH, Senden JM, Comfurius P, Zwaal RF (1989) Exposure of endogenous phosphatidylserine at the outer surface of stimulated platelets is reversed by restoration of aminophospholipid translocase activity. *Biochemistry* 28:2382-2387.
62. Bevers EM and Williamson PL (2010) Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett* 584:2724-2730.
63. Heemskerk JW, Vuist WM, Feijge MA, Reutelingsperger CP and Lindhout T (1997) Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets: evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca²⁺ responses. *Blood* 90:2615-2625.
64. Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM and Martinez MC (2001) Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated Ca²⁺ entry: role of actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 276:5134-5139.
65. Kunzelmann-Marche C, Freyssinet JM and Martinez MC (2002) Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity. Role of transient receptor potential channels and ERK pathway. *J Biol Chem* 277:19876-19881.
66. Yan R, Wang Z, Yuan Y, Cheng H and Dai K (2009) Role of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of platelet procoagulant activity. *Arch Biochem Biophys* 485:41-48.
67. Cauwenberghs S, Feijge MA, Harper AG, Sage SO, Curvers J and Heemskerk JW (2006) Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett* 580:5313-5320.
68. Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
69. Beyer C and Pisetsky DS (2010) The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol* 6:21-29.
70. Hristov M, Erl W, Linder S and Weber PC (2004) Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro. *Blood* 104:2761-2766.

71. Sebbagh M, Renvoize C, Hamelin J, Riche N, Bertoglio J and Breard J (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat Cell Biol* 3:346-352.
72. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A and Olson MF (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol* 3:339-345.
73. Sapet C, Simoncini S, Loriod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, Dignat-George F and Anfosso F (2006) Thrombin-induced endothelial microparticle generation: identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood* 108:1868-1876.
74. Zauli G and Secchiero P (2006) The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 17:245-257.
75. Simoncini S, Njock MS, Robert S, Camoin-Jau L, Sampol J, Harle JR, Nguyen C, Dignat-George F and Anfosso F (2009) TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ Res* 104:943-951.
76. Banfi C, Brioschi M, Wait R, Begum S, Gianazza E, Pirillo A, Mussoni L and Tremoli E (2005) Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics* 5:4443-4455.
77. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C and Ahn YS (2004) New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* 53:210-230.
78. Garcia BA, Smalley DM, Cho H, Shabanowitz J, Ley K and Hunt DF (2005) The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res* 4:1516-1521.
79. Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, Ruat M and Freyssinet JM (2006) Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 108:3012-3020.
80. Miguet L, Pacaud K, Felden C, Hugel B, Martinez MC, Freyssinet JM, Herbrecht R, Potier N, van Dorsselaer A and Mauvieux L (2006) Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics* 6:153-171.
81. Bernimoulin M, Waters EK, Foy M, Steele BM, Sullivan M, Falet H, Walsh MT, Barteneva N, Geng JG, Hartwig JH, Maguire PB and Wagner DD (2009) Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J Thromb Haemost* 7:1019-1028.
82. Dean WL, Lee MJ, Cummins TD, Schultz DJ and Powell DW (2009) Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost* 102:711-718.

83. Liu ML, Reilly MP, Casasanto P, McKenzie SE and Williams KJ (2007) Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:430-435.
84. Forlow SB, McEver RP and Nollert MU (2000) Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* 95:1317-1323.
85. Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, Henrion D, Martinez MC and Andriantsitohaina R (2007) Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *Faseb J* 21:2735-2741.
86. Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R and Martinez MC (2009) Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 30:580-588.
87. Tesse A, Martinez MC, Hugel B, Chalupsky K, Muller CD, Meziani F, Mitolo-Chieppa D, Freyssinet JM and Andriantsitohaina R (2005) Upregulation of proinflammatory proteins through NF-kappaB pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2522-2527.
88. Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, Ratajczak J, Gaulton GN and Ratajczak MZ (2003) Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *Aids* 17:33-42.
89. Barry OP, Pratico D, Savani RC and FitzGerald GA (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 102:136-144.
90. Breimo ES and Osterud B (2005) Generation of tissue factor-rich microparticles in an ex vivo whole blood model. *Blood Coagul Fibrinolysis* 16:399-405.
91. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B and Camussi G (2007) Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 110:2440-2448.
92. Rank A, Nieuwland R, Crispin A, Grutzner S, Iberer M, Toth B and Pihusch R (2011) Clearance of platelet microparticles in vivo. *Platelets* 22(2):111-116.
93. Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, Mastronardi ML, Agouni A, Meslier N, Racineux JL, Martinez MC, Trzepizur W and Andriantsitohaina R (2010) Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am J Pathol* 177:974-983.
94. Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, Savineau JP, Andriantsitohaina R and Martinez MC (2010) Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 182:261-268.

95. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A and Mallat Z (2001) Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 104:2649-2652.
96. Martin S, Tesse A, Hugel B, Martinez MC, Morel O, Freyssinet JM and Andriantsitohaina R (2004) Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation* 109:1653-1659.
97. Vanwijk MJ, Svedas E, Boer K, Nieuwland R, Vanbavel E and Kublickiene KR (2002) Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* 187:1686-1693.
98. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, Heymes C, Martinez MC and Andriantsitohaina R (2008) Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* 173:1210-1219.
99. Helal O, Defoort C, Robert S, Marin C, Lesavre N, Lopez-Miranda J, Riserus U, Basu S, Lovegrove J, McMonagle J, Roche HM, Dignat-George F and Lairon D (2010) Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: Relationship with oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.
100. Meziani F, Tesse A, David E, Martinez MC, Wangestein R, Schneider F and Andriantsitohaina R (2006) Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility. *Am J Pathol* 169:1473-1483.
101. Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A and Dolo V (2002) Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* 160:673-680.
102. Benameur T, Tual-Chalot S, Andriantsitohaina R and Martinez MC PPARalpha is essential for microparticle-induced differentiation of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells and angiogenesis. *PLoS One* 5:e12392.
103. Chahed S, Leroyer AS, Benzerroug M, Gaucher D, Georgescu A, Picaud S, Silvestre JS, Gaudric A, Tedgui A, Massin P and Boulanger CM Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes* 59:694-701.
104. Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, Castier Y, Leseche G, Devue C, Duriez M, Brandes RP, Lutgens E, Tedgui A and Boulanger CM (2008) CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* 52:1302-1311.

105. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, Asfar P, Martinez MC and Andriantsitohaina R (2008) Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med* 178:1148-1155.
106. Soriano AO, Jy W, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, Horstman LL, Kett DH, Schein RM and Ahn YS (2005) Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 33:2540-2546.
107. Benameur T, Andriantsitohaina R and Martinez MC (2009) Therapeutic potential of plasma membrane-derived microparticles. *Pharmacol Rep* 61:49-57.
108. Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R and Martinez MC Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One* 5:e12688.
109. Badesch DB, Champion HC, Sanchez MA, Hoeper MM, Loyd JE, Manes A, McGoon M, Naeije R, Olschewski H, Oudiz RJ and Torbicki A (2009) Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl):S55-66.
110. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E and Simonneau G (2006) Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 173(9):1023-1030.
111. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N and Souza R (2009) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl):S43-54.
112. Fishman AP (2001) Clinical classification of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 22(3):385-391, vii.
113. Park MH (2010) Pharmacotherapeutic options for pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Hypertension* 1(1):1-21.
114. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK and et al. (1987) Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* 107(2):216-223.
115. McLaughlin VV and McGoon MD (2006) Pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 114(13):1417-1431.
116. Perros F and Humbert M (2005) [Physiopathology of pulmonary arterial hypertension. Cellular and molecular aspects]. *Presse Med* 34(3):232-242.

117. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF and Rabinovitch M (2004) Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43(12 Suppl S):13S-24S.
118. Jeffery TK and Morrell NW (2002) Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 45(3):173-202.
119. Budhiraja R, Tuder RM and Hassoun PM (2004) Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 109(2):159-165.
120. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM and Loyd JE (1992) An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 327(2):70-75.
121. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP and Stewart DJ (1993) Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328(24):1732-1739.
122. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P and Langleben D (1991) Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med* 114(6):464-469.
123. Giaid A and Saleh D (1995) Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 333(4):214-221.
124. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T and Yeghiazarians Y (2008) Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177(11):1268-1275.
125. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, Zupan M, Canuet M, Grunebaum L, Brunette A, Desprez D, Chabot F, Weitzenblum E, Freyssinet JM, Chaouat A and Toti F (2008) Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 177(5):536-543.
126. Gaine SP and Rubin LJ (1998) Primary pulmonary hypertension. *Lancet* 352(9129):719-725.
127. Rubin LJ (2006) Pulmonary arterial hypertension. *Proc Am Thorac Soc* 3(1):111-115.
128. Doyle RL, McCrory D, Channick RN, Simonneau G and Conte J (2004) Surgical treatments/interventions for pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 126(1 Suppl):63S-71S.
129. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ and McMurtry IF (2009) Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(6):L1013-1032.
130. Jennum P and Riha RL (2009) Epidemiology of sleep apnoea/hypopnoea syndrome and sleep-disordered breathing. *Eur Respir J* 33(4):907-914.

131. Kushida CA, Littner MR, Morgenthaler T, Alessi CA, Bailey D, Coleman J, Jr., Friedman L, Hirshkowitz M, Kapen S, Kramer M, Lee-Chiong T, Loube DL, Owens J, Pancer JP and Wise M (2005) Practice parameters for the indications for polysomnography and related procedures: an update for 2005. *Sleep* 28(4):499-521.
132. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ and O'Donnell CP Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev* 90(1):47-112.
133. Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E and Agusti AG (2005) Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet* 365(9464):1046-1053.
134. Peker Y, Kraiczi H, Hedner J, Loth S, Johansson A and Bende M (1999) An independent association between obstructive sleep apnoea and coronary artery disease. *Eur Respir J* 14(1):179-184.
135. Svatikova A, Wolk R, Wang HH, Otto ME, Bybee KA, Singh RJ and Somers VK (2004) Circulating free nitrotyrosine in obstructive sleep apnea. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(2):R284-287.
136. Atkeson A, Yeh SY, Malhotra A and Jelic S (2009) Endothelial function in obstructive sleep apnea. *Prog Cardiovasc Dis* 51(5):351-362.
137. Budhiraja R, Parthasarathy S and Quan SF (2007) Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med* 3(4):409-415.
138. Geiser T, Buck F, Meyer BJ, Bassetti C, Haeberli A and Gugger M (2002) In vivo platelet activation is increased during sleep in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Respiration* 69(3):229-234.
139. Ayers L, Ferry B, Craig S, Nicoll D, Stradling JR and Kohler M (2009) Circulating cell-derived microparticles in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 33(3):574-580.
140. Jelic S, Lederer DJ, Adams T, Padeletti M, Colombo PC, Factor P and Le Jemtel TH (2009) Endothelial repair capacity and apoptosis are inversely related in obstructive sleep apnea. *Vasc Health Risk Manag* 5:909-920.
141. Yun CH, Jung KH, Chu K, Kim SH, Ji KH, Park HK, Kim HC, Lee ST, Lee SK and Roh JK Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J Clin Neurol* 6(2):89-98.
142. Trzepizur W, Priou P, Paris A, Nardi J, Tual-Chalot S, Meslier N, Urban T, Andriantsitohaina R, Martinez MC and Gagnadoux F Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 37(5):1293-1295.
143. Jenkinson C, Davies RJ, Mullins R and Stradling JR (1999) Comparison of therapeutic and subtherapeutic nasal continuous positive airway pressure for obstructive sleep apnoea: a randomised prospective parallel trial. *Lancet* 353(9170):2100-2105.

144. Massie CA, McArdle N, Hart RW, Schmidt-Nowara WW, Lankford A, Hudgel DW, Gordon N and Douglas NJ (2003) Comparison between automatic and fixed positive airway pressure therapy in the home. *Am J Respir Crit Care Med* 167(1):20-23.
145. Trzepizur W, Gagnadoux F, Abraham P, Rousseau P, Meslier N, Saumet JL and Racineux JL (2009) Microvascular endothelial function in obstructive sleep apnea: Impact of continuous positive airway pressure and mandibular advancement. *Sleep Med* 10(7):746-752.
146. Weaver TE and Grunstein RR (2008) Adherence to continuous positive airway pressure therapy: the challenge to effective treatment. *Proc Am Thorac Soc* 5(2):173-178.
147. Lin HS, Prasad AS, Pan CJ and Rowley JA (2007) Factors associated with noncompliance to treatment with positive airway pressure. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 133(1):69-72.
148. Mehta A, Qian J, Petocz P, Darendeliler MA and Cistulli PA (2001) A randomized, controlled study of a mandibular advancement splint for obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 163(6):1457-1461.
149. Engleman HM, McDonald JP, Graham D, Lello GE, Kingshott RN, Coleman EL, Mackay TW and Douglas NJ (2002) Randomized crossover trial of two treatments for sleep apnea/hypopnea syndrome: continuous positive airway pressure and mandibular repositioning splint. *Am J Respir Crit Care Med* 166(6):855-859.
150. Tesse A, Meziani F, David E, Carusio N, Kremer H, Schneider F and Andriantsitohaina R (2007) Microparticles from preeclamptic women induce vascular hyporeactivity in vessels from pregnant mice through an overproduction of NO. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293:H520-525.
151. Bonnet S, Dubuis E, Vandier C, Martin S, Marthan R and Savineau JP (2002) Reversal of chronic hypoxia-induced alterations in pulmonary artery smooth muscle electromechanical coupling upon air breathing. *Cardiovasc Res* 53:1019-1028.
152. Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T and Kodama T (2005) A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 12:138-142.
153. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.
154. Souchar JP, Vergely C, Rochette L (2007) Radicaux libres et stress oxydant radicalaire. Technique permettant la mise en évidence d'un stress oxydatif au niveau vasculaire. *Biologie et pathologie du cœur et des vaisseaux* p.311-329.
155. Lee HB and Blaufox MD (1985) Blood volume in the rat. *J Nucl Med* 26:72-76.
156. Andriambelolon E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC and Andriantsitohaina R (1997) Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol* 120:1053-1058.

157. Pauvert O, Marthan R and Savineau J (2000) NO-induced modulation of calcium-oscillations in pulmonary vascular smooth muscle. *Cell Calcium* 27:329-338.
158. Dhein S, Giessler C, Heinroth-Hoffmann I, Leineweber K, Seyfarth T and Brodde OE (2002) Changes in alpha(1)-adrenergic vascular reactivity in monocrotaline-treated rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365:87-95.
159. Diehl P, Aleker M, Helbing T, Sossong V, Germann M, Sorichter S, Bode C and Moser M Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension. *J Thromb Thrombolysis* 31:173-179.
160. Toporsian M, Govindaraju K, Nagi M, Eidelman D, Thibault G and Ward ME (2000) Downregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after prolonged hypoxia in vivo. *Circ Res* 86:671-675.
161. Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Ohashi Y, Rikitake Y, Inoue N, Hirata KI, Hayashi Y, Itoh H and Yokoyama M (2001) Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension* 37:322-327.
162. Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, Morris KG, Jr., Hepler LK, Sato K, LeCras TD, Abman SH, Weinberger HD, Huang PL, McMurtry IF and Rodman DM (1999) The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest* 103:291-299.
163. Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B and Busse R (1998) Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res* 82:686-695.
164. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A and Sessa WC (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399:597-601.
165. Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT and Kemp BE (2001) Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 276:17625-17628.
166. Matsubara M, Hayashi N, Jing T and Titani K (2003) Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. *J Biochem* 133:773-781.
167. Murata T, Sato K, Hori M, Ozaki H and Karak H (2002) Decreased endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) activity resulting from abnormal interaction between eNOS and its regulatory proteins in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Biol Chem* 277(46):44085-44092.
168. Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR and Kemp BE (1999) AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 443(3):285-289.

169. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE and Busse R (2001) Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 88:E68-75.
170. Fulton D, Fontana J, Sowa G, Gratton JP, Lin M, Li KX, Michell B, Kemp BE, Rodman D and Sessa WC (2002) Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *J Biol Chem* 277(6):4277-4284.
171. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P and Michel T (1997) Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 272(41):25907-25912.
172. Govers R, Bevers L, de Bree P and Rabelink TJ (2002) Endothelial nitric oxide synthase activity is linked to its presence at cell-cell contacts. *Biochem J* 361:193-201.
173. Achcar RO, Demura Y, Rai PR, Taraseviciene-Stewart L, Kasper M, Voelkel NF and Cool CD (2006) Loss of caveolin and heme oxygenase expression in severe pulmonary hypertension. *Chest* 129:696-705.
174. Mathew R, Huang J and Gewitz MH (2007) Pulmonary artery hypertension: caveolin-1 and eNOS interrelationship: a new perspective. *Cardiol Rev* 15:143-149.
175. Mathew R, Huang J, Shah M, Patel K, Gewitz M and Sehgal PB (2004) Disruption of endothelial-cell caveolin-1alpha/raft scaffolding during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 110:1499-1506.
176. Li H and Forstermann U (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190:244-254.
177. Herget J, Wilhelm J, Novotna J, Eckhardt A, Vytasek R, Mrazkova L and Ostadal M (2000) A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res* 49:493-501.
178. Fresquet F, Pourageaud F, Leblais V, Brandes RP, Savineau JP, Marthan R and Muller B (2006) Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *Br J Pharmacol* 148:714-723.
179. Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tudor RM, Hopken MW, Flores SC and Voelkel NF (2004) Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 169:764-769.
180. Nozik-Grayck E and Stenmark KR (2007) Role of reactive oxygen species in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Adv Exp Med Biol* 618:101-112.
181. Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JS and Folz RJ (2006) Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L2-10.

182. Weissmann N, Zeller S, Schafer RU, Turowski C, Ay M, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W and Grimminger F (2006) Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:505-513.
183. Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, Boer C, Musters RJ, van Hardeveld C, Paulus WJ and Simonides WS (2007) Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 75:770-781.
184. Hoshikawa Y, Ono S, Suzuki S, Tanita T, Chida M, Song C, Noda M, Tabata T, Voelkel NF and Fujimura S (2001) Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol* 90:1299-1306.
185. Jankov RP, Kantores C, Pan J and Belik J (2008) Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294:L233-245.
186. Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P and Chabrier PE (1991) Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 87:155-162.
187. Rodat-Despoix L, Crevel H, Marthan R, Savineau JP and Guibert C (2008) Heterogeneity in 5-HT-induced contractile and proliferative responses in rat pulmonary arterial bed. *J Vasc Res* 45:181-192.
188. Abe K, Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Matsumoto Y, Hattori T, Nakashima Y, Kaibuchi K, Sueishi K and Takeshit A (2004) Long-term treatment with a Rho-kinase inhibitor improves monocrotaline-induced fatal pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 94(3):385-393.
189. Keegan A, Morecroft I, Smillie D, Hicks MN and MacLean MR (2001) Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)-receptor antagonist GR127935. *Circ Res* 89:1231-1239.
190. McCulloch KM, Docherty C and MacLean MR (1998) Endothelin receptors mediating contraction of rat and human pulmonary resistance arteries: effect of chronic hypoxia in the rat. *Br J Pharmacol* 123(8):1621-1630.
191. Delannoy E, Courtois A, Freund-Michel V, Leblais V, Marthan R and Muller B (2010) Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res* 85:582-592.
192. Billaud M, Dahan D, Marthan R, Savineau JP and Guibert C (2011) Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension. *Respir Res* 12:30.

193. Billaud M, Marthan R, Savineau JP and Guibert C (2009) Vascular smooth muscle modulates endothelial control of vasoreactivity via reactive oxygen species production through myoendothelial communications. *PLoS one* 4(7):e6432.
194. Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R and Martinez MC (2011) Microvesicles: intercellular vectors of biological messages. *Mol Interv* 11:88-94.
195. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D and Andriantsitohaina R (2011) Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci*.
196. Pelletier-Fleury N, Meslier N, Gagnadoux F, Person C, Rakotonanahary D, Ouksel H, Fleury B and Racineux JL (2004) Economic arguments for the immediate management of moderate-to-severe obstructive sleep apnoea syndrome. *Eur Respir J* 23:53-60.
197. Johns MW (1991) A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 14:540-545.
198. Fletcher EC (1995) The relationship between systemic hypertension and obstructive sleep apnea: facts and theory. *Am J Med* 98:118-128.
199. Peppard PE, Young T, Palta M and Skatrud J (2000) Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Engl J Med* 342:1378-1384.
200. Brooks D, Horner RL, Kozar LF, Render-Teixeira CL and Phillipson EA (1997) Obstructive sleep apnea as a cause of systemic hypertension. Evidence from a canine model. *J Clin Invest* 99:106-109.
201. Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, 3rd and Unger T (1992) Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertension* 19:555-561.
202. Imadojemu VA, Gleeson K, Gray KS, Sinoway LI and Leuenberger UA (2002) Obstructive apnea during sleep is associated with peripheral vasoconstriction. *Am J Respir Crit Care Med* 165:61-66.
203. O'Donnell CP, Allan L, Atkinson P and Schwartz AR (2002) The effect of upper airway obstruction and arousal on peripheral arterial tonometry in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 166(7):965-971.
204. Ray CJ, Abbas MR, Coney AM and Marshall JM (2002) Interactions of adenosine, prostaglandins and nitric oxide in hypoxia-induced vasodilatation: in vivo and in vitro studies. *J Physiol* 544:195-209.
205. Aalkjaer C and Poston L (1996) Effects of pH on vascular tension: which are the important mechanisms? *J Vasc Res* 33:347-359.
206. Grote L, Kraiczi H and Hedner J (2000) Reduced alpha- and beta(2)-adrenergic vascular response in patients with obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med* 162:1480-1487.

207. Kraiczi H, Hedner J, Peker Y and Carlson J (2000) Increased vasoconstrictor sensitivity in obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol* 89:493-498.
208. Phillips SA, Olson EB, Lombard JH and Morgan BJ (2006) Chronic intermittent hypoxia alters NE reactivity and mechanics of skeletal muscle resistance arteries. *J Appl Physiol* 100:1117-1123.
209. Snow JB, Kitzis V, Norton CE, Torres SN, Johnson KD, Kanagy NL, Walker BR and Resta TC (2008) Differential effects of chronic hypoxia and intermittent hypocapnic and eucapnic hypoxia on pulmonary vasoreactivity. *J Appl Physiol* 104:110-118.
210. Allahdadi KJ, Duling LC, Walker BR and Kanagy NL (2008) Eucapnic intermittent hypoxia augments endothelin-1 vasoconstriction in rats: role of PKCdelta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H920-927.
211. Tahawi Z, Orolinova N, Joshua IG, Bader M and Fletcher EC (2001) Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *J Appl Physiol* 90:2007-2013; discussion 2000.
212. Russell A and Watts S (2000) Vascular reactivity of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 294:598-604.
213. Kimura H, Nijjima M, Abe Y, Edo H, Sakabe H, Kojima A, Hasako K, Masuyama S, Tatsumi K and Kuriyama T (1998) Compensatory excretion of prostacyclin and thromboxane metabolites in obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med* 37:127-133.
214. Prieto D Nitric oxide-mediated negative regulation of cyclooxygenase-2 induction in vascular inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H600-601.
215. Meziani F, Tesse A and Andriantsitohaina R (2008) Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep* 60:75-84.
216. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, Colombo PC, Basner RC, Factor P and LeJemtel TH (2008) Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 117:2270-2278.
217. Lamon BD, Upmacis RK, Deeb RS, Koyuncu H and Hajjar DP Inducible nitric oxide synthase gene deletion exaggerates MAPK-mediated cyclooxygenase-2 induction by inflammatory stimuli. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H613-623.
218. Chorostowska-Wynimko J, Radomska D, Plywaczewski R, Jonczak L, Stepniewska A, Gorecka D and Skopinska-Rozewska E (2005) Disturbed angiogenic activity in sera from obstructive sleep apnea patients. *J Physiol Pharmacol* 56 Suppl 4:71-77.
219. Takahashi S, Nakamura Y, Nishijima T, Sakurai S and Inoue H (2005) Essential roles of angiotensin II in vascular endothelial growth factor expression in sleep apnea syndrome. *Respir Med* 99(9):1125-1131.
220. Minchenko A, Bauer T, Salceda S and Caro J (1994) Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *Lab Invest* 71(3):374-379.

221. Voelkel NF, Vandivier RW and Tuder RM (2006) Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290:L209-221.
222. Kasasbeh E, Chi DS and Krishnaswamy G (2006) Inflammatory aspects of sleep apnea and their cardiovascular consequences. *South Med J* 99:58-67; quiz 68-59, 81.
223. Gozal D, Lipton AJ and Jones KL (2002) Circulating vascular endothelial growth factor levels in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep* 25:59-65.
224. Imagawa S, Yamaguchi Y, Higuchi M, Neichi T, Hasegawa Y, Mukai HY, Suzuki N, Yamamoto M and Nagasawa T (2001) Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea--hypopnea syndrome. *Blood* 98:1255-1257.
225. Schulz R, Hummel C, Heinemann S, Seeger W and Grimminger F (2002) Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 165(1):67-70.
226. Teramoto S, Kume H, Yamamoto H, Ishii T, Miyashita A, Matsuse T, Akishita M, Toba K and Ouchi Y (2003) Effects of oxygen administration on the circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Intern Med* 42:681-685.
227. Miyazawa-Hoshimoto S, Takahashi K, Bujo H, Hashimoto N and Saito Y (2003) Elevated serum vascular endothelial growth factor is associated with visceral fat accumulation in human obese subjects. *Diabetologia* 46(11):1483-1488.
228. Gunsilius E, Petzer A, Stockhammer G, Nussbaumer W, Schumacher P, Clausen J and Gastl G (2000) Thrombocytes are the major source for soluble vascular endothelial growth factor in peripheral blood. *Oncology* 58:169-174.
229. Lavie L, Kraiczi H, Hefetz A, Ghandour H, Perelman A, Hedner J and Lavie P (2002) Plasma vascular endothelial growth factor in sleep apnea syndrome: effects of nasal continuous positive air pressure treatment. *Am J Respir Crit Care Med* 165:1624-1628.
230. Valipour A, Litschauer B, Mittermayer F, Rauscher H, Burghuber OC and Wolzt M (2004) Circulating plasma levels of vascular endothelial growth factor in patients with sleep disordered breathing. *Respir Med* 98:1180-1186.
231. Mause SF, Ritzel E, Liehn EA, Hristov M, Bidzhekov K, Muller-Newen G, Soehnlein O and Weber C Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation* 122:495-506.
232. Salani D, Taraboletti G, Rosano L, Di Castro V, Borsotti P, Giavazzi R and Bagnato A (2000) Endothelin-1 induces an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Am J Pathol* 157:1703-1711.
233. Steiner S, Schueller PO, Schulze V and Strauer BE Occurrence of coronary collateral vessels in patients with sleep apnea and total coronary occlusion. *Chest* 137:516-520.
234. Wahlin-Larsson B, Ulfberg J, Aulin KP and Kadi F (2009) The expression of vascular endothelial growth factor in skeletal muscle of patients with sleep disorders. *Muscle Nerve* 40:556-561.

PUBLICATIONS & MANUSCRIT

Revue :

Microvesicles: intercellular vector of biological messages

Microvesicles: Intercellular Vectors of Biological Messages

Simon Tual-Chalot, Daniela Leonetti, Ramaroson Andriantsitohaina, and M. Carmen Martinez

INSERM, U694, Faculté de Médecine, Université d'Angers, Angers, France

Cells communicate directly by cell-cell contact and indirectly via the release of mediators. But gaining a greater appreciation recently is the identification and characterization of intercellular communication through the secretion of microvesicles (MVs). MVs—small vesicles that comprise microparticles (MPs) and exosomes (1)—released from a wide variety of cells, can be considered micro-messengers. Whereas exosomes are released into the extracellular compartment by exocytosis, MPs are shed from the blebbing plasma membrane, and the composition and effects of both on target cells differ depending on the cell from which originate and the type of stimulus involved in their formation. MVs are obtained after several steps of centrifugation, whereby MPs are defined as the MVs obtained by centrifugation at $< 100,000 \times g$, whereas exosomes are isolated by centrifugation at $> 100,000 \times g$. Because the processes by which exosomes and MPs work are different, some researchers have claimed that such broad observations impede the defining and understanding of MV actions (2).

MPs are small vesicles, heterogeneous in size [(0.05–1 μm , a characteristic which is often used to distinguish MPs from exosomes ($< 0.1 \mu\text{m}$) and platelets ($> 1 \mu\text{m}$), respectively] and composition, with pro-coagulant and pro-inflammatory properties. Although all cell types can theoretically release MPs, the determination of their origins has established that MPs can be released from the plasma membrane of circulating cells (such as platelets, erythrocytes, T and B cells, and monocytes); cells from the vascular wall (endothelial and smooth muscle cells); and tumor cells (3, 4). Even if the mechanisms governing MP formation are complex and not well understood, it is well appreciated that cell activation and apoptosis are the two main cellular processes that lead to their formation (Figure 1).

During cell activation by agonists or different stresses, MP formation is dependent on the influx of extracellular calcium and is associated with calpain activation, which is required for cytoskeleton disruption (5). In addition, blebbing and microvesiculation are often, but not always, preceded by the loss of membrane asymmetry resulting from local perturbation of the bilayer structure and the appearance of aminophospholipids such as phosphatidylserine, which is normally located in the inner leaflet, to the outer leaflet (6). The other main process of MP formation is apoptosis. Whereas MP blebbing occurs mainly during the early phases of apoptosis, apoptotic bodies are produced in the late stages of death process. Apoptotic bodies are larger than MPs and represent the compacted or condensed remnants of the shrinking apoptotic cells (7).

A better understanding of the mechanisms governing cell activation- and apoptosis-induced MP release would contribute to emergent therapeutic approaches that could decrease MP production in pathological conditions. The main limitation concerning studies related to MP formation, however, is that they are performed *in vitro* and very often with pharmacological inhibitors. It remains to be elucidated whether the same pathways are involved for the *in vivo* production of MPs.

An important parameter that determines the biological effects of MPs is their protein and lipid compositions, which may vary depending on the cell they originate from and the type of stimulus involved in their formation. MPs contain membrane, cytoplasmic, and nuclear constituents of their precursor cells, allowing for their characterization using antibodies directed against specific epitopes.

Exosomes are small, natural membrane vesicles released by a wide variety of cell types into the extracellular compartment by exocytosis. Exosomes were described initially during the secretion of MVs of endocytic origin by reticulocytes (8). Indeed, exosomes are formed within endosomes by invagination of the limiting membranes, resulting in the formation of multivesicular bodies. Subsequently, multivesicular bodies fuse with the plasma membrane and release exosomes into the extracellular environment (9). Secretion of exosomes can be spontaneous or induced depending on the cell type. Reticulocytes, T cells, mastocytes, and resting B cells secrete detectable levels of exosomes following the activation of a cell surface receptor. In contrast, dendritic cells, macrophages, and epithelial cells constitutively secrete exosomes *in vitro*, as do most tumor cells (10). The identification of MVs as exosomes is based on morphological and biochemical criteria. Thus, exosomes are obtained after high speed centrifugation (10); to confirm their presence and purity, immunoblotting analysis with antibody directed against exosomal markers like tetraspanins, heat shock protein (HSP)70, HSP90, or elongation factor-1 α are needed. Also, electron microscopy or flow cytometry may be used for detection of exosomes, although there are claims that exosomes would be too small to be detected by flow cytometry.

Although exosomes do not contain any proteins from nuclear, mitochondrial, endoplasmic reticulum or Golgi apparatus, as a consequence of their endosomal origin, they are also selectively enriched in mRNA and miRNA, allowing genetic exchange between cells (11). Because MVs “hijack” the cytoplasm, capturing cytoplasm components and miRNA prior to release from the cell, the packaging of miRNAs in the cell may be random (12).

The mechanisms by which MPs and exosomes transfer biological information to recipient cells are not completely understood, but they may involve direct interaction with surface-expressed ligands or the transfer of surface receptors, proteins, mRNA, miRNA, and bioactive lipids. Moreover, they may serve as vehicles to transfer infectious particles (e.g., “Trojan horse” mechanisms) and to deliver intact organelles. Up to now, four mechanisms (ligand-receptor interaction, transfer, fusion, and internalization) by which information is transmitted by MVs have been reported (Figure 1, Table 1).

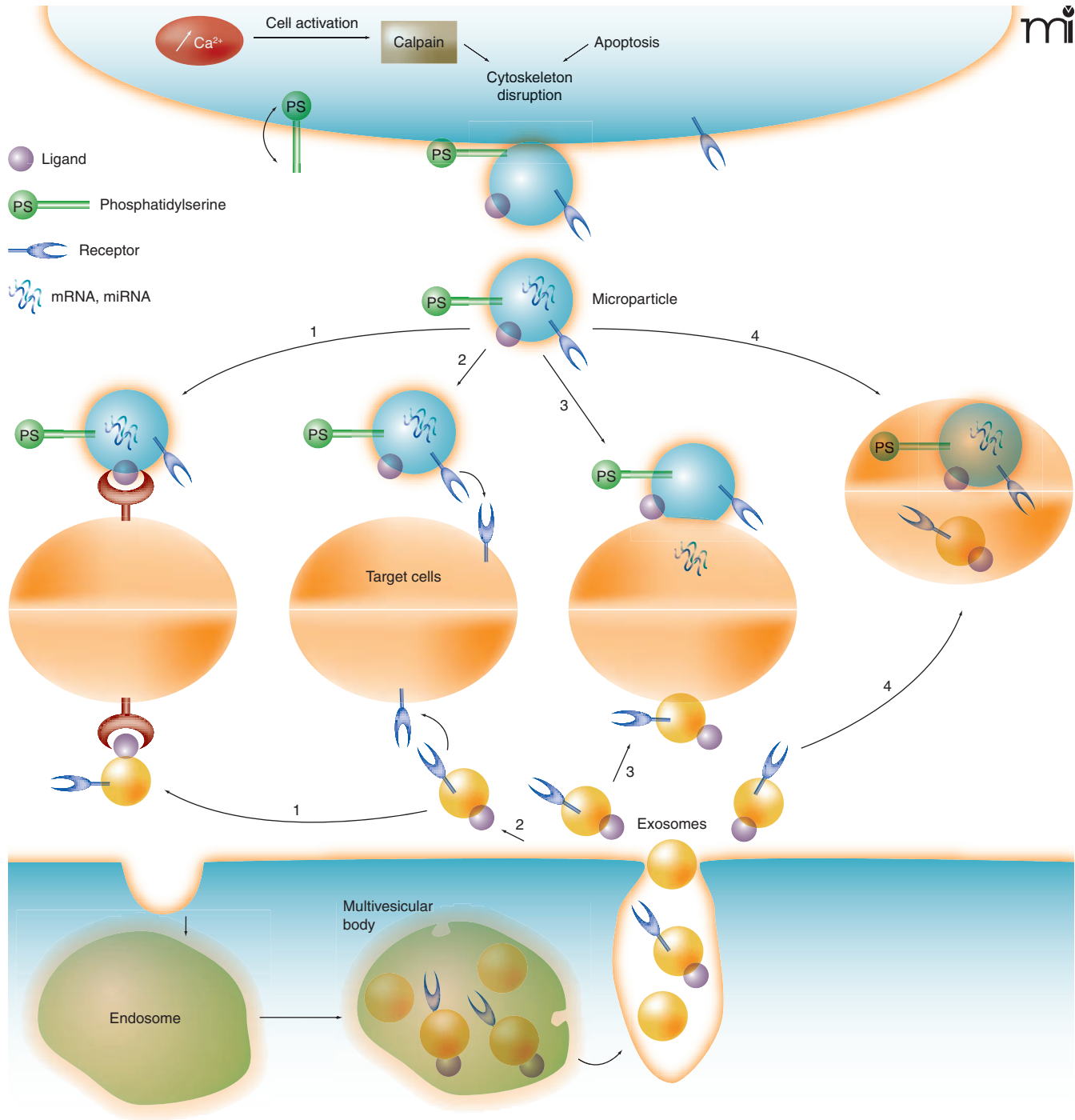


Figure 1. Schematic representation of mechanisms for the formation of microparticles and exosomes and the different ways by which they interact with target cells. Once microparticles (top) and exosomes (bottom) are released, they can interact with target cells through four mechanisms: (1) ligand/receptor interaction, (2) protein transfer, (3) membrane fusion, or (4) internalization.

Much research has demonstrated that ligands present on the surface of MPs and mediators released from MPs can directly stimulate receptors expressed on target cells. Thus, platelet MPs expressing P-selectin enhance leukocyte aggregation and accumulation by binding to P-selectin glycoprotein ligand-1 on the sur-

face of leukocytes (13). Likewise, MPs harboring Sonic Hedgehog (Shh) promote megakaryocytic differentiation, nitric oxide (NO) production from endothelial cells, in vitro angiogenesis, and in vivo neovascularization by activating the Shh receptor. All of these effects are reversible with silencing of the Shh receptor (14–17).

Table 1. Different Mechanisms by which Microparticles and Exosomes Interact with Target Cells

Microparticles	Interaction	Molecular Pathway	Cellular Effects	References
	Ligand-Receptor	Sonic hedgehog pathway	Megakaryocytic differentiation, improve endothelial function, promote angiogenesis, reparative neovascularization	(14–17)
		Fas/Fas Ligand	Hyporeactivity	(18)
	Transfer	CXCR4 Receptor	Spreading HIV infection	(20)
		lipoxigenase 12	Production of lipoxin A4 by mast cells	(22)
	Fusion	Tissue factor-rich MPs with activated platelets exposing P-selectin	Tissue factor-mediated procoagulant activity	(23)
	Internalization	Interaction with α 4 and β 1 integrins	Activate angiogenesis	(24)
		Interaction with LDL Receptor	Decrease tumor development	(25)
Exosomes	Interaction	Molecular Pathway	Cellular Effects	References
	Ligand-Receptor	MFG-E8/integrins	Target dendritic cells and macrophages	(26)
	Transfer	Delta-like 4 protein	Pro-angiogenic effects in endothelial cells	(27)
	Fusion	Mechanisms involving PSGL-1	Initiate coagulation	(28)
		Actin and PI3K mechanisms	Phagocytosis	(29)
	Internalization		Endocytosis by dendritic cells	(30)
		Interaction with α 4 and β 1 integrins	Activate angiogenesis	(24)

Additionally, MPs released from T cells can interact with smooth muscle cells through the Fas–Fas Ligand (FasL) pathway to evoke NF- κ B activation (18).

Several studies point out that MPs may transfer receptors on the surface of target cells. Indeed, the release and intercellular trafficking of CD81⁺ MPs regulate the expression of CD81 surface receptors in lymphocytes (19). MPs might also participate in spreading HIV infection by transferring the CXCR4 co-receptor to CD4⁺/CXCR4⁺ cells (20). Other instances of receptor transfer include arachidonic acid transport by platelet MPs to endothelial cells, leading to an increase in cyclooxygenase-2 (COX-2) and intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression (21). Similarly, lipoxigenase 12 can be transferred from platelets to mast cells via MPs, leading to the production of the lipid mediator lipoxin A4, suggesting that platelet MPs play a critical role as regulators of inflammation (22).

MPs can be also absorbed by fusion or by internalization (or engulfing). Fusion of MPs with their target cells leads to nonselective transfer of MP components (23). Tissue factor-rich MPs fuse with activated, P-selectin–expressing platelets, increasing the latter's procoagulant activity. Concerning internalization, it has been shown that a mixture of MPs and exosomes released from endothelial progenitor cells are internalized in endothelial cells by interaction with α 4 and β 1 integrins. It is noteworthy that these MPs shuttle mRNAs that can activate angiogenesis in endothelial cells (24). Also, lymphocytic MPs interact with LDL receptors and can be internalized in tumor cells, decreasing tumor development (25).

Exosomes can bind to cells through receptor-ligand interactions. Dendritic cell–derived exosomes contain milk fat globule–epidermal growth factor 8 (MFG-E8) which can bind integrins

expressed on dendritic cells or macrophages (26). Alternatively, exosomes can transfer information to recipient cells. Delta-like 4, a Notch protein family member whose expression is increased during angiogenesis, is present in exosomes and promotes capillary-like structure formation in vitro and in vivo by a mechanism implicating the transfer of Delta-like 4 into the endothelium, indicating that the Delta-like/Notch pathway does not require direct cell-cell contact to expand its signaling potential on angiogenesis (27). Furthermore, exosomes might attach or fuse with the target cell membrane, delivering exosomal surface proteins and cytoplasm to the recipient cell (28). Finally, exosomes may also be internalized by target cells by endocytosis or phagocytosis. Exosomes are internalized efficiently by phagocytes, by actin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanisms, without the need of caveolae, macropinocytosis, or clathrin-coated vesicles (29). Exosomes can also be internalized by immature dendritic cells for presentation to CD4 T cells (30).

A better understanding of intercellular transfer by exosomes may lead to the development of strategies that interfere with the release of pathogenic components by exosomes. Recently, a novel mechanism of genetic exchange between cells, referred to as “exosomal shuttle RNA,” by a transfer of mRNAs and miRNAs mediated by exosomes, has been proposed (11), opening the possibility of using exosomes for gene therapy. Also, exosomes secreted by dendritic cells could modulate immune responses directly by exposing MHC and T-cell costimulatory molecules and indirectly by carrying internal components to surrounding cells (10, 31).

Among the different messages transferred, MVs are able to modify function of cells from the cardiovascular system, immune system, and tumor cells. The transfer of information between MVs

and cells is independent of the number of MVs but is dependent on the different composition and origin of the MVs (32, 33). Owing to the procoagulant ability of tissue factor and of phosphatidylserine that MVs carry, elevated levels of MPs participate in the development and maintenance of prothrombotic status in atherosclerosis (34), pre-eclampsia (35), and hematological diseases (36), as well as in cancer-associated thrombosis (37).

Circulating MPs decrease NO production by either reducing the activity of endothelial NO-synthase or by decreasing its bioavailability. Thus, MPs from patients with myocardial infarction, diabetes, or pre-eclampsia induce endothelial dysfunction by impairing the endothelial NO transduction pathway (38–40). In patients with metabolic syndrome, circulating MPs evoke endothelial dysfunction by decreasing endothelial NO-synthase activity and NO production by increasing protein nitration in endothelial cells (41) and by enhancing plasmatic oxidative stress markers (42). Interestingly, patients with obstructive sleep apnea (OSA) display the same levels of circulating MPs as observed in healthy subjects, but levels of MPs from granulocytes and activated leukocytes (CD62L⁺) are higher in OSA patients. In addition, levels of CD62L⁺ MPs correlate with endothelial-NO dysfunction that may initiate atherogenic processes in patients with OSA (32). In a model of rat pulmonary arterial hypertension, circulating MPs from hypoxic rats exhibit reduced NO bioavailability owing to decreased endothelial NO-synthase activity and enhanced oxidative stress in pulmonary endothelial cells (33). Altogether these data underscore the deleterious effects of circulating MPs on the cardiovascular system, and in particular, on the endothelial cells.

Finally, one key feature of the effects of MVs in the cardiovascular system is their ability to modulate the angiogenic program of both endothelial mature and progenitor cells. Indeed, proteins such as peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α), carried by MPs, seem essential to promote the pro-angiogenic reprogramming of endothelial progenitor cells through Akt- and NF- κ B-mediated pathways (43). Isolated MPs from vitreous fluid from patients with diabetic retinopathy stimulated endothelial cell proliferation and increased new vessel formation in mice, indicating that MPs could contribute to disease progression through their ability to promote angiogenesis (44). MPs are able to amplify the initial endothelial dysfunction and accelerate the progression of atherosclerotic lesions by promoting intraplaque neovascularization and thrombogenicity (45).

Endothelial exosomes bearing metalloproteinases promote the formation of a tubule-like structure in human endothelial cells, suggesting that exosomes may regulate proteolytic activity vital to angiogenic steps involving migration of endothelial cells (46). Altogether, these data highlight the potential effects of circulating MVs on new vessel generation and may constitute a new therapeutic target against the progression of these diseases.

Immune cells are activated during many pathological situations and subsequently generate MVs. MPs appear to serve as important mediators to promote inflammation whereas exosomes


most often drive immune responses and autoreactivity. Indeed, through the generation of MPs, activated T cells may facilitate activation of mast cells that are not located in close physical proximity at the inflammatory sites (47). In addition, platelet-derived MPs may play an important role by acting as vectors for the CD154 (CD40L) signal. CD154 is a member of the TNF family expressed by activated CD4⁺, CD8⁺, and $\gamma\delta$ -T cells, B cells, and platelets. Among the effects of CD154, the CD154 signal plays a crucial role in the activation of T cell-dependent humoral immune responses (48). In particular, by concentrating the CD154 activity and carrying it away from the site of platelet activation and aggregation, platelet-derived MPs stimulate antigen-specific production by cooperating with responses elicited by CD4⁺ T cells (49).

Depending on their origin, exosomes can serve as both immunostimulatory and immunoregulatory entities (50). As described above, T and B cells as well as dendritic cells release exosomes. Thus, *in vitro* studies have shown that exosomes released from B cells can directly activate CD4⁺ T cells (51). Also, dendritic cell-derived exosomes initiate specific cytotoxic T lymphocyte response *in vivo* and suppress growth of established murine tumors in a T cell-dependent manner (52). In the same way, tumor-derived exosomes transfer tumor antigens to dendritic cells, which induce potent CD8⁺ T cell-dependent antitumor responses (53). Subsequently, numerous studies have reported the ability of exosomes to act as potential relevant elements for immuno-interventions by amplifying the generation of donor-reactive T cells following transplantation (54) or by suppressing antigen-specific responses through a Fas/FasL-dependent mechanism in the treatment of autoimmune diseases (55).

The successful quantification and identification of several proteins carried by exosomes allows for the suggestion that exosomes may be useful as prognostic, diagnostic, or detection markers in cancers. For instance, claudin-4 can be shed from ovarian cancer cells and detected in exosomes from plasma from ovarian cancer patients (56). The number of exosomes expressing CD63 [a tetraspanin (a cell surface-localized membrane protein) involved in several cellular process including cell activation, adhesion, differentiation, and tumour invasion (57)] and caveolin-1 in the plasma of melanoma patients is significantly increased when compared to those in healthy donors (58). Also, the cytochrome P450 CYP17A1, a target for total androgen blockade in advanced prostate cancer patients, is expressed in plasma exosomes for these patients (59), whereas the presence of two known prostate cancer biomarkers, PCA-3 and TMPRSS2:ERG, have been found in exosomes isolated from urine of patients (60), suggesting that exosomes may be used as a novel approach in detection and prostate tumor surveillance. Also, exosomes from glioblastoma tumor cells containing mRNA, miRNA, and angiogenic proteins, such as VEGF, can be detected in serum from glioblastoma patients. Thus, exosomes promote angiogenesis favoring cancer growth, yet they can provide valuable information regarding the diagnosis and choice of appropriate therapy (61). Cancer specific miRNA isolated

from circulating tumor-derived exosomes from patients with ovarian cancer constitutes a new biomarker of this pathology (62).

Most interestingly, exosomes can represent a nexus between the immune system and tumor environment. Isolated exosomes from the blood of patients with colorectal cancer (63) contain not only proteins typical of exosomes (CD63) but also FasL and TNF- α -related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), which mediate their pro-apoptotic effects on CD8⁺ T cells (63). This mechanism of immunosuppression has potential implications as a prognostic factor and could be targeted for the development of new antitumor therapies in colorectal cancer patients. Also, exosomes present in blood and ascites from patients with ovarian carcinoma promote differentiation and proliferation of regulatory T cells (Treg) as well as up-regulation of Treg-mediated suppression that may potentially contribute to tumor escape (64). Unlike helper T cells, which orchestrate antibody production by B cells, and cytotoxic T cells, which kill virally infected or abnormal cells, Treg act to suppress the immune response of a large number of distinct target cell types (65). Furthermore, these exosomes injected into tumor-bearing mice resulted in augmented tumor growth (66). Altogether, exosomes act as vectors for the transfer of immunological information at distance and can be considered as novel biomarkers and effectors.

In summary, MVs display two faces, as did the Roman god Janus: 1) they constitute potential biomarkers of activity disease, and 2) they can be considered as promising therapeutic targets, considering their ability to convey biological information.  doi/10.1124/mi.11.2.5

Acknowledgments

This work was partially supported by Agence Nationale pour la Recherche-07-PHYSIO-010-01 and Fondation de France (n° 2007001918).

References

- Aharon A, Tamari T, and Brenner B (2008) Monocyte-derived microparticles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells. *Thromb Haemost* **100**:878-885.
- Lai RC, Arslan F, Tan SS, Tan B, Choo A, Lee MM, Chen TS, Teh BJ, Eng JK, Sidik H, et al. (2010) Derivation and characterization of human fetal MSCs: an alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles. *J Mol Cell Cardiol* **48**:1215-1224.
- Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, and Andriantsitohaina R (2005) Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **288**:H1004-1009.
- Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, and Ratajczak MZ (2006) Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* **20**:1487-1495. **One of the first reviews pointing to microvesicles as mediators of cell-to-cell communication.**
- Pasquet JM, Dachary-Prigent J, and Nurden AT (1996) Calcium influx is a determining factor of calpain activation and microparticle formation in platelets. *Eur J Biochem* **239**:647-654. **This paper demonstrated the essential role of calcium influx in microparticle formation.**
- Bevens EM, Comfurius P, Dekkers DW, and Zwaal RF (1999) Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochem Biophys Acta* **1439**:317-330.
- Distler JH, Pisetsky DS, Huber LC, Kalden JE, Gay S, and Distler O (2005) Microparticles as regulators of inflammation: novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* **52**:3337-3348.
- Pan BT and Johnstone RM (1983) Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**:967-978. **This study is the first to describe the existence of exosomes.**
- Keller S, Sanderson MP, Stoeck A, and Altevogt P (2006) Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett* **107**:102-108.
- Thery C, Ostrowsky M, and Segura E (2009) Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* **9**:581-593. **This review is still quite up to date and provides an excellent introduction to exosomes as modulators of immune responses.**
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, and Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**:654-659. **These authors proved that mRNAs carried by exosomes are functional and transferable to recipient cells.**
- Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, et al. (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* **3**:e3694. **This study suggests a role for microvesicles in disseminating miRNA-associated information.**
- Forlow SB, McEver RP, and Nollert MU (2000) Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* **95**:1317-1323.
- Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, Ruat M, and Freyssinet JM (2006) Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* **108**:3012-3020. **This paper is the first to describe the transfer of a differentiation signal associated with morphogens harbored by microparticles.**
- Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, Henrion D, Martinez MC, and Andriantsitohaina R (2007) Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *Faseb J* **21**:2735-2741. **These authors found that microparticles carrying Sonic hedgehog displayed beneficial effects on endothelial cells.**
- Soleti R, Benameur T, Porro C, Panaro MA, Andriantsitohaina R, and Martinez MC (2009) Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* **30**:580-588.
- Benameur T, Soleti R, Porro C, Andriantsitohaina R, and Martinez MC (2010) Microparticles carrying sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS One* **5**:e12688.
- Tesse A, Martinez MC, Hugel B, Chalupsky K, Muller CD, Meziani F, Mitolo-Chieppa D, Freyssinet JM, and Andriantsitohaina R (2005) Upregulation of proinflammatory proteins through NF- κ B pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**:2522-2527.
- Fritzsching B, Schwer B, Kartenbeck J, Pedal A, Horejsi V, and Ott M (2002) Release and intercellular transfer of cell surface CD81 via microparticles. *J Immunol* **169**:5531-5537.
- Rozmyslowicz T, Majka M, Kijowski J, Murphy SL, Conover DO, Poncz M, Ratajczak J, Gaulton GN, and Ratajczak MZ (2003) Platelet- and megakaryocyte-derived microparticles transfer CXCR4 receptor to CXCR4-null cells and make them susceptible to infection by X4-HIV. *Aids* **17**:33-42. **Using an in vitro model, this study shows the transfer of CXCR4 that could increase susceptibility of infection by HIV.**
- Barry OP, Pratico D, Savani RC, and FitzGerald GA (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* **102**:136-144. **This work illustrates the interaction between platelet-derived microparticles and endothelial cells.**

22. Tang K, Liu J, Yang Z, Zhang B, Zhang H, Huang C, Ma J, Shen GX, Ye D, and Huang B (2010) Microparticles mediate enzyme transfer from platelets to mast cells: a new pathway for lipoxin A4 biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* **400**:432-436.
23. Breimo ES and Østerud B (2005) Generation of tissue factor-rich microparticles in an ex vivo whole blood model. *Blood Coagul Fibrinolysis* **16**:399-405.
24. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, Bruno S, Bussolati B, and Camussi G (2007) Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* **110**:2440-2448.
25. Yang C, Gagnon C, Hou X, and Hardy P (2010) Low density lipoprotein receptor mediates anti-VEGF effect of lymphocyte T-derived microparticles in Lewis lung carcinoma cells. *Cancer Biol Ther* **10**:448-456.
26. Thery C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, and Amigorena S (1999) Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J Cell Biol* **147**:599-610.
27. Sheldon H, Heikamp E, Turley H, Dragovic R, Thomas P, Oon CE, Leek R, Edelmann M, Kessler B, Sainson RCA, et al. (2010) New mechanism for notch signaling to endothelium at a distance by delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood* **116**:2385-2394.
28. Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, and Lopez JA (2005) Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* **106**:1604-1611.
29. Feng D, Zhao WL, Ye YY, Bai XC, Liu RQ, Chang LF, Zhou Q, and Sui SF (2010) Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* **11**:675-687.
30. Morelli AE, Larregina AT, Shufesky WJ, Sullivan ML, Stolz DB, Papworth GD, Zahorchak AF, Logar AJ, Wang Z, Watkins SC, et al. (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood* **104**:3257-3266.
31. Thery C, Duban L, Segura E, Veron P, Lantz O, and Amigorena S (2002) Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol* **3**:1156-1162.
32. Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, Mastronardi ML, Agouni A, Meslier N, Racineux JL, Martinez MC, Trzepizur W, and Andriantsitohaina R (2010) Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am J Pathol* **177**:974-983.
33. Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, Savineau JP, Andriantsitohaina R, and Martinez MC (2010) Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* **182**:261-268.
34. Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, and Tedgui A (1999) Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* **99**:348-353. **This study is one of the first to demonstrate the pathophysiological involvement in atherosclerosis.**
35. Bretelle F, Sabatier F, Desprez D, Camoin L, Grunebaum L, Combes V, D'Ercole C, and Dignat-George F (2003) Circulating microparticles: a marker of procoagulant state in normal pregnancy and pregnancy complicated by preeclampsia or intrauterine growth restriction. *Thromb Haemost* **89**:486-492.
36. Trappenburg MC, van Schilfgaarde M, Marchetti M, Spronk HM, Ten Cate H, Leyte A, Terpstra WE, and Falanga A (2009) Elevated procoagulant microparticles expressing endothelial and platelet markers in essential thrombocythemia. *Haematologica* **94**:911-918.
37. Kasthuri RS, Taubman MB, and Mackman N (2009) Role of tissue factor in cancer. *J Clin Oncol* **27**:4834-4838.
38. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimiyan T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, and Mallat Z (2001) Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* **104**:2649-2652.
39. Martin S, Tesse A, Hugel B, Martinez MC, Morel O, Freyssinet JM, and Andriantsitohaina R (2004) Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation* **109**:1653-1659.
40. Vanwijk MJ, Svedas E, Boer K, Nieuwland R, Vanbavel E, and Kublickiene KR (2002) Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. *Am J Obstet Gynecol* **187**:1686-1693.
41. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, Heymes C, Martinez MC, and Andriantsitohaina R (2008) Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* **173**:1210-1219.
42. Helal O, Defoort C, Robert S, Marin C, Lesavre N, Lopez-Miranda J, Riserus U, Basu S, Lovegrove J, McMonagle J, et al. (2010) Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: Relationship with oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.
43. Benameur T, Tual-Chalot S, Andriantsitohaina R, and Martinez MC (2010) PPAR α is essential for microparticle-induced differentiation of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells and angiogenesis. *PLoS One* **5**:e12392.
44. Chahed S, Leroyer AS, Benzerroug M, Gaucher D, Georgescu A, Picaud S, Silvestre JS, Gaudric A, Tedgui A, Massin P, et al. (2010) Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes* **59**:694-701.
45. Leroyer AS, Rautou PE, Silvestre JS, Castier Y, Leseche G, Devue C, Duriez M, Brandes RP, Lutgens E, Tedgui A et al. (2008) CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J Am Coll Cardiol* **52**:1302-1311.
46. Tarabozetti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, and Dolo V (2002) Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol* **160**:673-680. **This is one of the first studies showing the effects of microvesicles on angiogenesis.**
47. Shefler I, Salamon P, Reshef T, Mor A, and Mekori YA (2010) T cell-induced mast cell activation: a role for microparticles released from activated T cells. *J Immunol* **185**:4206-4212.
48. van Kooten C and Bancherou J (2000) CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* **67**:2-17.
49. Sprague DL, Elzey BD, Christ SA, Waldschmidt TJ, Jensen RJ, and Rattliff TL (2008) Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD 154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood* **111**:5028-5036.
50. Couzin J (2005) Cell biology: The ins and outs of exosomes. *Science* **308**:1862-1863.
51. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, and Geuze HJ (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* **183**:1161-1172.
52. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, and Amigorena S (1998) Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* **4**:594-600. **A convincing study of the use of exosomes as vaccine against tumors.**
53. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Thery C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, et al. (2001) Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* **7**:297-303.
54. Montecalvo A, Shufesky WJ, Stolz DB, Sullivan MG, Wang Z, Divito SJ, Papworth GD, Watkins SC, Robbins PD, Larregina AT, et al. (2008) Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during T cell allorecognition. *J Immunol* **180**:3081-3090.

55. Kim SH, Bianco NR, Shufesky WJ, Morelli AE, and Robbins PD (2007) MHC class II+ exosomes in plasma suppress inflammation in an antigen-specific and Fas ligand/Fas-dependent manner. *J Immunol* **179**:2235-2241.
56. Li J, Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, Bristow RE, Roden RB, and Morin PJ (2009) Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. *BMC Cancer* **9**:244.
57. Pols MS and Klumperman J (2009) Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res*. **315**:1584-1592.
58. Logozzi M, De Milito A, Lugini L, Borghi M, Calabro L, Spada M, Perdicchio M, Marino ML, Federici C, Iessi E, et al. (2009) High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* **4**:e5219.
59. Locke JA, Fazli L, Adomat H, Smyl J, Weins K, Lubik AA, Hales DB, Nelson CC, Gleave ME, and Tomlinson Guns ES (2009) A novel communication role for CYP17A1 in the progression of castration-resistant prostate cancer. *Prostate* **69**:928-937.
60. Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakfield XO, and Widmark A (2009) Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer* **100**:1603-1607.
61. Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, and Breakfield XO (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* **10**:1470-1476. **A very interesting study illustrating as microvesicles from glioblastoma patients can be considered diagnostic biomarkers.**
62. Taylor DD and Gercel-Taylor C (2008) MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **110**:13-21.
63. Huber V, Fais S, Iero M, Lugini L, Canese P, Squarcina P, Zaccheddu A, Colone M, Arancia G, Gentile M, et al. (2005) Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology* **128**:1796-1804.
64. Szajnik M, Czystowska M, Szczepanski MJ, Mandapathil M, and Whiteside TL (2010) Tumor-derived microvesicles induce, expand and up-regulate biological activities of human regulatory T cells (Treg). *PLoS One* **5**:e11469. **These authors provide evidence of the abilities of microvesicles derived from tumors to modulate activity of human regulatory T cells.**
65. Krogsgaard M and Davis MM (2005) How T cells 'see' antigen. *Nat Immunol* **6**:239-245.
66. Keller S, Konig AK, Marme F, Runz S, Wolterink S, Koensgen D, Mustea A, Sehouli J, and Altevogt P (2009) Systemic presence and tumor-growth promoting effect of ovarian carcinoma released exosomes. *Cancer Lett* **278**:73-81.



Simon Tual-Chalot is a PhD student at the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) U694 in the University of Angers, France. His research aims are to determine the vascular implication of microparticles in pneumological disorders, especially obstructive sleep apnea.



Daniela Leonetti, PhD, is currently a Research Engineer at INSERM U694, Mitochondria: Regulation and Pathology, in the University of Angers. Her PhD studies, under the supervision of Ramaroson Andriantsitohaina, focused on the role of membrane microparticles in the pathophysiology of Crohn's disease.



Ramaroson Andriantsitohaina, PhD, is Director of Research at the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) at INSERM U694 in the University of Angers, France. His main interest focuses on translational research depicting the role of oxidative stress in metabolic and inflammatory diseases with special

interest for microparticles and plant polyphenols. Send correspondence to RA: E-mail: ramaroson.andriantsitohaina@univ-angers.fr; fax +33 2 44 68 85 88.



M. Carmen Martinez, PhD, is Director of Research at the Centre National de la Recherche Scientifique at INSERM U694 in the University of Angers, France. Her research focuses on the cellular and molecular effects of microparticles on endothelial function and angiogenesis.

Revue :

Microparticles: targets and tools in cardiovascular diseases

Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease

Maria Carmen Martinez, Simon Tual-Chalot, Daniela Leonetti and Ramaroson Andriantsitohaina

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité 694, Faculté de Médecine, Université d'Angers, Angers, France

Cells communicate with other cells not only via direct cell–cell contact and the production of signaling molecules but also through release of microparticles (MPs). MPs are small vesicles released from stimulated and/or apoptotic cells. They harbor membrane proteins that are characteristic of the original parent cell and intracellular components involved in cell signaling. MPs are considered to be both biomarkers and effectors of cell signaling that maintain and/or initiate cell dysfunction. Thus, MPs can evoke endothelial dysfunction by decreasing nitric oxide (NO) production and promoting vascular inflammation which favor the prothrombotic state in atherosclerosis. Novel pharmacological approaches targeting MP production or properties could be used to treat cardiovascular pathologies. Paradoxically, another useful approach might be to employ engineered MPs with modified compositions as therapeutic agents to correct cardiovascular pathologies. This review is focused on the mechanisms of MP formation and their effects on target cells under physiological or pathophysiological conditions.

Microparticles (MPs)

Despite the progress achieved in the treatment of cardiovascular disease, these conditions remain a major cause of death worldwide [1]. The identification of new targets and therapeutic agents to fight the most common cardiovascular diseases (atherothrombotic vascular disease, hypertension and heart failure) is therefore essential. In this context, MPs could represent useful therapeutic tools or targets for cardiovascular disease. MPs are small vesicles that can be potentially released from all cell types. They are involved in intercellular communication and appear to be vectors of biological messages that could actively participate in the pathophysiology and development of disease, notably cardiovascular disease.

MPs can be isolated from fluids of healthy donors, but elevated levels have been detected in many pathological conditions. Furthermore, a positive correlation has been observed between the increase of specific MP phenotypes and significant parameters of diseases with vascular complications [2,3].

This review focuses on the possible role of MPs in the initiation and/or development of cardiovascular disease.

The purpose is to describe the mechanisms of MP formation, their interaction on target cells, and particularly the effects mediated by MPs in the cardiovascular system. Furthermore, we consider the possibility of defining MPs as potential biomarkers of disease activity and suggest that MPs can be used as potential therapeutic tools.

Formation and composition of MPs

Initially considered as inert cellular debris released from activated platelets in human plasma [4], MPs are now understood to be small vesicles shed from the plasma membrane. They have a diameter between 0.05 and 1 μm and are heterogeneous in composition.

In the cardiovascular system, MPs can be produced by many cell types including platelets, leukocytes, erythrocytes, endothelial cells, and smooth-muscle cells, but platelet-derived MPs represent approximately 70–90% of circulating MPs [5]. In addition, other cells including tumor cells, epithelial cells and fibroblasts can also be a source of MPs [6,7].

The mechanisms that lead to the formation of MPs are not completely elucidated, but several studies provide evidence that the production of MPs takes place following chemical and physical cell activation or apoptosis (Figure 1). The phenotype and the quantity of MPs released can vary depending on their mode of production [8,9].

It is well accepted that MP formation can result from cell activation by different agonists such as thrombin and/or collagen [10]. The activation stimulus triggers an influx of extracellular calcium, which is associated with calcium-dependent proteolysis of cytoskeletal proteins through calpain activation [11]. The sustained elevation of cytosolic calcium concentration also causes kinase activation and phosphatase inhibition that contribute to cytoskeleton disruption, and this appears to be indispensable for the subsequent blebbing (formation of irregular protuberances in the plasma membrane) [12]. In addition, several authors have described loss of membrane asymmetry as a result of cell-surface exposure of phosphatidylserine, a negatively charged aminophospholipid that is localized in resting cells at the inner leaflet of the plasma membrane. Exposure of phosphatidylserine at the outer leaflet of the plasma membrane leads to excess negative charge at the surface that could contribute to its destabilization and blebbing. Phosphatidylserine is present in the outer surface of most (but not all) MPs, as recently demonstrated by Connor *et al* [13].

Corresponding author: Andriantsitohaina, R. (ramaroson.andriantsitohaina@univ-angers.fr).

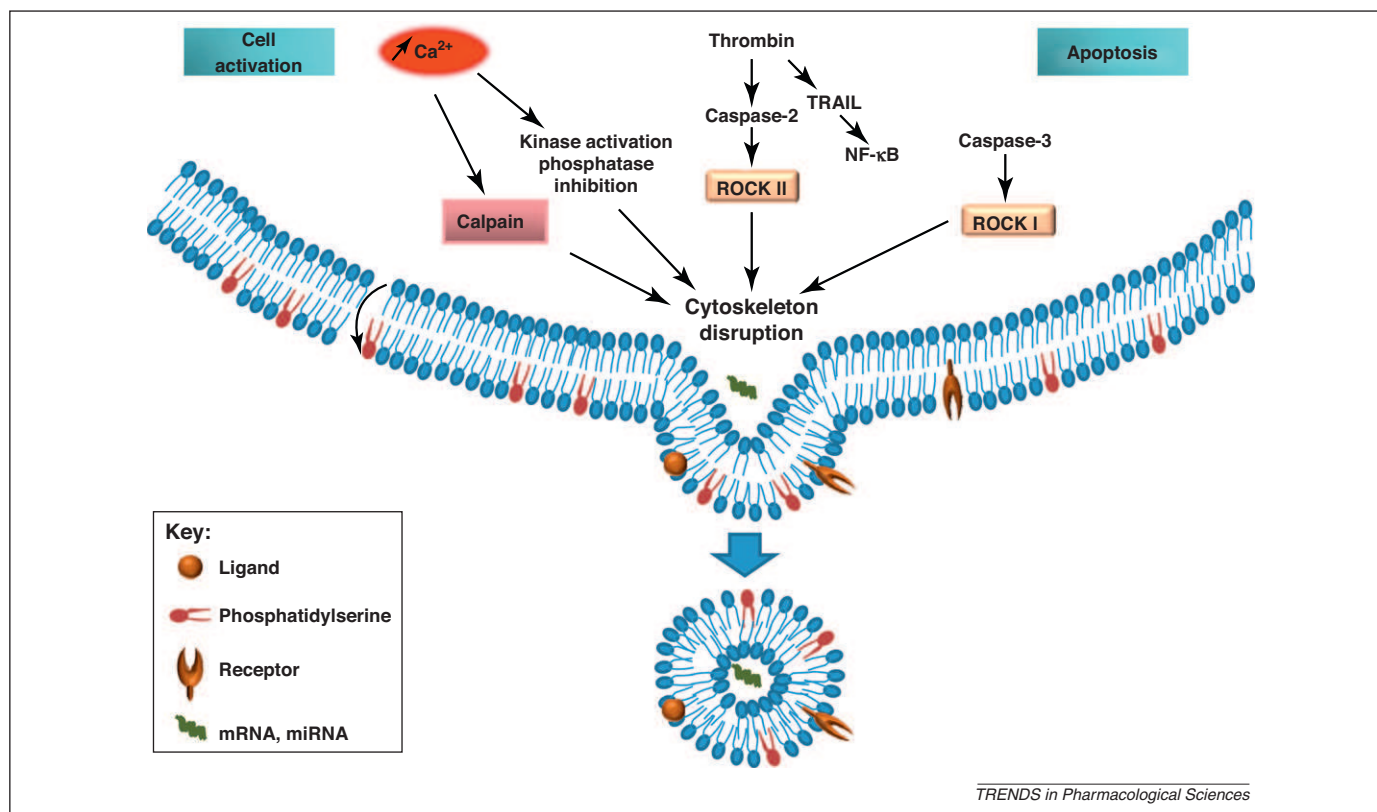


Figure 1. Basic schematic representation of the different steps leading to MP formation. During cell activation an increase in intracellular calcium induces externalization of phosphatidylserine. Calcium increase is also associated with calpain activation, and this is required for cytoskeleton disruption and MP formation. Under apoptosis induction, cleavage of caspases induces ROCK activation, leading to cytoskeleton alteration and blebbing. ROCK, Rho kinase; TRAIL, TNF-related apoptosis-inducing ligand.

Although phosphatidylserine exposure has functional consequences (including the stimulation of coagulation by binding the positively charged domains of coagulation proteins [14]), the significance of phosphatidylserine-negative MPs is unclear and needs further investigation. Finally, several molecular targets linking the increase of intracellular calcium concentration to MP release have been proposed. These include extracellular signal-regulated kinase (ERK) [15], small GTPase Rho A [16], myosin light chain and Rho-associated kinase (ROCK I) [17], NADPH oxidase, and reactive oxygen species (ROS) [18].

During apoptosis, MP formation is associated with the activation of ROCK I and caspase 3, leading to disruption of membrane skeleton structure and consequently membrane blebbing and MP formation [19]. Other studies have found that tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and its receptor TRAIL-R2, that are involved in the signaling pathway of apoptosis, can promote endothelial MP release by initiating the recruitment of adaptor proteins and the activation of nuclear factor kappa B (NF- κ B) [20]. These different data clearly underline the complexity of pathways that lead to the formation of MPs.

The stimulus that triggers MP formation regulates the selective sorting of specific constituents that determine the composition of MPs and, consequently, the biological information that they transfer. MP composition reflects the organization of the plasma membrane of the cell of origin at the time of MP generation. MPs carry different membrane, cytoplasmic and nuclear constituents from the

original cell and express antigens that allow their characterization with respect to their cellular source by the use of specific antibodies. For example, with regard to protein contents, those of endothelial MPs are predominantly metabolic enzymes, proteins involved in adhesion and fusion processes, and cytoskeleton-associated proteins [21], whereas proteins from platelet MPs are surface glycoproteins or chemokines [22]. The protein component of MPs can thus vary depending on the phenotype of the MPs and the stimulus leading to their production [9,23].

Little is known about the lipid composition of MPs. Plasma MPs in healthy individuals are rich in cholesterol [24] and phospholipids including lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine, sphingomyelin, lysophosphatidylserine, phosphatidylserine, lysophosphatidylethanolamine, phosphatidylethanolamine and phosphatidylinositol [25]. However, no data are available for MPs from patients with pathologies associated with an altered lipid profile. Interestingly, the lipid environment can modify the activity of proteins carried by MPs. For example, cholesterol-enrichment of human monocytes/macrophages induces the generation of highly procoagulant phosphatidylserine-positive and tissue factor-positive MPs [26].

In addition, MPs can contain nucleic acids – notably mRNA and micro RNA (miRNA) – suggesting that they could transfer genetic material to target cells. MP-associated intercellular communication can take place through different pathways. They can (i) directly interact with the ligands present on the surface of target cells and activate cascade signaling, and (ii) transfer proteins, mRNA,

miRNA, and bioactive lipids by interacting with target cells by either by fusion or internalization. Through this latter mechanism, target cells can acquire new surface antigens and therefore new biological properties and activities.

Involvement of MPs in the development and maintenance of cardiovascular disease

Circulating MPs isolated from blood have been considered as biomarkers of vascular injury and inflammation in several cardiovascular pathologies including acute myocardial infarction, diabetes, atherothrombosis, pre-eclampsia, hypertension and metabolic syndrome (a complex disorder defined by a cluster of interconnected factors that increase the risk of cardiovascular atherosclerotic diseases and diabetes mellitus type 2). Indeed, in these diseases, elevated levels of MPs have been detected and are frequently correlated with the severity of pathology [27–32]. Also, the populations of MPs are different depending on the disease. For example, levels of MPs from platelets, erythrocytes and endothelial cells are increased in individuals with metabolic syndrome versus healthy subjects [32,33]. In patients with type 1 (but not type 2) diabetes, plasma levels of MPs from platelets and endothelial cells are increased [28]. Interestingly, very recently it was shown that increased endothelial and endothelial-progenitor cell-derived MPs are positively correlated with blood glucose concentration and infarct volume after ischemic cerebral injury in obese leptin-receptor deficient *db/db* diabetic mice [34]. These findings suggest that endothelial and endothelial-progenitor cell-derived MPs could be used as predictive biomarkers for ischemic stroke complication in diabetes, and targeting MPs might offer new therapeutic avenues for diabetes and ischemic stroke.

MPs have also recently been shown to be effectors capable of delivering biological messages to target cells. Interestingly, this transfer of information between cells is independent of the number of MPs but instead depends on the different composition and/or origin of the MPs [3,35]. We discuss here studies on the biological effects of MPs in the cardiovascular system (Table 1).

Several groups have proposed that circulating MPs from patients with myocardial infarction, diabetes, pre-eclampsia, syndrome metabolic or obstructive sleep apnea (OSA) induce endothelial dysfunction by (i) decreasing NO signaling by reducing the activity of endothelial NO synthase and/or by decreasing NO bioavailability [3,27,36,37], (ii) increasing protein nitration on endothelial

cells [32], and (iii) enhancing plasmatic oxidative stress markers [33]. Indeed, an increased phosphorylation of the endothelial NO synthase at its inhibitory site (Ser495) has been observed after endothelial cell incubation with circulating MPs from patients with metabolic syndrome [32]. Also, patients with OSA display the same levels of circulating MPs as healthy subjects, but levels of MPs from granulocytes and activated leukocytes (CD62L⁺) are higher in OSA patients. In addition, levels of CD62L⁺ MPs correlate with endothelial dysfunction, as reflected by reduced NO production by endothelial cells incubated with MPs from OSA patients. This could initiate atherogenic processes in patients with OSA [3]. Furthermore, using a model of rat pulmonary arterial hypertension induced by hypoxia we have shown that circulating MPs from hypoxic rats reduce NO bioavailability by decreasing endothelial NO synthase activity and by enhancing oxidative stress in pulmonary endothelial cells [35]. Together, these data emphasize the deleterious effects of circulating MPs on the cardiovascular system, and in particular on endothelial cells.

Chahed *et al.* [38] have described how isolated MPs from vitreous fluid of diabetic patients with retinopathy, a form of damage to the retina of the eye, could contribute to disease progression through the stimulation of endothelial cell proliferation and the enhancement of new vessel formation in mice. Also, MPs from human atherosclerotic plaques contribute to the development of atherosclerosis because they are able to amplify the initial endothelial dysfunction and accelerate the progression of atherosclerotic lesions by promoting intraplaque neovascularization and increasing their thrombogenicity [39]. Together, these data highlight the potential effects of circulating MPs on promoting new vessel generation and could constitute a new target for the development of therapeutics capable of preventing disease progression.

MPs as a target for reducing deleterious signaling

Because levels of circulating MPs can correlate with multiple cardiovascular diseases, there is great interest in evaluating changes in circulating MP levels in response to pharmacological treatment. First, a reduction in the levels of total or a specific population of circulating MPs could indicate the efficacy of a treatment or disease regression. Second, modulation of MP levels by drug treatment could decrease the deleterious effects induced by MPs (Figure 2). For example, based on the evidence that statins have beneficial effects on lipid profile as well as on platelet activation and aggregation [40], their use can have effects

Table 1. Effects of MPs in animals or humans according to pathology

	Animal models	Humans	Refs
Atherosclerotic plaques		Intraplaque neovascularization and thrombogenesis	[29,39]
Diabetes		Endothelial dysfunction	[28,36]
Diabetic retinopathy		Angiogenesis	[38]
Metabolic syndrome		Endothelial dysfunction	[32,33]
Myocardial infarction		Endothelial dysfunction	[27]
Pre-eclampsia		Endothelial dysfunction/vascular hyporeactivity	[30,37]
Pulmonary arterial hypertension	Endothelial dysfunction		[35]
Sleep apnea syndrome		Endothelial dysfunction	[3]
Stroke and diabetes	Endothelial progenitor dysfunction		[34]

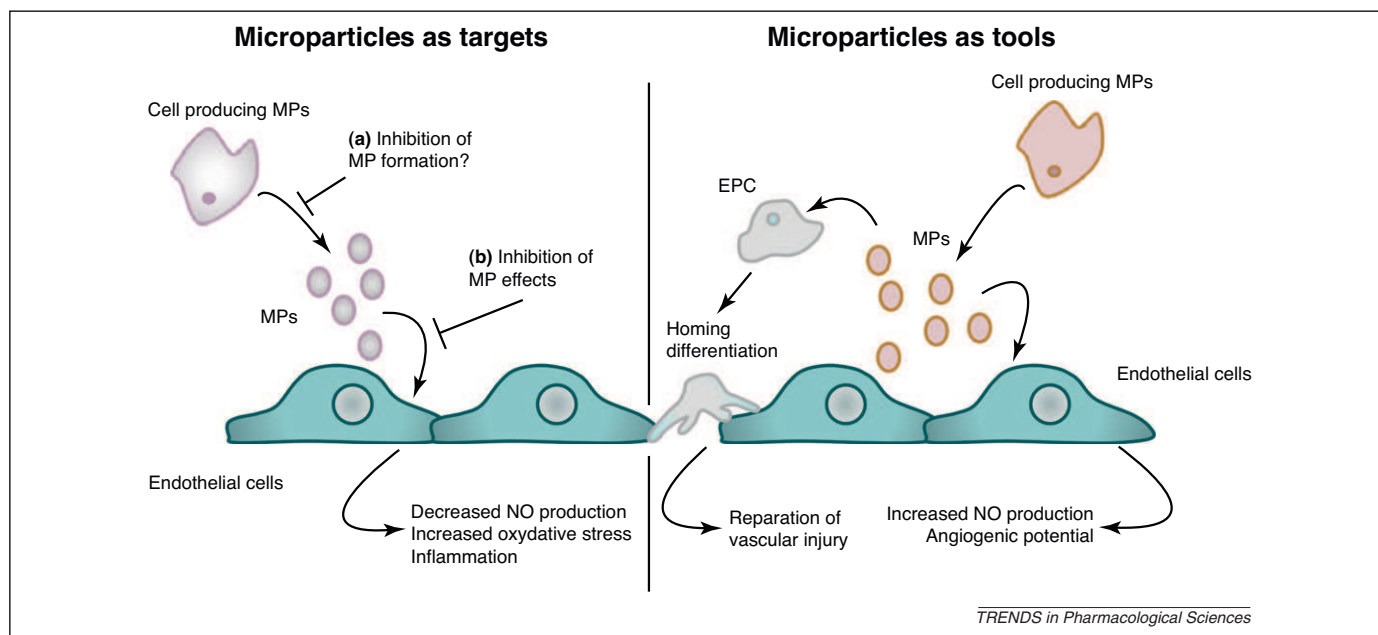


Figure 2. Dual facets of MPs as targets and therapeutic tools in cardiovascular disease. (Left) MPs generated from different cell types induce endothelial dysfunction by increasing oxidative stress, leading to reduced NO bioavailability, and by producing cardiovascular inflammation. (a) In theory, MP formation represents an interesting target for limiting MP levels, but the mechanisms underlying MP release are not completely elucidated and are likely to be non-specific. (b) Direct or indirect inhibition of MP effects is a more realistic approach as described in the text. (Right) Several types of MPs can act on endothelial progenitor cells and increase their ability to differentiate to mature endothelial cells and migrate to the injured zones to repair vascular injury. Furthermore, MPs can improve endothelial cell function through their ability to increase NO production and induce angiogenesis.

on MP levels and/or on MP-evoked effects. The combination of pitavastatin with eicosapentanoic acid (EPA) significantly decreases platelet-derived MP levels versus monotherapy with EPA. In addition, plasma levels of adiponectin are improved, indicating that combination therapy of pitavastatin and EPA could be beneficial in the prevention of vascular complications in hyperlipidemic patients with type II diabetes [41]. Although after eight weeks of treatment with pravastatin the total number of MPs remains unchanged in diabetic patients, there is a significant reduction in markers of platelet activation, such as glycoprotein IIIa exposure on platelet-derived MPs, and probably resulting from a decrease in platelet activation [42]. Recently it was shown that patients with peripheral arterial occlusive disease who were treated with atorvastatin for eight weeks had reduced expression levels of procoagulant proteins (e.g. tissue factor) and adhesion molecules (P-selectin and glycoprotein IIIa) on platelet-derived MPs, but without changes in phosphatidylserine expression, suggesting that atorvastatin can have beneficial effects on hemostatic parameters that contribute to reduced risk of atherothrombotic complications [43].

Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists are used as pharmacological agents for diabetes and hyperlipidemia (the primary prevention of cardiovascular events) because they can inhibit inflammation and endothelial dysfunction [44]. Interestingly, Esposito *et al.* [45] have shown that pioglitazone, a PPAR- γ ligand, reduces circulating levels of endothelial-derived MPs in patients with metabolic syndrome [46]. Moreover, we reported that treatment of mice with rosiglitazone, another PPAR- γ agonist, inhibits vascular hyporeactivity induced by lymphocyte-derived MPs, and that drug effects were mediated

by NF- κ B pathways and reduced production of pro-inflammatory cytokines [47].

In addition, non-invasive and invasive treatments that do not rely on drug administration are effective in reducing MP levels. Indeed, continuous positive airway pressure (CPAP) therapy of OSA patients for 4–6 weeks reduces the apnea–hypopnea index and improves both endothelial dysfunction [48] and the levels of endothelial-derived MPs [49], in particular those expressing E-selectin [50]. Immunoadsorption, a technique used in patients with chronic inflammatory dilative cardiomyopathy to remove cardiotoxic auto-antibodies and to reverse endothelial dysfunction, is able to reduce dramatically the total levels of circulating MPs, especially those of endothelial origin [51]. Similarly, renal graft is associated with decreased levels of MPs and their procoagulant activity. MP lowering could be involved in the improvement of vascular function reported following kidney transplantation [52]. Furthermore, weight reduction by calorie restriction (with or without exercise) reverses platelet MP overproduction in obese patients [53].

Several clinical trials are ongoing which are designed to assess the evolution of MPs in a time dependent-manner before and after initiation of different therapies (www.clinicaltrials.gov and Table 2). However, it should be noted that changes in plasma MP levels by drug treatment could result both from a direct effect of the drug on MP generation and from drug-induced changes in MP clearance.

Because the data clearly suggest that MPs participate in the pathogenesis of cardiovascular disease, it could be beneficial to target MP production directly so as to restore normal levels. However, the cellular mechanisms leading to MP formation and release are not completely elucidated

Table 2. Clinical trials using MPs as biomarkers of drug treatment efficacy

Title	Aim	NCT ^a	Estimated enrollment (n)	Status
MPs in stored packed red blood cells	To improve transfusion practice and safety	01185600	500	Currently recruiting
Thromboprophylaxis and bariatric surgery	To assess the efficacy of enoxaparin on anti-factor Xa and MP levels	00444652	150	Currently recruiting
Rosuvastatin to lower circulating tissue factor bearing MPs in metastatic breast cancer	To reduce the risk for deep vein thrombosis	01299038	40	Currently recruiting
Enoxaparin thromboprophylaxis in cancer patients with elevated levels of tissue factor bearing MPs	To improve and/or prevent thrombosis in people with certain types of cancer	00908960	227	Currently recruiting
Paclitaxel and bavituximab in treating patients with HER2-negative metastatic breast cancer	To study the side effects of giving together paclitaxel and bavituximab by measuring MPs as markers of tumor cell spread	01288261	14	Currently recruiting
Clinical trial using metronomic oral low-dose cyclophosphamide alternating with low-dose oral methotrexate with continuous celecoxib and weekly vinblastine in children and adolescents with relapsed or progressing solid tumours	To define the safety profile of the combination of drugs by measuring angiogenic markers including MPs	01285817	90	Currently recruiting
Patients overexposed for a prostate adenocarcinoma	To determine incidence and severity of adverse events related to radiotherapy	00773656	433	Currently recruiting
The interrelation of the vasculature, endothelium, bone metabolism and uremic toxins in peritoneal dialysis	To assess the interrelation between endothelial dysfunction (MP levels) and uremic toxins	00433264	62	Completed
Effect of endothelin-1 receptor blockade on circulating endothelial MP levels in patients with pulmonary hypertension	To improve of mean of pulmonary arterial pressure	00675051	20	Completed
Dose effects of hormone therapy (two doses of estradiol associated to progesterone) on inflammatory markers	To reduce inflammation (soluble C reactive protein and secondly MPs)	00236301	99	Terminated
Importance in type 1 diabetes patients of an optimized control of post-prandial glycaemia on oxidant stress prevention	To prevent oxidant stress	00934336	50	Ongoing but not recruiting
Comparison of pitavastatin with atorvastatin in increasing HDL-cholesterol and adiponectin in patients with dyslipidemia and coronary artery disease	To reduce HDL-cholesterol, adiponectin and other blood parameters including platelet MPs	00861861	200	Unknown
Pioglitazone versus metformin in type 2 diabetes	Comparison of the effects of two drugs on circulating endothelial MPs because their putative role in inflammatory processes	00815399	150	Unknown

^aClinicalTrials.gov registry number

and it is not yet possible to target these processes specifically (Box 1). Furthermore, the precise characterization of cell origins and of the biological messages carried and transferred by MPs will be essential for understanding whether they possess pathogenic or beneficial properties and to permit their precise targeting.

Box 1. Unanswered questions on the potential inhibition of MP formation

The mechanisms implicated in the MP blebbing depend on the cell type and on the type of stimulation. This complicates the possibility of specifically inhibiting their formation. Among the cellular mechanisms directly involved in MP release, an increase of intracellular calcium concentration via calcium channel activation has been described. However, the nature of these channels remains unclear. In circulating cells it has been proposed that calcium influx takes place via transient receptor potential channels (TRPC) [54], and thus TRPC blockade could represent a potential approach to reducing MP formation. However, other tissues express TRPC (e.g. heart [55]), limiting the use of specific inhibitors of TRPC to modulate MP release. Other intracellular actors in MP formation are also ubiquitous (e.g. kinases, phosphatases) and this also makes specific targeting impossible.

MPs as pharmacological tools

Recent studies have reported that some types of MPs possess therapeutic potential through the modulation of cellular processes and of secretomes (the molecules secreted by cells), and subsequently by inducing tissue repair after the reprogramming of target cells (Figure 2). Notably, an enhanced level of circulating MPs is not always accompanied by a deleterious effect; indeed, some populations of MPs could deliver protective biological messages, preserving endothelial function and/or vascular integrity. For example, circulating MPs from sepsis patients have been shown to be protective, rather than deleterious, because they restore vascular hyporeactivity in vessels treated with lipopolysaccharide through an enhancement of thromboxane A₂ production [56]. This confirms findings from a previous study that showed a positive correlation between high circulating levels of MPs and survival in sepsis patients [57]. In addition, MPs from sepsis patients treated with recombinant activated protein C carry this protein, and this could be related to the anti-apoptotic and barrier protective effects mediated by activated protein C on endothelial cells [58].

Review

Benameur *et al.* [59] have reported that circulating MPs bearing PPAR α promote differentiation of endothelial progenitor cells and angiogenesis through the activation of PPAR α /Akt/NF- κ B pathway. Similar observations were made by Mause *et al.* [10] using MPs derived from *in vitro* activated platelets. Indeed, platelet-derived MPs are able to reprogram endothelial progenitor cells towards a phenotype competent to repair vascular injury. These effects consist of changes in the expression of endothelial markers and the modulation of secretome composition towards a pro-angiogenic profile (vascular endothelial growth factor, epidermal growth factor, hepatocyte growth factor, IL-1 β and TNF- α) which can induce proliferation of mature endothelial cells.

Finally, as noted earlier, the composition of MPs and the messages they transport (proteins, mRNA or miRNA) can differ depending on their origin. It has been reported that MPs can be engineered to over-express different proteins by driving the synthesis of the relevant protein in MP-producing cells. As demonstrated by Agouni *et al.* [60], MPs released by apoptotic/stimulated human T lymphocytes harbor the morphogen Sonic hedgehog (Shh) and improve endothelial function in the mouse aorta by increasing NO release. Also, endothelial dysfunction in mouse coronary artery after ischemia/reperfusion can be reversed by treatment with Shh-positive MPs. Moreover, MPs expressing Shh favor *in vitro* angiogenesis [61] and the recovery of hindlimb flow after peripheral ischemia through the activation of endothelial NO synthase and the increase of NO release and pro-angiogenic factor production [62]. These findings suggest that Shh-positive MPs could represent a potent tool for stimulating neovascularization in disease states associated with impaired angiogenesis.

Interestingly, MP-associated RNA and miRNA have been detected in the supernatant of mesenchymal stem cells. This suggests, on the one hand, that MP-associated membrane can protect both RNA and miRNA against degradation by forming an appropriate environment and, on the other, that MPs can act as vectors of miRNA-dependent messages between cells [63].

Concluding remarks

It is now clear that MPs play roles in intercellular communication and are able to modulate important cellular regulatory functions. In particular, MPs can induce and/or maintain endothelial dysfunction and could therefore be implicated in cardiovascular disease progression, making them new drug-development targets. Paradoxically, there is convincing evidence that some MPs can have beneficial properties, and MPs could potentially be developed as new therapeutic tools. There is thus a fragile balance between the harmful and helpful effects of MPs. Further analyses of the transcriptomes, miRNAomes and proteomes of MPs will be required for the identification of all the components of MPs, and this will improve our understanding of the biological effects they can induce.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (07-PHYSIO-010-01) and the Fondation de France. S.T.C. was

supported by a doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche (France). R.A. is supported by a 'Contrat d'Interface' from the INSERM and the Hospital of Angers, France.

References

- Dahlöf, B. (2010) Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *Am. J. Cardiol.* 105, 3A–9A
- Andoh, A. *et al.* (2005) Elevated circulating platelet-derived microparticles in patients with active inflammatory. *Am. J. Gastroenterol.* 100, 2042–2048
- Priou, P. *et al.* (2010) Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnea. *Am. J. Pathol.* 177, 974–983
- Wolf, P. (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.* 13, 269–288
- Flaumenhaft, R. *et al.* (2009) Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood* 113, 1112–1121
- Castellana, D. *et al.* (2009) Membrane microvesicles as actors in the establishment of a favorable prostatic tumoral niche: a role for activated fibroblasts and CX3CL1-CX3CR1 axis. *Cancer Res.* 69, 785–793
- Moulin, V.J. *et al.* (2010) Shedding of microparticles by myofibroblasts as mediator of cellular cross-talk during normal wound healing. *J. Cell. Physiol.* 225, 734–740
- Jimenez, J.J. *et al.* (2003) Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb. Res.* 109, 175–180
- Martinez, M.C. *et al.* (2006) Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 108, 3012–3020
- Mause, S.F. *et al.* (2010) Platelet microparticles enhance the vasoregenerative potential of angiogenic early outgrowth cells after vascular injury. *Circulation* 122, 494–506
- Miyoshi, H. *et al.* (1996) Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterology* 110, 1897–1904
- Yan, R. *et al.* (2009) Role of cAMP-dependent protein kinase in the regulation of platelet procoagulant activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 485, 41–48
- Connor, D.E. *et al.* (2010) The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb. Haemost.* 103, 1044–1052
- Owens, A.P., 3rd and Mackman, N. (2011) Microparticles in hemostasis and thrombosis. *Circ. Res.* 108, 1284–1297
- Kunzelmann-Marche, C. *et al.* (2001) Regulation of phosphatidylserine transbilayer redistribution by store-operated Ca²⁺ entry: role of actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 276, 5134–5139
- Kunzelmann, C. *et al.* (2004) Rho A participates in the regulation of the phosphatidylserine-dependent procoagulant activity at the surface of megakaryocytic cells. *J. Thromb. Haemost.* 2, 644–650
- Sebbagh, M. *et al.* (2001) Caspase-3-mediated cleavage of ROCK1 induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.* 3, 346–352
- Burger, D. *et al.* (2011) Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via AT1R/NADPH oxidase/Rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.222703 in press
- Coleman, M.L. *et al.* (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* 3, 339–345
- Simoncini, S. *et al.* (2009) TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin *in vitro*: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ. Res.* 104, 943–951
- Banfi, C. *et al.* (2005) Proteome of endothelial cell-derived procoagulant microparticles. *Proteomics* 5, 4443–4455
- Garcia, B.A. *et al.* (2005) The platelet microparticle proteome. *J. Proteome Res.* 4, 1516–1521
- Bernimoulin, M. *et al.* (2009) Differential stimulation of monocytic cells results in distinct populations of microparticles. *J. Thromb. Haemost.* 7, 1019–1028

- 24 Biró, E. *et al.* (2005) The phospholipid composition and cholesterol content of platelet-derived microparticles: a comparison with platelet membrane fractions. *J. Thromb. Haemost.* 3, 2754–2763
- 25 Weerheim, A.M. *et al.* (2002) Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one-dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.* 302, 197–198
- 26 Liu, M.L. *et al.* (2007) Cholesterol enrichment of human monocyte/macrophages induces surface exposure of phosphatidylserine and the release of biologically-active tissue factor-positive microvesicles. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 430–435
- 27 Boulanger, C.M. *et al.* (2001) Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 104, 2649–2652
- 28 Sabatier, F. *et al.* (2002) Type 1 and type 2 diabetic patients display different patterns of cellular microparticles. *Diabetes* 51, 2840–2845
- 29 Mallat, Z. *et al.* (2000) Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 101, 841–843
- 30 Meziani, F. *et al.* (2006) Shed membrane particles from preeclamptic women generate vascular wall inflammation and blunt vascular contractility. *Am. J. Pathol.* 169, 1473–1483
- 31 Nomura, S. *et al.* (2002) Effects of efonidipine on platelet and monocyte activation markers in hypertensive patients with and without type 2 diabetes mellitus. *J. Hum. Hypertens.* 16, 539–547
- 32 Agouni, A. *et al.* (2008) Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am. J. Pathol.* 173, 1210–1219
- 33 Helal, O. *et al.* (2010) Increased levels of microparticles originating from endothelial cells, platelets and erythrocytes in subjects with metabolic syndrome: relationship with oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* DOI: 10.1016/j.numecd.2010.01.004 in press
- 34 Chen, J. *et al.* (2011) Circulating endothelial progenitor cells and cellular membrane microparticles in db/db diabetic mouse: possible implications in cerebral ischemic damage. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E62–E71 DOI: 10.1152/ajpendo.00026.2011
- 35 Tual-Chalot, S. *et al.* (2010) Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182, 261–268
- 36 Martin, S. *et al.* (2004) Shed membrane particles from T lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation* 109, 1653–1659
- 37 Vanwijk, M.J. *et al.* (2002) Isolated microparticles, but not whole plasma, from women with preeclampsia impair endothelium-dependent relaxation in isolated myometrial arteries from healthy pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 187, 1686–1693
- 38 Chahed, S. *et al.* (2010) Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes* 59, 694–701
- 39 Leroyer, A.S. *et al.* (2008) CD40 ligand⁺ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 1302–1311
- 40 Dajani, E.Z. *et al.* (2002) Statins, platelet aggregation and coronary heart disease. *J. Assoc. Acad. Minor Phys.* 13, 27–31
- 41 Nomura, S. *et al.* (2009) The effects of pitavastatin, eicosapentaenoic acid and combined therapy on platelet-derived microparticles and adiponectin in hyperlipidemic, diabetic patients. *Platelets* 20, 16–22
- 42 Sommeijer, D.W. *et al.* (2005) Pravastatin reduces fibrinogen receptor gpIIIa on platelet-derived microparticles in patients with type 2 diabetes. *J. Thromb. Haemost.* 3, 1168–1171
- 43 Mobarrez, F. *et al.* (2011) Atorvastatin reduces thrombin generation and expression of tissue factor, P-selectin and GPIIIa on platelet-derived microparticles in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Thromb. Haemost.* 106, DOI: 10.1160/TH10-12-0810 in press
- 44 Fernandez, A.Z. (2008) Peroxisome proliferator-activated receptors in the modulation of the immune/inflammatory response in atherosclerosis. *PPAR Res.* 2008, 285842
- 45 Esposito, K. *et al.* (2006) Pioglitazone reduces endothelial microparticles in the metabolic syndrome. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 1926
- 46 Kassi, E. *et al.* (2011) Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med.* 9, 48
- 47 Tesse, A. *et al.* (2008) Rosiglitazone, a PPAR γ agonist, prevents microparticle-induced vascular hyporeactivity through the regulation of pro-inflammatory proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324, 539–547
- 48 Trzepizur, W. *et al.* (2009) Microvascular endothelial function in obstructive sleep apnea: Impact of continuous positive airway pressure and mandibular advancement. *Sleep Med.* 10, 746–752
- 49 Jelic, S. *et al.* (2009) Endothelial repair capacity and apoptosis are inversely related in obstructive sleep apnea. *Vasc. Health Risk Manag.* 5, 909–920
- 50 Yun, C.H. *et al.* (2010) Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J. Clin. Neurol.* 6, 89–98
- 51 Bulut, D. *et al.* (2011) Effects of immunoadsorption on endothelial function, circulating endothelial progenitor cells and circulating microparticles in patients with inflammatory dilated cardiomyopathy. *Clin. Res. Cardiol.* 100, 603–610 DOI: 10.1007/s00392-011-0287-2
- 52 Al-Massarani, G. *et al.* (2009) Kidney transplantation decreases the level and procoagulant activity of circulating microparticles. *Am. J. Transplant.* 9, 550–557
- 53 Murakami, T. *et al.* (2007) Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity. *Thromb. Res.* 119, 45–53
- 54 Kunzelmann-Marche, C. *et al.* (2002) Loss of plasma membrane phospholipid asymmetry requires raft integrity: role of TRP channels and ERK pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 19876–19881
- 55 Eder, P. and Molkentin, J.D. (2011) TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 108, 265–272
- 56 Mostefai, H.A. *et al.* (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate and nitric oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte micro particles in endothelial cells. *J. Immunol.* 180, 5028–5035
- 57 Soriano, A.O. *et al.* (2005) Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit. Care Med.* 33, 2540–2546
- 58 Perez-Casal, M. *et al.* (2009) Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. *Haematologica* 94, 387–394
- 59 Benameur, T. *et al.* (2010) PPAR α is essential for microparticle-induced differentiation of mouse bone marrow-derived endothelial progenitor cells and angiogenesis. *PLoS ONE* 5, e12392
- 60 Agouni, A. *et al.* (2007) Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J.* 21, 2735–2741
- 61 Soleti, R. *et al.* (2009) Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 30, 580–588
- 62 Benameur, T. *et al.* (2010) Microparticles carrying Sonic Hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice. *PLoS ONE* 5, e12688
- 63 Chen, T.S. *et al.* (2010) Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucl. Acids Res.* 38, 215–224

Publication :

Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction

Circulating Microparticles from Pulmonary Hypertensive Rats Induce Endothelial Dysfunction

Simon Tual-Chalot^{1,2,3}, Christelle Guibert^{4,5}, Bernard Muller^{4,5}, Jean-Pierre Savineau^{4,5}, Ramaroson Andriantsitohaina^{1,2,3}, and M. Carmen Martinez^{1,2,3}

¹CNRS UMR 6214, Angers, France; ²INSERM 771, Angers, France; ³Université d'Angers, Angers, France; ⁴INSERM 885, Bordeaux, France; and ⁵Université Bordeaux 2, France

Rationale: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe disease characterized by an increase of pulmonary vascular resistance, which is accompanied by functional and structural changes in pulmonary arteries. Microparticles (MPs) have been described as biological vector of endothelial dysfunction in other pathologies.

Objectives: The purpose of this work was to characterize circulating MPs during hypoxic PAH and to study their effects on endothelial function.

Methods: Male Wistar rats were exposed or not to chronic hypoxia, and normoxic or hypoxic MPs from blood were characterized by flow cytometry. Endothelial cells (ECs) from rat aorta or pulmonary arteries were incubated with MPs, and then expression and phosphorylation of enzymes involved in nitric oxide (NO) and reactive oxygen species productions were analyzed. Hypoxic MPs were injected into rats, and endothelium-dependent relaxation was assessed.

Measurements and Main Results: Circulating levels of MPs from hypoxic rats were twofold higher than those present in normoxic rats. *In vitro* treatment of ECs with hypoxic MPs reduced NO production in aortas and pulmonary arteries by enhancing phosphorylation of endothelial NO synthase at the inhibitory site. Hypoxic MPs increased oxidative stress only in pulmonary ECs via xanthine oxidase and mitochondrial implication. *In vivo* injection of hypoxic MPs into rat impaired endothelium-dependent relaxation both in aorta and pulmonary arteries.

Conclusions: These data provide evidence that hypoxic circulating MPs induce endothelial dysfunction in rat aorta and pulmonary arteries by decreasing NO production. Moreover, MPs display tissue specificity with respect to increased oxidative stress, which occurs only in pulmonary ECs.

Keywords: pulmonary hypertension; microparticles; oxidative stress; endothelial NO synthase

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and severe disease characterized by an increase in pulmonary vascular resistance leading to right ventricle overload and, ultimately, death (1). From a pathophysiological point of view, it is well established that in PAH the main abnormality is an endothelial dysfunction (2), which correlates with a decrease in vasodilator factor release, such as nitric oxide (NO) (3) or prostacyclin, as well as an increase in vasoconstrictor production, endothelin-1,

(Received in original form September 7, 2009; accepted in final form March 24, 2010)

This work was supported by institutional grants from ANR-Physio-2006-015, Fonds Européen pour le Développement Régional (n° 8,891), Fondation de France (2008002719), CNRS, INSERM, and Université d'Angers. S.T.-C. is recipient of a doctoral fellowship from the French Education Ministry.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to M. Carmen Martinez, Ph.D., CNRS UMR 6214, Faculté de Médecine, Rue Haute de Reclée, Angers, F-49045 France. E-mail: carmen.martinez@univ-angers.fr

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 182, pp 261–268, 2010

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.200909-1347OC on March 25, 2010
Internet address: www.atsjournals.org

AT A GLANCE COMMENTARY

Scientific Knowledge on the Subject

Although several studies have shown that circulating microparticles (MPs) are elevated during pulmonary arterial hypertension (PAH), the origin and the role played by these MPs in the regulation of endothelial function are not known.

What This Study Adds to the Field

Increased circulating MPs from hypoxic rats induce endothelial dysfunction through both the decrease in nitric oxide production and an increase in oxidative stress in pulmonary endothelial cells.

which is able to stimulate cell proliferation. NO generated from endothelial NO synthase (eNOS) plays a key role in the vascular homeostasis. Besides its vasodilator properties on smooth muscle cells, NO inhibits proliferation and migration of these cells and can regulate vascular remodeling. In addition, several studies have shown that oxidative stress initiated by the reactive oxygen species (ROS) plays a determinant role in the reduced effect of endothelial NO and may take place in vasculature from patients with PAH or in animal models developing PAH (4–6). Among the ROS, superoxide anions (O_2^-) are known to reduce biological activity of NO and generate deleterious metabolites such as peroxynitrite ($ONOO^-$) (7).

Recently, two groups reported a positive correlation between plasma concentration of circulating microparticles (MPs) and the severity of PAH (8, 9). MPs are vesicles with procoagulant and proinflammatory properties shed from the blebbing plasma membrane of various cells types, like circulating cells (such as platelets, erythrocytes, T and B cells, and monocytes) or cells from the vascular wall (endothelial and smooth muscle cells), during activation by agonists, shear stress, or apoptosis. MPs are present in blood from healthy individuals and many studies have reported elevated levels of circulating MPs under many pathological states, such as cardiovascular diseases (for review see 10), strengthening the notion that MPs may play a role in the initiation or/and maintenance of several components of these diseases. Indeed, MPs can be considered as vectors of biological messages, such as induction of vascular and endothelial dysfunction, the main factor of PAH pathophysiology.

Contradictory data concerning the origin of MPs from patients with PAH have also been described. Although Bakou-boula and colleagues (8) have described that these patients display elevated levels of procoagulant MPs, Amabile and colleagues (9) have shown that they are mainly from endothelial and leukocyte origins. However, no evidence of the potential effects of MPs on molecular mechanisms implicated in the

pathophysiology of PAH have been provided. Therefore, the present study investigates the effects of MPs from hypoxic rats on endothelial function. Because endothelial function of both systemic (11, 12) and pulmonary arteries (6) can also be affected by hypoxia, the present study assessed the effects and the mechanisms by which hypoxic MPs affect NO and ROS in endothelial cells (ECs) from aorta and from pulmonary arteries from the rat.

METHODS

Animals

All animal studies were performed using approved institutional protocols. Male Wistar rats (aged 8–10 wk, 250–300 g) were separate into two groups. Control or normoxic rats were housed in ambient room air, whereas hypoxic rats were exposed to chronic hypoxia for 3 weeks in a controlled hypobaric chamber. PAH was assessed by measuring the mean pulmonary artery pressure (15.6 ± 0.81 vs. 30.4 ± 1.02 mm Hg in normoxic vs. hypoxic rats, $P < 0.05$) and the ratio of right ventricle to left ventricle plus septum weight (0.26 ± 0.04 vs. 0.51 ± 0.01 in normoxic vs. hypoxic rats, $P < 0.05$). Normoxic or hypoxic MPs were extracted from rat blood.

MP Isolation

Blood from normoxic or hypoxic rats was collected in sodium citrate tubes after a cardiac puncture. Samples were centrifuged for 3 minutes at $1,900 \times g$, and then plasma was centrifuged for 4 minutes at $5,000 \times g$ to obtain platelet-free plasma (PFP). PFP (100 μ l) was frozen and stored at -80°C until subsequent use. As previously described (13), remaining PFP was subjected to three series of centrifugations at $15,000 \times g$ for 30 minutes to eliminate plasma and to pellet MPs, and supernatant was replaced by 0.9% saline salt solution. Finally, MP pellets were stored at 4°C until subsequent use. Washing medium from the last supernatant was used as control (vehicle).

Characterization of MP Phenotype

Membrane MP subpopulations were discriminated in PFP according to the expression of membrane-specific antigens. Numeration of platelet, endothelial, leukocyte, and erythrocyte MPs was performed using anti-CD61, anti-CD54, anti-CD45 (BioLegend, San Diego, CA), and anti-Erythroid cell (BD Biosciences, San Jose, CA) labeling, respectively.

Cell Culture

Primary ECs were isolated from rat aortic and pulmonary arteries. The extraction method was adapted from the protocol of Kobayashi and colleagues (14). Cells were treated for 24 hours in the absence or presence of normoxic or hypoxic MPs at the circulating levels of MPs detected in the plasma of normoxic or hypoxic rats, as previously described for other pathologies (15–17).

NO and O_2^- Determinations by Electron Paramagnetic Resonance

Detection of NO and O_2^- productions were performed as previously described (15–17).

Xanthine Oxidase Activity

Determination of xanthine oxidase activity was performed using Xanthine Oxidase Assay Kit (BioVision Research Products, Mountain View, CA) according to the manufacturer's instructions.

Western Blotting

Blots were performed as previously described (18).

Vascular Reactivity

Rats were treated *in vivo* by tail vein injection of hypoxic MPs at the circulating level detected in the plasma of hypoxic rats or the same volume of control. PAH was measured 24 hours after hypoxic MP injection. In another set of experiments, aortic rings and extrapulmonary arteries were isolated 24 hours after MP injection and mounted on

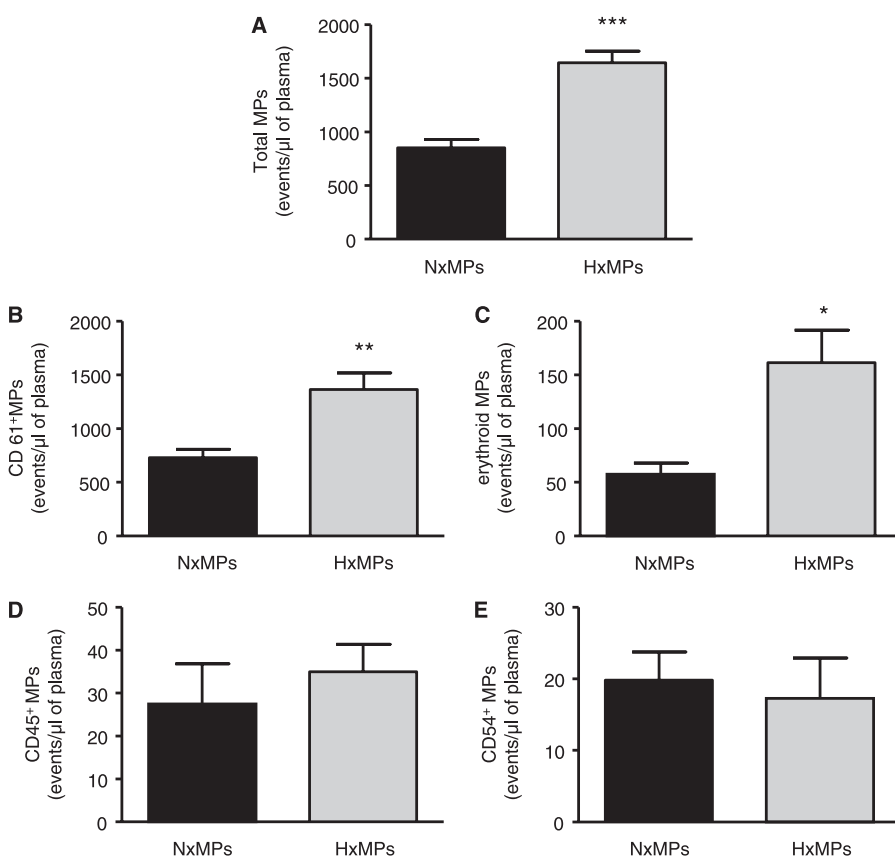


Figure 1. Circulating microparticle (MP) levels in hypoxic rats compared with normoxic rats. Histograms show (A) total circulating MP levels, and (B) platelet- (CD61⁺), (C) erythrocyte- (erythroid), (D) leukocyte- (CD45⁺), and (E) endothelium-derived (CD54⁺) MPs from normoxic rats (NxMPs, $n = 15$) and hypoxic rats (HxMPs, $n = 22$). Results are expressed as events/ μ l of plasma and given as mean \pm SEM. * $P < 0.1$; ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$.

a wire myograph filled with physiological salt solution for measurement of vascular reactivity, as previously described (17).

Data Analysis

Data are expressed as mean \pm SEM, and *n* represents the number of experiments performed with ECs or the number of rats for vascular reactivity. $pD_2 = -\log EC50$. EC50 being the molar concentration of the agonist that produces 50% of the maximal effect, Statistical analyses were performed by two-way analysis of variance, and non-parametric Mann-Whitney *U* tests or analysis of variance for repeated measures and subsequent Bonferroni *post hoc* test. *P* values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

See the online supplement for additional details on the methods for making these measurements.

RESULTS

Circulating Levels of MPs and Their Cellular Origins

The total number of circulating MPs was significantly increased in hypoxic rats compared with normoxic rats (Figure 1A). Phenotypical characterization of the cellular origin of MPs showed a significant increase in the circulating levels of platelet (CD61⁺)- and erythrocyte-derived MPs in hypoxic rats versus normoxic rats (Figures 1B and 1C). MPs from other cellular origins were not significantly different between the two groups of rats, including those from leukocytes (CD45⁺) and endothelial (CD54⁺) cells (Figures 1D and 1E).

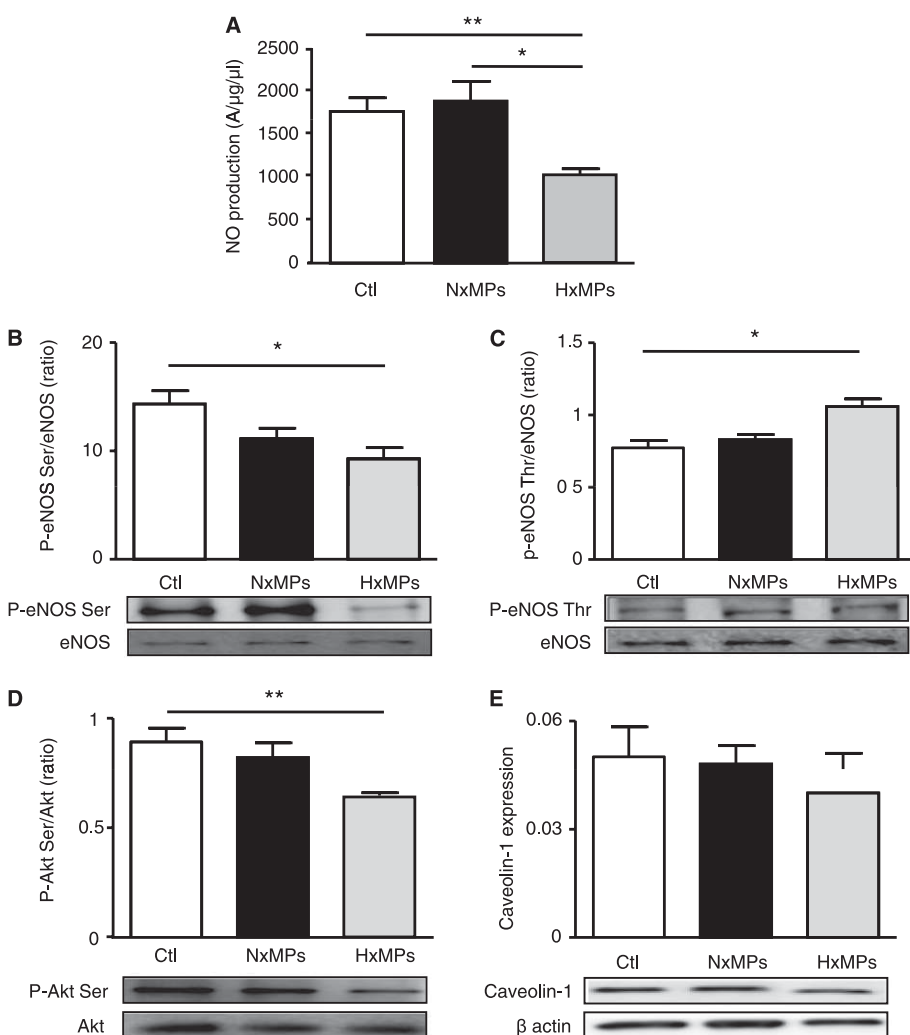


Figure 2. Microparticles (MPs) from hypoxic rats decrease nitric oxide (NO) production in endothelial cells (ECs) from aorta. Cells were incubated for 24 hours in the presence of vehicle (Ctl), MPs from normoxic rats (NxMPs), or MPs from hypoxic rats (HxMPs). (A) Quantification of the amplitude of the NO-Fe(DETC)₂ signal in ECs from rat aorta. Values are expressed in units of amplitude/μg/μl of proteins of samples (*n* = 8–9). Histograms show the ratio of phosphorylation of (B) endothelial NO synthase (eNOS) Ser 1177 and (C) eNOS Thr 495 versus total eNOS, and (D) phospho-Akt Ser 473 versus total Akt and (E) caveolin-1. Immunoblots were quantified by densitometric analysis and normalized with either the full form of corresponding protein or with β-actin (for caveolin-1). Data are representative six to eight separate blots, and the densitometry values are given as mean \pm SEM. **P* < 0.05 and ***P* < 0.01.

Hypoxic MPs Reduce NO Production in ECs

Control cells and those treated with MPs from either normoxic or hypoxic rats exhibited an electron paramagnetic resonance feature of signals derived from NO-Fe(DETC)₂. As shown in Figure 2A, treatment of aortic ECs with normoxic MPs did not affect NO production. However, hypoxic MPs significantly reduced NO release in ECs from aorta by approximately 45%. To identify the molecular mechanisms implicated in this decrease in NO production, we analyzed by Western blotting the expression levels and phosphorylation of eNOS as well as several enzymes linked to the NO pathway. In ECs from aorta, eNOS expression was not modified by MP treatment. By contrast, treatment by hypoxic MPs, but not by normoxic MPs, evoked a significant decrease in phosphorylation on the activator (Ser 1177) site (Figure 2B) and a significant increase in eNOS phosphorylation on the inhibitor (Thr 495) site (Figure 2C). Also, hypoxic, but not normoxic, MPs reduced phosphorylation of Akt on Ser 473 kinase involved in eNOS phosphorylation, without affecting its expression (Figure 2D). No effect of MPs was observed regarding caveolin-1 expression (Figure 2E).

In ECs from pulmonary arteries, hypoxic, but not normoxic, MPs reduced NO release (approximately 20% reduction) (Figure 3A). Although eNOS expression was not affected by MP treatment, hypoxic MPs induced a significant decrease in eNOS phosphorylation at Ser 1177 (Figure 3B) and a significant increase in eNOS phosphorylation at Thr 495 (Figure 3C).

However, in contrast to ECs from aorta, neither Akt phosphorylation on Ser 473 site nor its expression levels were changed (Figure 3D), whereas caveolin-1 expression was significantly reduced after hypoxic MP treatment (Figure 3E).

Hypoxic MPs and O_2^- Release in ECs

Electron paramagnetic resonance measurement of O_2^- production demonstrated that normoxic MPs did not modify O_2^- release from ECs from either the aorta or the extrapulmonary arteries (Figures 4A and 4B). By contrast, although hypoxic MPs did not affect O_2^- production in aortic ECs (Figure 4A), these MPs significantly increased O_2^- production by approximately 36% in ECs from pulmonary arteries compared with normoxic MPs (Figure 4B). To determine the source of ROS production, ECs from pulmonary arteries were incubated in the presence of inhibitors of xanthine oxidase (allopurinol), mitochondrial complex I (rotenone), or nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) oxidase (apocynin), and then, O_2^- production was evaluated. Allopurinol and rotenone significantly reduced the ability of hypoxic MPs to increase O_2^- production in ECs from pulmonary arteries. Interestingly, O_2^- production was not significantly different in the absence or in presence of apocynin after treatment of ECs from pulmonary arteries with hypoxic MPs (Figure 4C).

To strengthen the implication of xanthine oxidase, we quantified xanthine oxidase activity in ECs from pulmonary arteries treated with either normoxic or hypoxic MPs. As shown in Figure 4D, treatment of ECs from pulmonary arteries with hypoxic, but not normoxic, MPs induced an increase in xanthine oxidase activity when compared with control.

Hypoxic MPs Impair *Ex Vivo* Endothelium-Dependent Relaxation

To analyze whether the MPs can induce acute changes in pulmonary artery blood pressure, hypoxic MPs were injected into rats, and 24 hours later mean pulmonary artery blood pressure was recorded. Injection of hypoxic MPs did not significantly modify pulmonary artery blood pressure (values of pulmonary artery pressure being 15.6 ± 0.8 vs. 18.7 ± 2.7 mm Hg for normoxic noninjected rats ($n = 15$) and normoxic rats injected with hypoxic MPs ($n = 4$), respectively).

To study the *ex vivo* endothelial function, we assessed relaxation response to either acetylcholine in aorta or carbachol in extrapulmonary arteries from rats treated with hypoxic MPs. Injection of hypoxic MPs induced a rightward shift in the concentration–response curves to vasodilators in both aortic rings (pD_2 : 7.35 ± 0.04 vs. 6.72 ± 0.04 in normoxic vs. hypoxic MPs, $P < 0.05$) (Figure 5A) and extrapulmonary arteries

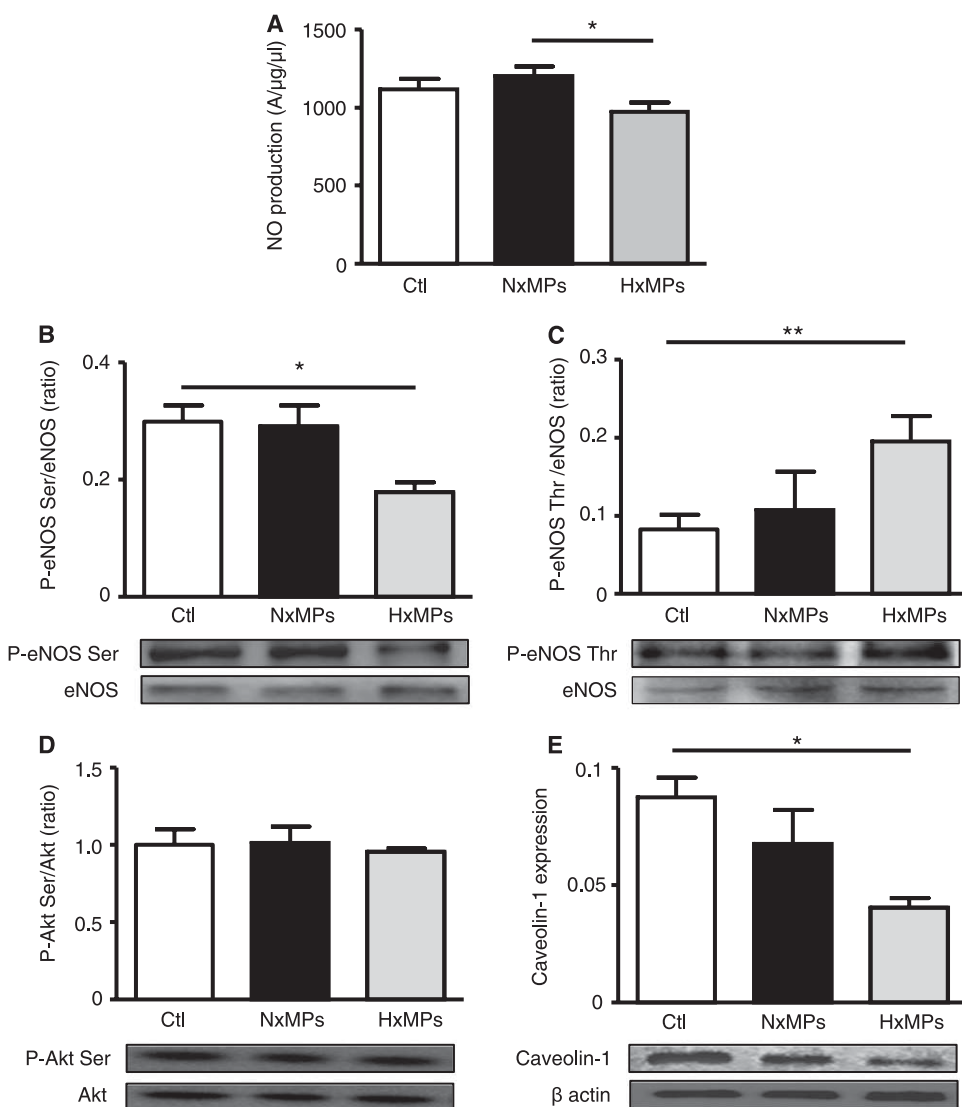


Figure 3. Microparticles (MPs) from hypoxic rats decrease nitric oxide (NO) production in endothelial cells (ECs) from pulmonary arteries. Cells were incubated for 24 hours in the presence of vehicle (Ctl), MPs from normoxic rats (NxMPs), or MPs from hypoxic rats (HxMPs). (A) Quantification of the amplitude of the NO-Fe(DETC)₂ signal in ECs from rat pulmonary arteries. Values are expressed in units of amplitude/μg/μl of proteins of samples ($n = 8-9$). Histograms show the ratio of phosphorylation of (B) eNOS Ser 1177 or (C) eNOS Thr 495 versus total eNOS, and (D) phospho-Akt Ser 473 versus total Akt and (E) caveolin-1 expression. Immunoblots were quantified by densitometric analysis and normalized with either the full form of corresponding protein or with β -actin (for caveolin-1). Data are representative of six to eight separate blots, and the densitometry values are given as mean \pm SEM. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

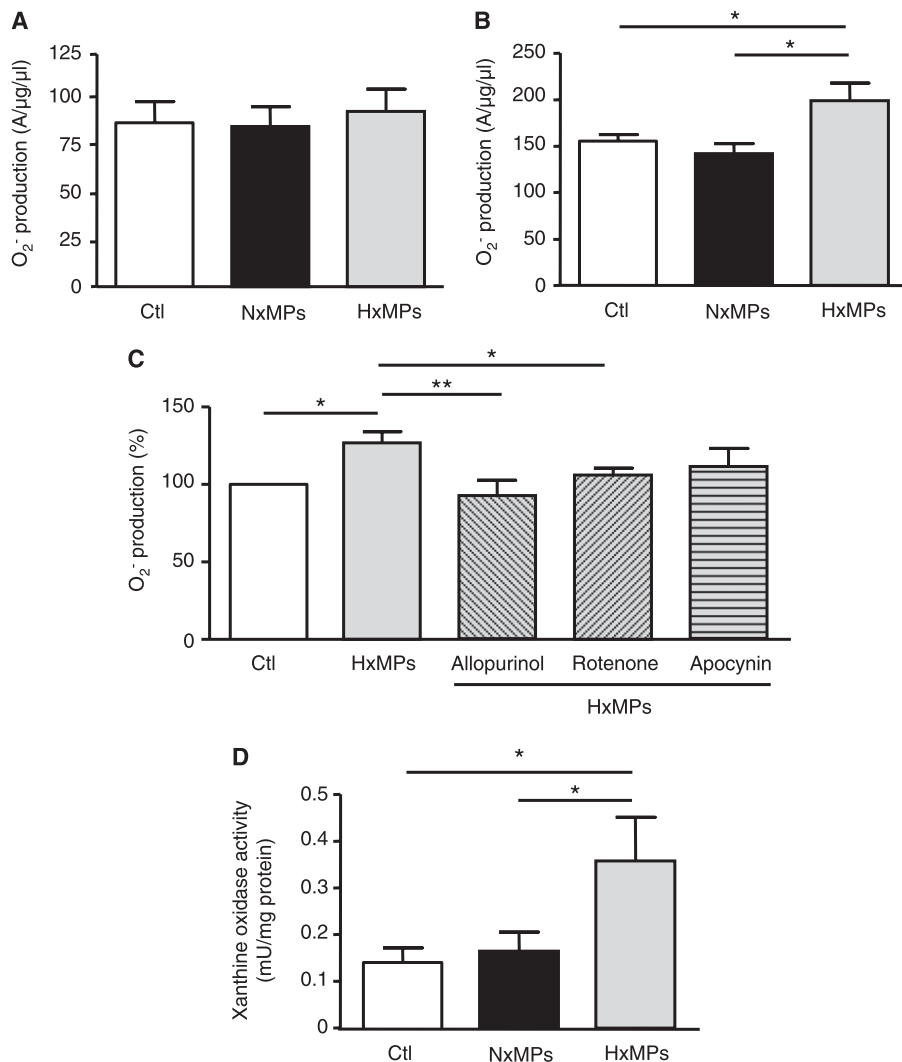


Figure 4. Microparticles (MPs) from hypoxic rats increase superoxide anion (O_2^-) release only in endothelial cells (ECs) from pulmonary arteries. Measurement of reactive oxygen species (ROS) production in ECs from (A) aorta or (B) pulmonary arteries. Cells were incubated for 24 hours in the presence of either vehicle (Ctl), MPs from normoxic rats (NxMPs), or MPs from hypoxic rats (HxMPs). (C) To determine the origin of the increase of ROS production in ECs from pulmonary arteries, cells were treated for 45 minutes with allopurinol (50 μ M), rotenone (5 μ M), or apocynin (100 μ M) and then with HxMPs for 24 hours. Data are expressed in amplitude/ μ g/ μ l of proteins of samples (A and B) or in amplitude/ μ g/ μ l of proteins of samples normalized versus Ctl (C), and values are given as mean \pm SEM ($n = 8-12$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$. (D) Xanthine oxidase activity in ECs from pulmonary arteries. Cells were incubated for 24 hours in the presence of either vehicle (Ctl), MPs from normoxic rats (NxMPs), or MPs from hypoxic rats (HxMPs), and proteins were extracted. Data are expressed in mU/mg of proteins of sample (mean \pm SEM, $n = 7$). * $P < 0.05$.

(pD_2 : 7.59 ± 0.04 vs. 6.66 ± 0.05 in normoxic vs. hypoxic MPs, $P < 0.05$) (Figure 5B), without affecting the maximal relaxation.

Finally, to determine whether the differential effects of MPs were due to qualitative difference or just due to increased levels of circulating MPs from hypoxic rats, we injected, in control rats, a twofold higher quantity of normoxic MPs to have the same number present as for hypoxic MPs. Only the injection of hypoxic MPs induced a rightward shift of the concentration-response curves to carbachol compared with injection with either vehicle or a double amount of normoxic MPs (pD_2 : 7.16 ± 0.04 for a double amount of normoxic MPs), without affecting the maximal relaxation (Figure 5B). These results suggest that the differential effect between normoxic and hypoxic MPs is mainly due to qualitative differences in MP composition.

DISCUSSION

In the present study, circulating levels of MPs were elevated in hypoxic rats compared with normoxic rats. It is particularly interesting to note that MPs were mainly derived from platelets and erythrocytes. We also demonstrate that hypoxic MPs decreased NO production in ECs from both aorta and pulmonary arteries, which was linked to a decrease in phosphorylation of eNOS at its stimulatory site and an increase in phosphorylation at its inhibitory site. On the other hand, O_2^- production

was increased only in ECs from pulmonary arteries by a mechanism sensitive to allopurinol and rotenone and associated with an increase of xanthine oxidase activity. These results underscore a tissue specificity of the effects of MPs, depending on the vascular bed, in terms of oxidative stress. Furthermore, injection of hypoxic MPs decreased endothelium-dependent relaxation in systemic and pulmonary arteries. Altogether, these results suggest that hypoxic MPs induce endothelial dysfunction and highlight the involvement of MPs from hypoxic animals in the pathogenesis and in the maintenance of PAH by affecting mainly the NO pathway and oxidative stress in the pulmonary vasculature.

Although circulating levels of MPs are increased in patients with PAH (8, 9), differences in MP origin have been reported. Although only levels of MPs derived from ECs and leukocytes are increased in patients with PAH (9), Bakouboula and colleagues (8) have shown that procoagulant MPs are elevated in patients with PAH. Here we demonstrate that in an animal model of hypoxic PAH the number of MPs, mainly from platelets and red cells, is increased. These differential data can be explained by the difference in the heterogeneity of patients with PAH, by the different steps of centrifugation used for MP isolation, or by the different membrane markers used to identify cell origin of MPs. We cannot distinguish among these possibilities, although the model of hypoxic PAH used in the present study displays similar cardiovascular characteristic of PAH observed in patients, such as increased pulmonary vaso-

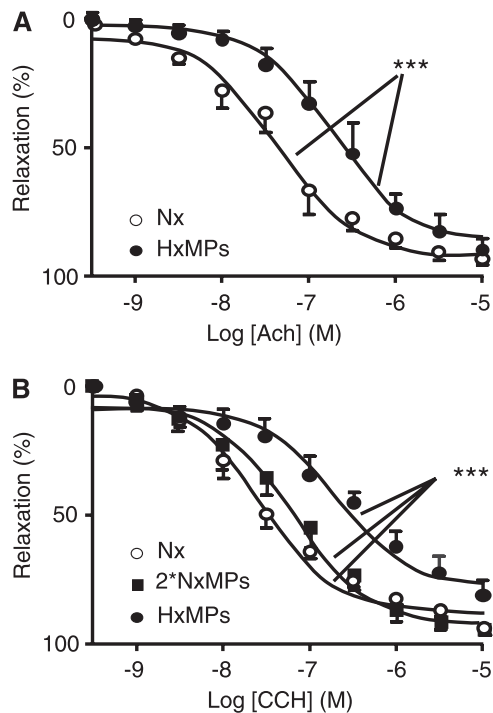


Figure 5. Hypoxic microparticles (MPs) impair endothelium-dependent relaxation. (A) Acetylcholine (ACh)-induced relaxation in aorta from control (Nx) and hypoxic (HxMPs) MP-injected rats. (B) Carbachol (CCH)-induced relaxation in pulmonary arteries from Nx, double amount of normoxic MP (2*NxMPs)- and HxMPs-injected rats. Results were expressed as a percentage of relaxation of phenylephrine-induced precontraction. *** $P < 0.001$.

lar tone, medial thickening, and neomuscularization of pulmonary arterioles (19). Moreover, as previously described (20), hypoxic rats displayed an increased hematocrit value when compared with normoxic animals (data not shown). This increase in red blood cell count leading to volume contraction may account for the increased level of total MPs and also for the increase in erythroid MPs. However, neither levels of leukocyte- nor endothelial-derived MPs were increased to the same extent, suggesting that the increase in MPs from platelets and erythrocytes is probably specific for these cell populations (both platelets and erythrocytes). In addition, we showed that hypoxic MPs, but not a double amount of normoxic MPs, are able to induce endothelial dysfunction in extrapulmonary artery rings indicating that the effects induced by hypoxic MPs are independent of the number of MPs but dependent on the different compositions and/or origin between normoxic and hypoxic MPs.

A prolonged exposure to hypoxia results in a decrease in aortic eNOS protein expression and an impaired endothelium-dependent relaxation to acetylcholine on aortic rings in rats (11). The role of eNOS in the PAH pathogenesis is well demonstrated; thus overproduction of eNOS in transgenic mice prevents hypoxia-induced PAH (21), whereas exposure to mild hypoxia results in severe PAH in eNOS-deficient mice (22). In the present study, *in vitro* endothelial function was assessed by direct measurement of NO production by ECs treated with MPs. We have shown a decrease in NO production in ECs from both aorta and pulmonary arteries treated with hypoxic MPs, indicating that hypoxic MPs might contribute to endothelial dysfunction observed in chronic hypoxia-induced PAH. In addition, with the changes in eNOS expression, NO production can be regulated by eNOS post-translational modifications.

When Ser 1177 is phosphorylated by several kinases, such as Akt (23), NO production is increased twice or three times compared with basal levels, whereas Thr 495 phosphorylation by protein kinase C is associated with a decrease in NO production (24). Thus the double phosphorylation of Ser 1177 and Thr 495 is crucial for eNOS activity in ECs. We found that hypoxic MPs were able to modify eNOS phosphorylation without affecting its expression both in ECs from aorta and pulmonary arteries. Indeed, hypoxic MPs increased Thr 495 and decreased Ser 1177 phosphorylations in ECs from both types of arteries. Furthermore, hypoxic MPs induced a decrease in Akt phosphorylation, Akt being the kinase involved in eNOS activation-associated phosphorylation in aortic ECs. Although eNOS phosphorylation by Akt has been reported to be impaired in hypoxic pulmonary arteries (25), hypoxic MPs were not able to modify Akt phosphorylation in ECs from pulmonary arteries under the experimental conditions used. Regarding the latter, other kinases such as AMP-activated protein kinase or protein kinase C (26, 27) may be implicated in the eNOS phosphorylation at the inhibitory site evoked by hypoxic MPs. Nevertheless, decreased eNOS activity probably concurs to reduce NO production in ECs from both aorta and pulmonary arteries.

The subcellular localization of caveolin-1 is critical for eNOS regulation. In ECs, caveolin-1 negatively regulates NO signaling by binding eNOS and sequestering it at the plasma membrane. The activation of caveolar eNOS depends on its dissociation from caveolin-1 (28); in addition, if the interaction between caveolin-1 and eNOS is altered, vascular integrity and function are affected. Here, we demonstrate a decrease in caveolin-1 expression only in ECs from pulmonary arteries treated with hypoxic MPs, which may argue against a reduced eNOS activity. However, in this context, several works have described an alteration in eNOS and caveolin-1 link in PAH leading to the alteration of vascular integrity and decrease in NO production. Thus, reduction in the expression of caveolin-1 has been reported in primary PAH and in experimental models of PAH induced by monocrotaline (29, 30) and hypoxic PAH (31). Altogether, pulmonary hypertension affects caveolin/eNOS balance, the consequence of which concurs with endothelial dysfunction. In line with these studies, we found that 24-hour treatment with hypoxic MPs induced both reduction in caveolin-1 expression and an increase in phosphorylation of eNOS on its inhibitor site leading to a decrease in NO production. Thus, the present data strengthen the notion that hypoxic MPs participate in the changes in endothelium integrity during PAH.

Superoxide anion can react with other reactive species, including NO. The O_2^- /NO interaction occurs at very high speed constant, which leads to NO inactivation and plays a major role in endothelial dysfunction associated with vascular pathologies (7). However, although the participation of ROS production in PAH pathogenesis is generally accepted (32), the sources responsible for ROS production in the hypoxic pulmonary arteries are not well defined (33). Several studies have suggested an involvement of the NADPH oxidase in the development of hyperreactivity and endothelial dysfunction during PAH (6, 34). In other models of PAH, an increased capacity for ROS production by NADPH oxidase as well as by mitochondria has been described (35, 36). Hoshikawa and colleagues (37) have found that in lung from adult rats, xanthine oxidase activity is elevated under hypoxic conditions, especially during the induction phase (~ 7 d) of hypoxic exposure, because treatment with allopurinol in the first 3 days of hypoxia is sufficient to limit right ventricular hypertrophy and pulmonary vascular thickening. Most recently, in neonatal rats exposed to hypoxia, it has been reported that O_2^- generation from

xanthine oxidase is implicated in endothelial dysfunction and vascular remodeling (38). Our results demonstrate that O_2^- production by treatment with hypoxic MPs takes place only in ECs from pulmonary arteries, indicating a tissue specificity of hypoxic MPs toward ECs from the pulmonary bed. In addition, these effects are associated with a participation of both xanthine oxidase and mitochondrial complex I, without implicating NADPH oxidase or changes in gp91 expression (data not shown). These data are in accordance with the implication of xanthine oxidase activity on the deleterious effects in endothelial function induced by MPs derived from apoptotic lymphocytes (15) and reveal the ability of hypoxic MPs to modulate oxidative status in pulmonary ECs.

Finally, although hypoxic MPs were not able to modify pulmonary blood pressure after 24 hours of *in vivo* treatment, they reduced the ability of muscarinic agonists to promote endothelium-dependent relaxation in both aorta and pulmonary arteries. These results highlight the distinction between endothelial dysfunction and changes in pulmonary blood pressure after treatment with hypoxic MPs for 24 hours. It should be noted that the increase in pulmonary blood pressure described in hypoxic animal models is associated with hypertrophy of smooth muscle cells resulting in an increased vascular resistance. Thus, one can advance the hypothesis that acute treatment with hypoxic MPs might not be able to affect smooth muscle proliferation.

In the present study, hypoxic MPs negatively affected the eNOS pathway, decreased NO release, and increased ROS production in ECs. These results are in concordance with other data present in the literature, wherein a decrease in endothelium-dependent relaxation is widely reported in pulmonary (6, 39) and systemic (11, 12) circulation during hypoxia.

In summary, we report that hypoxic rats developing PAH have increased levels of circulating MPs, especially platelet- and erythrocyte-derived MPs. Hypoxic MPs can impair endothelial function in both rat aorta and pulmonary arteries, by directly reducing eNOS activity and by limiting NO bioavailability, and, in the pulmonary bed only, by increasing ROS production. Together, these data strongly suggest that circulating hypoxic MPs are able to induce endothelial dysfunction and demonstrate for the first time their pathophysiological relevance, in this model. From these results, one can advance the hypothesis that hypoxic MPs contribute to the pathophysiological process of PAH.

Conflict of Interest Statement: None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

Acknowledgment: The authors thank Dr Mirela Delibegovic for careful reading of the manuscript and Guillaume Simon for assistance in measuring of pulmonary blood pressure.

References

- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:13S–24S.
- Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004;109:159–165.
- Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995;333:214–221.
- Bowers R, Cool C, Murphy RC, Tuder RM, Hopken MW, Flores SC, Voelkel NF. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:764–769.
- Farahmand F, Hill MF, Singal PK. Antioxidant and oxidative stress changes in experimental cor pulmonale. *Mol Cell Biochem* 2004;260: 21–29.
- Fresquet F, Pourageaud F, Leblais V, Brandes RP, Savineau JP, Marthan R, Muller B. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *Br J Pharmacol* 2006;148:714–723.
- Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 2000;87:840–844.
- Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, Zupan M, Canuet M, Grunebaum L, Brunette A, et al. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:536–543.
- Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:1268–1275.
- Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R. Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1004–H1009.
- Toporsian M, Govindaraju K, Nagi M, Eidelman D, Thibault G, Ward ME. Downregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after prolonged hypoxia *in vivo*. *Circ Res* 2000;86:671–675.
- Reboul C, Gibault A, Tanguy S, Dauzat M, Obert P. Alteration of endothelium-mediated vasodilator response in the rat hindlimb vasculature consecutive to chronic hypoxic stress: NO and EDHF involvement. *Vascul Pharmacol* 2009;51:154–161.
- Martinez MC, Larbret F, Zobairi F, Coulombe J, Debili N, Vainchenker W, Ruat M, Freyssinet JM. Transfer of differentiation signal by membrane microvesicles harboring hedgehog morphogens. *Blood* 2006;108:3012–3020.
- Kobayashi M, Inoue K, Warabi E, Minami T, Kodama T. A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2005;12:138–142.
- Mostefai HA, Agouni A, Carusio N, Mastronardi ML, Heymes C, Henrion D, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase regulate nitric oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte microparticles in endothelial cells. *J Immunol* 2008;180:5028–5035.
- Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, Heymes C, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* 2008;173:1210–1219.
- Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, Henrion D, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *FASEB J* 2007;21:2735–2741.
- Tesse A, Martinez MC, Hugel B, Chalupsky K, Muller CD, Meziani F, Mitolo-Chieppa D, Freyssinet JM, Andriantsitohaina R. Upregulation of proinflammatory proteins through NF- κ B pathway by shed membrane microparticles results in vascular hyporeactivity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2522–2527.
- Bonnet S, Dumas-de-La-Roque E, Bégueret H, Marthan R, Fayon M, Dos Santos P, Savineau JP, Baulieu EE. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9488–9493.
- Bonnet S, Dubuis E, Vandier C, Martin S, Marthan R, Savineau JP. Reversal of chronic hypoxia-induced alterations in pulmonary artery smooth muscle electromechanical coupling upon air breathing. *Cardiovasc Res* 2002;53:1019–1028.
- Ozaki M, Kawashima S, Yamashita T, Ohashi Y, Rikitake Y, Inoue N, Hirata KI, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. Reduced hypoxic pulmonary vascular remodeling by nitric oxide from the endothelium. *Hypertension* 2001;37:322–327.
- Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, Morris KG Jr, Hepler LK, Sato K, LeCras TD, Abman SH, Weinberger HD, Huang PL, et al. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest* 1999;103:291–299.
- Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 1999;399:597–601.
- Matsubara M, Hayashi N, Jing T, Titani K. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by protein kinase C. *J Biochem* 2003;133:773–781.
- Murata T, Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H. Decreased endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) activity resulting from abnormal interaction between eNOS and its regulatory proteins in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Biol Chem* 2002;277:44085–44092.
- Chen ZP, Mitchellhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett* 1999;443:285–289.

27. Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* 2001;88:E68–E75.
28. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997;272:25907–25912.
29. Achcar RO, Demura Y, Rai PR, Taraseviciene-Stewart L, Kasper M, Voelkel NF, Cool CD. Loss of caveolin and heme oxygenase expression in severe pulmonary hypertension. *Chest* 2006;129:696–705.
30. Mathew R, Huang J, Shah M, Patel K, Gewitz M, Sehgal PB. Disruption of endothelial-cell caveolin-1alpha/raft scaffolding during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2004;110:1499–1506.
31. Mathew R, Huang J, Gewitz MH. Pulmonary artery hypertension: caveolin-1 and eNOS interrelationship: a new perspective. *Cardiol Rev* 2007;15:143–149.
32. Herget J, Wilhelm J, Novotna J, Eckhardt A, Vytasek R, Mrazkova L, Ostadal M. A possible role of the oxidant tissue injury in the development of hypoxic pulmonary hypertension. *Physiol Res* 2000; 49:493–501.
33. Nozik-Grayck E, Stenmark KR. Role of reactive oxygen species in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Adv Exp Med Biol* 2007;618:101–112.
34. Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JS, Folz RJ. Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L2–L10.
35. Weissmann N, Zeller S, Schafer RU, Turowski C, Ay M, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, *et al*. Impact of mitochondria and NADPH oxidases on acute and sustained hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:505–513.
36. Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, Boer C, Musters RJ, van Hardeveld C, Paulus WJ, Simonides WS. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 2007;75:770–781.
37. Hoshikawa Y, Ono S, Suzuki S, Tanita T, Chida M, Song C, Noda M, Tabata T, Voelkel NF, Fujimura S. Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol* 2001;90:1299–1306.
38. Jankov RP, Kantores C, Pan J, Belik J. Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;294: L233–L245.
39. Adnot S, Raffestin B, Eddahibi S, Braquet P, Chabrier PE. Loss of endothelium-dependent relaxant activity in the pulmonary circulation of rats exposed to chronic hypoxia. *J Clin Invest* 1991;87:155–162.

Publication :

Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnea

Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnoea

To the Editors:

Multiple pathophysiological mechanisms have been proposed to contribute to the increased cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnoea (OSA), including autonomic dysfunction, inflammation, oxidative stress and endothelial dysfunction [1]. Microparticles (MPs) are small membrane vesicles that are shed from circulating cells or from the components of the vessel wall in response to activation and apoptosis. There is growing evidence in support of a potential role of MPs in the field of cardiovascular diseases. Increased levels of MPs derived from various cell types are found in patients at risk of cardiovascular diseases [2]. By modulating inflammation, coagulation, vasomotor reactivity and angiogenesis, MPs might directly contribute to cardiovascular diseases [2]. Recent case-control studies suggest a potential involvement of MPs in OSA-associated cardiovascular morbidity [3–6]. An increase in morning levels of MPs derived from activated leukocytes has been demonstrated in otherwise healthy male OSA patients with marked nocturnal desaturations [5]. *In vitro*, nitric oxide (NO) production by endothelial cells incubated with MPs from OSA patients correlates negatively with circulating levels of activated leukocyte-derived MPs [5]. *Ex vivo*, mice previously injected with MPs from OSA patients display endothelial dysfunction, reduced endothelial NO release and increased adhesion molecule expression [5].

A decrease in endothelial function from evening to morning has previously been demonstrated in patients with OSA and found to correlate with the severity of sleep-disordered breathing [7]. Since recent data suggest a potential role MPs in endothelial dysfunction [5], we aimed to study evening-to-morning change in activated leukocyte-derived MPs levels in otherwise healthy patients with OSA.

The study included 38 consecutive male patients (18–70 yrs of age) investigated by polysomnography (n=25) or respiratory recording (n=13) in the Sleep Unit of the Dept of Respiratory Medicine, Angers University (Angers, France) for suspected OSA. Exclusion criteria were previous treatment for OSA, body mass index (BMI) $\geq 35 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-2}$, history of coronary artery disease, heart failure, stroke, hypertension, diabetes mellitus, dyslipidaemia and patients receiving any drug known to affect endothelial function. Patients with an apnoea-hypopnoea index (AHI) of $\geq 5 \text{ events}\cdot\text{h}^{-1}$ were included in the OSA group. Patients with an AHI $< 5 \text{ events}\cdot\text{h}^{-1}$ were included in the control group. The study was approved by the University of Angers ethics committee and patients gave their informed consent.

MP characterisation was performed as described previously [5] in the evening before the night recording, at approximately 18:00–19:00 h, before dinner, and after waking up in the

morning following sleep recording, at approximately 07:00–08:00 h, before breakfast. Routine laboratory tests, including glucose, glycated haemoglobin, triglycerides, total cholesterol, high- and low-density lipoprotein cholesterol, and blood cell counts, were also performed on a morning blood sample. For MP isolation, evening and morning blood samples were drawn and collected in EDTA tubes (Vacutainers; Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) from a peripheral vein using a 21-gauge needle to minimise platelet activation, and were processed for assay within 2 h, as previously described [5]. Samples were centrifuged for 20 min at $270 \times g$, and plasma was then harvested and centrifuged for 20 min at $1,500 \times g$ to obtain platelet-free plasma (PFP). 200 μL PFP were frozen and stored at -80°C until use. MPs derived from activated L-selectin-positive leukocytes were identified by flow cytometry using anti-CD62L antibody. Irrelevant human immunoglobulin G was used as an isotype-matched negative control for each sample. To determine the MP concentration, 10 μL PFP were incubated with 5 μL specific antibody (Beckman Coulter, Villepinte, France). After 45 min incubation, samples were diluted in 300 μL 0.9% NaCl saline solution or annexin V labelling buffer. Equal volumes of sample and Flowcount beads were then added to calculate the MP concentration, and samples were analysed in a 500 MPL System flow cytometer (Beckman Coulter). Regions corresponding to MPs were identified in forward and side-angle light scatter intensity dot plot representations set at logarithmic gain, depending on their diameter (0.1–1 μm). Sample analysis was stopped after counting 10,000 events. MP analysis was performed without knowledge of the time the blood sample was taken (*i.e.* evening or morning) and whether it belonged to the OSA or the control group.

Mean \pm SEM AHI was $1.9 \pm 0.4 \text{ events}\cdot\text{h}^{-1}$ in the control group (n=15) and $16.2 \pm 2.4 \text{ events}\cdot\text{h}^{-1}$ in the OSA group (n=23). There was no statistically significant difference between OSA and control patients for age, BMI, Epworth sleepiness scale, arterial blood pressure, lipid metabolism, glucose metabolism or percentage of smokers (see online supplementary material for detailed data).

Figure 1 shows the comparison between evening and morning levels of CD62L+ MPs in the control group, the overall OSA group and patients with moderate-to-severe OSA (AHI $\geq 15 \text{ events}\cdot\text{h}^{-1}$; n=10). A significant decrease in CD62L+ MPs from mean \pm SEM $261.9 \pm 32.2 \text{ MPs per } \mu\text{L plasma}$ in the evening to $196.8 \pm 36.9 \text{ MPs per } \mu\text{L plasma}$ in the morning ($p=0.036$) was observed in the control group. A trend toward an increase from $230.9 \pm 25.3 \text{ MPs per } \mu\text{L plasma}$ in the evening to $259.8 \pm 28.5 \text{ MPs per } \mu\text{L plasma}$ in the morning (nonsignificant) was observed in the OSA group. In patients with moderate-to-severe OSA, CD62L+ MPs increased significantly ($p=0.047$) from evening ($253.1 \pm 29.5 \text{ MPs per } \mu\text{L plasma}$) to morning

This article has supplementary material available from www.erj.ersjournals.com

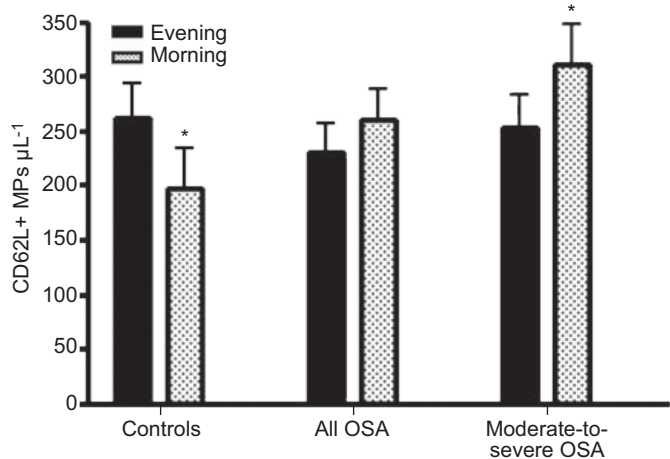


FIGURE 1. Comparison of mean \pm SEM evening and morning plasma levels of activated leukocyte-derived microparticles (CD62L+ MPs) in controls (n=15), all obstructive sleep apnoea (OSA) cases (n=23) and those with moderate-to-severe OSA (n=10). *: $p < 0.05$ by Wilcoxon signed-rank test.

(311.7 ± 35.4 MPs per μL plasma). As shown in figure 2, a significant correlation was observed in the OSA group between AHI and the morning–evening difference in CD62L+ MPs ($r=0.45$; $p=0.03$). In the OSA group, the morning level of CD62L+ MPs was positively correlated with the AHI ($r=0.55$; $p=0.006$) and the 4% oxygen ($r=0.55$; $p=0.006$). No correlation was observed between morning CD62L+ MPs and any other clinical or laboratory parameters.

Accumulation of leukocytes and their adhesion to the endothelium play a central role in the formation of atherosclerotic plaques. In asymptomatic subjects, circulating levels of leukocyte-derived MPs predict subclinical atherosclerosis burden [8]. Leukocyte-derived MPs were demonstrated to be competent inflammatory mediators able to induce endothelial cell activation and IL-6 release [9]. Systemic inflammation is considered as a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complication in OSA [1]. Previous studies have highlighted the roles of leukocytes in endothelial cell injury in OSA with decreased apoptosis and increased expression of L-selectin adhesion molecule [10]. An increase in leukocyte-derived MPs has recently been described in OSA [3, 5]. In accordance with these previous results, the present study underscores a positive correlation between morning CD62L+ MPs and the severity of sleep-disordered breathing. The finding that the evening-to-morning change in CD62L+ MPs correlates with the AHI in otherwise healthy patients provides evidence in support of a direct link between sleep-disordered breathing and leukocyte-derived MPs release. Evidence of the pathophysiological relevance of MPs in OSA was recently provided *ex vivo* by their ability to impair endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine and the endothelial response to flow when injected *i.v.* into mice [5]. It can be hypothesised that nocturnal release of leukocyte-derived MPs could be involved in the early morning attenuation of endothelial function [7] and contribute to the increased rate of cardiovascular events during the first hours after waking from sleep.

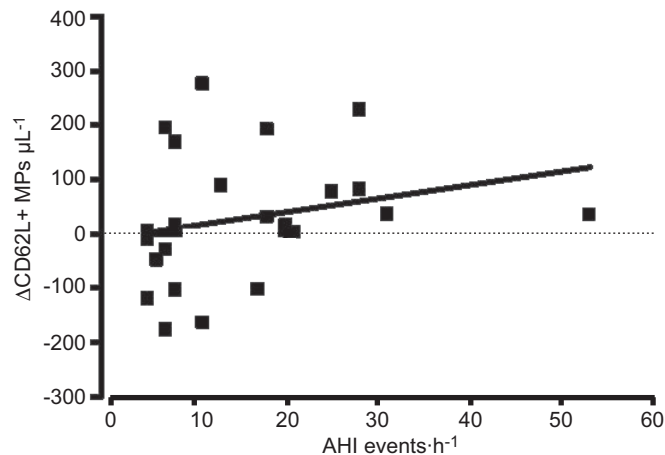


FIGURE 2. Scatter plot showing the relationship in the obstructive sleep apnoea group (n=23) between apnoea–hypopnoea index (AHI) and the morning–evening difference in plasma levels of activated leukocyte-derived microparticles ($\Delta\text{CD62L+ MPs}$). $r=0.45$; $p=0.03$.

However, randomised controlled trials including vascular reactivity assessment are still warranted to establish a causal link between circulating MPs and OSA, and the role of MPs, particularly leukocyte-derived MPs, in OSA-associated endothelial dysfunction.

W. Trzepizur^{*,#}, P. Priou^{*,#}, A. Paris^{*}, J. Nardi^{*}, S. Tual-Chalot[#], N. Meslier[#], T. Urban^{*}, R. Andriantsitohaina[#], M.C. Martinez[#] and F. Gagnadoux^{*,#}

^{*}Département de Pneumologie, Centre Hospitalier Universitaire, and [#]INSERM, U694, Université d'Angers, Faculté de Médecine, Angers, France.

Correspondence: F. Gagnadoux, Département de Pneumologie, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France. E-mail: frgagnadoux@chu-angers.fr

Statement of Interest: None declared.

REFERENCES

- Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome? *Postgrad Med J* 2009; 85: 693–698.
- Meziani F, Tesse A, Andriantsitohaina R. Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol Rep* 2008; 60: 75–84.
- Ayers L, Ferry B, Craig S, et al. Circulating cell-derived microparticles in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2009; 33: 574–580.
- Jelic S, Lederer DJ, Adams T, et al. Endothelial repair capacity and apoptosis are inversely related in obstructive sleep apnoea. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5: 909–920.
- Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, et al. Endothelial dysfunction and circulating microparticles from patients with obstructive sleep apnoea. *Am J Pathol* 2010; 177: 974–83.
- Yun CH, Jung KH, Chu K, et al. Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnoea. *J Clin Neurol*, 6: 89–98.

- 7 Itzhaki S, Lavie L, Pillar G, *et al.* Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea measured by peripheral arterial tone response in the finger to reactive hyperemia. *Sleep* 2005; 28: 594–600.
- 8 Chironi G, Simon A, Hugel B, *et al.* Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2775–2780.
- 9 Mesri M, Altieri DC. Endothelial cell activation by leukocyte microparticles. *J Immunol* 1998; 161: 4382–4387.
- 10 Dyugovskaya L, Lavie P, Lavie L. Increased adhesion molecules expression and production of reactive oxygen species in leukocytes of sleep apnea patients. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 934–939.

DOI: 10.1183/09031936.00150010

Manuscrit :

Sleep apnea syndrome microparticles enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium

Sleep apnea syndrome microparticles enhance vascular contraction: mandatory role of the endothelium

Simon Tual-Chalot,¹ Keita Fatoumata,¹ Pascaline Priou,^{1,2} Wojciech Trzepizur,^{1,2} Cristina Contreras,³ Dolores Prieto,³ M. Carmen Martinez,¹ Frédéric Gagnadoux,^{1,2} Ramaroson Andriantsitohaina¹

From the ¹INSERM U694, Université d'Angers, France; ²Département de Pneumologie, CHU d'Angers, France; ³Département de Physiologie, Faculté de Pharmacie, Universidad Complutense de Madrid, España

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Dr. Ramaroson Andriantsitohaina, INSERM U694, PBH-IRIS, Rue des Capucins, Angers, F-49045 France. Phone: +33 2 44 68 85 80; Fax: +33 2 44 68 85 88; e-mail: ramaroson.andriantsitohaina@univ-angers.fr

Author's contributions: Conceived and designed the experiments: STC, MCM, FG, RA. Performed the experiments: STC, KF, PP, WT, CC. Analyzed of the datas: STC, KF, PP, WT, MCM, FG, RA. Drafting the manuscript for important intellectual content: all authors.

Sources of support: This work was supported by the INSERM, the Université d'Angers, the Hospital of Angers, l'Innovation et la Recherche. S.T.-C. is recipient of a doctoral fellowship from French Education Ministry.

ABSTRACT

Obstructive sleep apnea (OSA) is characterized by repetitive apnea-hypopnea cycles during sleep associated with oxygen desaturation and sleep disruption. Microparticles are biological vectors of endothelial dysfunction in OSA, but their effects on vascular reactivity have not yet been assessed. The purpose of this work was to evaluate the role of microparticles from OSA patients in the regulation of vascular function. Two groups of patients undergoing polysomnography for OSA were compared. Microparticles obtained from whole blood either from OSA patients, control subjects, or a vehicle were injected *i.v.* to mice. Injection of microparticles from OSA patients induced *EX VIVO* vascular hyper-reactivity in response to vasoconstrictor agents in aortas with functional endothelium but hypo-reactivity in vessels without functional endothelium. Vascular hyper-reactivity was blunted in the presence of either the nitric oxide (NO)-synthase inhibitor L-NA alone or in combination with the non-selective inhibitor of cyclo-oxygenase, indomethacin. Microparticles from OSA patients reduced activity of endothelial NO-synthase and NO production. They increased aortic cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 expressions and the production of thromboxane A2 and prostacyclin. The selective thromboxane A2 receptor antagonist, SQ-29548, reduced response to serotonin in arteries from vehicle- and non-OSA microparticle- but not those from OSA microparticle-treated mice. These data provide evidence that circulating microparticles from OSA patients induce *EX VIVO* vascular hyper-reactivity with the obligatory role of the endothelium and subtle interactions between NO and cyclo-oxygenase pathways and metabolites. These results highlight the participation of microparticles to vascular dysfunction associated with OSA patients.

INTRODUCTION

Obstructive sleep apnea (OSA) syndrome is a highly prevalent disease characterized by recurrent episodes of partial or complete obstruction of the upper airways during sleep, leading to repeated falls in oxygen saturation. OSA is associated with hypertension, coronary artery disease, stroke, and premature death and considerable evidence is now available in support of an independent association between OSA and cardiovascular diseases (1). Various pathophysiological mechanisms have been proposed to contribute to the pathogenesis of vascular dysfunction in OSA patients (2). In this view, circulating microparticles (MPs) isolated from blood have been considered as biomarkers of vascular injury and inflammation in several cardiovascular pathologies such as acute myocardial infarction, sepsis, or metabolic syndrome (3-5). Indeed, in these diseases, an alteration of levels of MPs have been detected and frequently correlated with the severity of the pathology. MPs are vesicles with procoagulant and proinflammatory properties shed from the blebbing plasma membrane of various cell types, like circulating cells (such as platelets, erythrocytes, T and B cells, and monocytes) or cells from the vascular wall (endothelial and smooth muscle cells), during activation by agonists, shear stress or apoptosis (6, 7). Only since recently, MPs are also considered as effectors being able to vehicle biological messages on the target cells. However, very few reports set out to demonstrate the importance of MPs in OSA, and they mainly evoke an alteration of the origin of MP levels (8-11). Very recently, we provide evidence that OSA patients display the same levels of circulating MPs than healthy subjects, but levels of MPs from activated leukocytes (CD62L⁺ MPs) were higher in OSA patients (12). Most interestingly, there is a positive correlation between circulating levels of CD62L⁺ MPs and nocturnal desaturations severity (12, 13). The evening-to-morning change in activated leucocytes-derived MPs in otherwise healthy OSA patients provided evidence in support of a direct link between sleep disordered breathing and nocturnal MPs release (13). *In vitro* and *ex*

in vivo studies have also demonstrated that MPs from otherwise healthy patients with OSA can induce endothelial dysfunction, reduce endothelial-NO release and increase endothelial adhesion molecule expression (12). These recent data suggest that MPs could play a role in the pathogenesis of endothelial dysfunction that may initiate atherogenic process in OSA. However, to the best of our knowledge, the role played by MPs in the regulation of vascular contractility with respect to exaggerated vasoconstriction that occurs in sleep apnea patients (14) has never been assessed. Therefore the present study was designed to investigate the effects of MPs from OSA patients on vascular reactivity in response to vasoconstrictor agonists. The mechanisms by which OSA MPs affect vascular contractility were also investigated. MPs were injected intravenously into mice to test their pathophysiological relevance *in vivo*.

METHODS

Patients

Consecutive male patients (18 to 70 years old) investigated by polysomnography (PSG) or overnight respiratory recording in the Sleep Unit of the Department of Respiratory Medicine of Angers University for suspected OSA were screened for the study. Exclusion criteria were previous treatment for OSA, body mass index (BMI) ≥ 35 kg/m², history of coronary artery disease, heart failure, stroke, hypertension, diabetes mellitus, dyslipidemia and patients receiving any drug known to affect endothelial function. Patients with an apnea-hypopnea index (AHI) of at least 5 events per hour were included in the OSA group. Patients with an AHI < 5 were included in the control group. All patients underwent evaluation of clinical profile and daytime sleepiness using the Epworth Sleepiness Scale. Standard in-laboratory overnight PSG was performed as previously described using a computerized recording system (CID 102™, Cidelec, Angers, France) with the following channels: electroencephalogram, electrooculogram, chin electromyogram, arterial oxygen saturation (finger oximetry), nasal-oral airflow (pressure cannula), tracheal sound (suprasternal microphone), electrocardiogram, chest and abdominal wall motion (piezo electrodes), bilateral tibialis electromyogram, and body position. Overnight respiratory recording (CID 102 L™, Cidelec, Angers, France) was performed as previously described with the same channels except for electroencephalogram, electrooculogram, chin electromyogram, and tibialis electromyogram. Respiratory events were scored manually using recommended criteria. Hypopneas had to be associated with $\geq 4\%$ oxygen desaturations. The University of Angers ethics committee approved the study and patients gave their informed consent.

MP isolation and characterization

MP characterization was performed in the morning following sleep recording, at approximately 7:00 or 8:00 AM, before breakfast. Routine laboratory tests including glucose, HbA1c, triglycerides, total cholesterol, HDL cholesterol, LDL cholesterol and blood cell count were also performed on a morning blood sample. For MP isolation, blood samples were drawn and collected in EDTA tubes (Vacutainers, Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) from a peripheral vein using a 21-gauge needle to minimize platelet activation, and were processed for assay within 2 hours. Samples were centrifuged for 20 minutes at 270 *g*, and plasma was then harvested and centrifuged for 20 minutes at 1,500 *g* to obtain platelet-free plasma (PFP). Two hundred μL of PFP were frozen and stored at -80°C until use. As previously described (4, 5), remaining PFP was subjected to two series of centrifugation at 21,000 *g* for 45 minutes in order to eliminate plasma and to pellet MPs for studies, and supernatant was replaced by 0.9 % saline salt solution. Finally MP pellets were suspended in 150 μl of 0.9 % saline salt solution and stored at 4°C until subsequent use.

MP subpopulations were discriminated into PFP according to the expression of membrane-specific antigens by flow cytometry. MPs derived from platelets, lymphocytes and endothelial cells were identified using anti-CD41, anti-CD45 and anti-CD146 antibodies, respectively. Anti-CD62L antibody was used to identify MPs derived from activated L-selectin⁺ leukocytes. Irrelevant human IgG was used as an isotype-matched negative control for each sample. Five μL of PFP were incubated with 5 μL of specific antibody (Beckman Coulter, Villepinte, France), and after 45 minutes of incubation, samples were diluted in 300 μL of 0.9% NaCl. Annexin V-FITC (BioVision Research Products, Mountain View, CA) binding was used to count phosphatidylserine-expressing MPs. To determine the MP concentration, equal volumes of sample and Flowcount beads were then added to calculate the MP concentration and samples were analyzed in a 500 MPL System flow cytometer (Beckman Coulter). Regions corresponding to MPs were identified in forward light scatter and side-

angle light scatter intensity dot plot representation set at logarithmic gain, depending on their diameter (0.1-1 μm). Sample analysis was stopped after counting 10,000 events.

Vascular reactivity

All animal studies were carried out using approved institutional protocols and conformed by the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). Male Swiss mice (8-10 weeks old) were treated by i.v. injection into the tail vein of MPs at the circulating levels detected in the blood of each subject (OSA patients or non-OSA (N-OSA) patients) or 0.9% NaCl saline solution (CTL), as previously performed in other studies (4, 12).

Aortic rings were isolated from mice treated with either MPs from patients or healthy subjects during 24 hours. Mouse aorta was removed and carefully cleaned of adhering fat and connective tissue and then cut into rings with or without endothelium (1.5-2 mm length) that were mounted on a wire myograph filled with PSS as previously described (E7, E8). Concentration-response curves were constructed by cumulative application of serotonin (5-HT, 1 nM-10 μM ; Sigma-Aldrich, St. Quentin, France) to vessels with functional endothelium in the absence or presence of the given inhibitor pre-incubated for 30 minutes: the NO-synthase inhibitor N^G-nitro-L-arginine (L-NA, 100 μM ; Sigma-Aldrich), the selective cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor N-(2-cyclohexyloxy-4-nitrophenyl) methansulfonamide (NS-398, 10 μM ; Sigma-Aldrich), indomethacin, the non selective COX inhibitor (100 μM ; Sigma-Aldrich), SQ-29548 the selective thromboxane A₂ receptor antagonist (5 μM ; Sigma-Aldrich) or L-NA plus indomethacin. All inhibitors were used at maximal active concentrations at which they inhibit the release of either NO from all isoforms of NO synthases, metabolites from COX-2 isoform or metabolites from COX in blood vessels, as reported in many of our previous studies (E6, E9). Higher concentrations of L-NA, NS-398

SQ-29548 or indomethacin did not induce further inhibition. Also, the contractile response to a cumulative concentration-response to the thromboxane A₂ agonist (9,11-dideoxy-11 α ,9 α -epoxymethanoprostaglandin F₂) (U-46619, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) or to the combination of U-46619 (100 nM) and KCl (80 mM) was assessed in mouse aorta. Finally, a concentration-response curve to 5-HT was performed in aorta without functional endothelium. The endothelium was removed by rubbing the intimal surface of rings with a rough needle. Aortas were considered denuded of their endothelium when acetylcholine (1 μ M) failed to produce any relaxation.

NO determination by electron paramagnetic resonance (EPR)

Detection of NO production was performed using a technique with Fe²⁺ diethyldithiocarbamate (DETC, Sigma-Aldrich) as spin trap as previously described (4). Briefly, 24 hours after administration of MPs, animals were sacrificed. Aorta was dissected and incubated for NO production in 250 μ l of Krebs–Hepes buffer solution, then treated with 250 μ l of colloid Fe(DETC)₂ and incubated for 45 minutes at 37°C. NO detection was measured in situ by EPR, and values are expressed as amplitude signal per mg tissue (dry weight).

Western Blotting

Aorta was dissected, homogenized and lysed. Proteins (40 μ g) were separated on NuPAGE® gels (Invitrogen, Carlsbad, CA). Blots were probed with anti-endothelial NOS (eNOS) (BD Biosciences, San Jose, CA), anti-phospho-eNOS Thr 495, anti-phospho-eNOS Ser 1117 (Cell Signaling, Beverly, MA), and anti-COX-1 and 2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) antibodies. A monoclonal mouse β actin antibody (Sigma-Aldrich) was used at 1/1,000 dilution to visualize protein gel loading. The membranes were then washed at least three times in Tris buffer solution containing 0.05% Tween and incubated for 1 hour at room temperature

with the appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody. The protein antibody complexes were detected by ECL plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) according to manufacturer's instructions.

Determination of prostanoid production

After sacrificed of mice pre-treated with MPs, aorta was dissected and treated with 5-HT (1 μ M, 37°C, 30 minutes). After collection of the medium, thromboxane A₂, prostaglandin E metabolites, prostacyclin and total 8-isoprostanes were measured by enzyme immunoassays kits (Cayman Chemicals). The concentration of prostanoids was expressed as pg/ml/mg tissue (dry weight).

Data analysis

Data were analyzed using GrapPad Prism Software (GrapPad Software, San Diego, CA). Data are expressed as mean \pm SEM, and n represents the number of patients. $\text{pD}_2 = -\log \text{EC}_{50}$, EC_{50} being the molar concentration of the agonist that produces 50% of the maximal effect; EC_{50} values were calculated by logit-log regression. For experiment, statistical analyses were performed with nonparametric Mann-Whitney U tests or two-way analysis of variance for repeated measures and subsequent Bonferroni post hoc test. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

RESULTS

Baseline clinical and biological characteristics

Thirty-four patients without any cardiovascular history or risk factor were included in this study. Patients were split into groups of N-OSA (n=17) or OSA (n=17) according to AHI. Excepted for age, the two groups did not differ for weight, body mass index, blood pressure and daytime sleepiness as assessed by the Epworth sleepiness scale (18), lipid metabolism, glucose metabolism and in the smoking rate (Table 1).

Circulating MPs and their cellular origin

As previously described (12), the total number of circulating MPs was not significantly different between N-OSA and OSA patients being $13,125 \pm 2,058$ and $20,957 \pm 3,617$ MPs/ μ L of plasma, respectively. Phenotypical characterization of MPs did not show significant difference between N-OSA and OSA patients (data not shown). However, a positive correlation was found between CD62L⁺ MPs and the AHI (Figure 1).

OSA MPs increase responsiveness of mouse aortic rings to vasoconstrictor agents

Serotonin (5-HT) produced a concentration-dependent increase in tension in mouse aortic rings with functional endothelium in the control group (CTL), as well in those treated with circulating levels of either N-OSA or OSA MPs. Maximal response but not sensitivity to 5-HT was markedly increased in mice treated with OSA MPs (E_{max} : 3.1 ± 0.2 mN/mm) compared to those treated either with vehicle or N-OSA MPs (E_{max} : 2.3 ± 0.2 and 2.2 ± 0.2 mN/mm, respectively) (Figure 2A).

As for 5-HT, aortic rings taken from mice treated with OSA MPs displayed increased maximal contraction in response to the stable analog of thromboxane A₂, U-46619, compared to those from vehicle- and N-OSA MP-treated animals (Figure 2B). Finally, aortas from OSA

MP-treated mice exhibited increased contractile response to the concomitant application of KCl (100 mM) and a single concentration of U-46619 (100 nM), compared to those from vehicle- and N-OSA MP-treated animals (Figure 2C).

Altogether, these data suggest that the OSA MP-induced vascular hyper-reactivity is independent of the agonist or vasoconstrictor used. The OSA MP-induced vascular hyper-reactivity may result from the release of vasoconstrictor products from different cellular origins (for example endothelial cells, smooth muscle cells, or fibroblasts).

Involvement of NO pathway in OSA MPs-induced vascular hyper-reactivity

To investigate the role of NO, the effect of the NO-synthase inhibitor, L-NA, was studied on the response to 5-HT. L-NA alone increased basal tone in aorta from control and N-OSA MP-treated mice but not in those taken from mice treated with OSA MPs. Moreover, L-NA enhanced maximal response to 5-HT in control and N-OSA MP-treated vessels. Surprisingly, in aorta from mice treated with OSA MPs, L-NA did not affect maximal response to 5-HT. Moreover, it induced a rightward shift of the concentration-response curve to the agonist (pD_2 being 5.7 ± 0.2 , 5.5 ± 0.3 and 4.7 ± 0.2 for CTL, N-OSA or OSA, respectively) (Figure 3A-D). Thus, L-NA rather inhibited than potentiated the response to 5-HT in aorta from mice treated with OSA MPs (Figure 3D). NO production in the aorta taken from OSA MP-treated mice was greatly lower compared to that measured in vessels from vehicle- or N-OSA MP-treated mice (Figure 4A). To identify the molecular mechanism implicated in the decrease in NO production, we analyzed by Western Blotting the level of expression and phosphorylations of aortic eNOS. As shown in Figure 4B, eNOS expression was not significantly modified by MP treatment although a trend toward an increase in eNOS expression was observed after treatment with MPs. However, treatment by OSA MPs, but not N-OSA MPs, induced a significant decrease of eNOS phosphorylation on the activator site

(Ser 1177) and on the inhibitor site (Thr 495) (Figure 4C-D). After normalization of the amount of phosphorylated eNOS to total amount of enzyme, the ratio of phosphorylated eNOS at the inhibitor and activation sites was calculated. Interestingly, the ratio of phosphorylation was greater in aortas from OSA MPs treated mice compared to those treated with N-OSA MPs or untreated (Figure 4E). These results indicate a down-regulation of eNOS activity caused by OSA MPs.

Involvement of COX metabolites in OSA MP-induced vascular hyper-reactivity

To investigate the role of COX metabolites in 5-HT-induced vascular reactivity, the effects of both a non-selective inhibitor of COX (indomethacin) and a selective inhibitor of COX-2 (NS398) were examined. In the presence of indomethacin, contractile response to 5-HT was reduced in aortas from all groups of mice, the decrease was even greater in OSA group (60%) compared to N-OSA or vehicle groups (47 and 48%, respectively) (Table 2). When COX-2 was specifically silenced using NS398, the response to 5HT was impaired in vessels from control, N-OSA MPs and OSA MPs, with a stronger inhibition for aorta treated by OSA MPs (Table 2). These results suggest that OSA MPs treatment leads to an increase of the release of vasoconstrictor metabolites derived from COX including COX-2.

OSA MPs were able to enhance the expression level of COX-1 and COX-2 compared to N-OSA MPs or vehicle (Figure 5A-B). To test the hypothesis that COX activity could be affected by this treatment, we measured the production of different COX metabolites. Interestingly, aortas treated with OSA-MPs displayed increased thromboxane A₂ and prostacyclin productions compared to N-OSA MPs or untreated aortas. By contrast, release either of prostaglandin E₂ or 8-isoprostane was not significantly different between the three groups (Figure 5C-F). The hyper-reactivity observed might be due to the increase of thromboxane A₂ production. To test this hypothesis, we performed a concentration-response

curve to 5-HT in presence of SQ-29548 the selective thromboxane A₂ receptor antagonist. Interestingly, SQ-29548 significantly reduced response to 5-HT in vessels from vehicle and N-OSA MP-treated mice but not in those taken from animals injected with OSA MPs (Figure 6A-C). These results suggest that SQ-29548-sensitive pathway is involved in the response to 5-HT in vessels from vehicle and N-OSA MPs. In contrast in those from OSA MPs-treated mice, SQ-29548 sensitive pathway might not be implicated in the response or alternatively, vasodilator metabolites might mask the effect of thromboxane A₂.

Interaction of NO and COX pathway

In order to study the eventual interaction between NO and COX pathway, we used in combination inhibitors, L-NA and indomethacin. On one hand blockade of the two pathways enhanced response to in aorta from control or N-OSA MP-treated mice. On the other hand, the presence of the two blockers induced a rightward shift of the response to 5-HT in vessels from mice treated with OSA MPs (Figure 7).

Role of the endothelium

In vessels without functional endothelium, contraction to 5-HT was significantly reduced in vessels taken from mice treated with OSA MPs compared to those taken either from control or N-OSA MP-treated mice (Figure 8). These results strongly suggest the obligatory role of the endothelium in the hyper-reactivity of the aorta to 5-HT after treatment of mice with OSA MPs.

DISCUSSION

In the present study, we showed that *i.v.* injection of OSA MPs into mice promotes vascular hyper-reactivity in response to vasoconstrictor agents with the obligatory role of the endothelium. This effect was associated with the ability of OSA MPs to reduce the activity of endothelial NO-synthase concomitant with a decrease in NO production. In addition, OSA MPs increased aortic COX-1 and COX-2 expressions associated with enhanced production of thromboxane A2 and prostacyclin and indomethacin or the selective COX-2 inhibitor, NS398, reduced hyper-reactivity in response to 5-HT. SQ-29548-sensitive pathway might not be implicated in vascular hyper-reactivity of OSA MPs or alternatively, vasodilator metabolites, including prostacyclin, might mask the effect of thromboxane A2. These data provide evidence of the pathophysiological relevance of MPs as vectors of trans-cellular exchange of messages in promoting both endothelial (12) and vascular hyper-reactivity (the present study) in patients with OSA.

Several cardiovascular pathologies are associated with vascular dysfunction including attenuation of endothelium-dependent vasodilatation and/or alteration of vascular smooth muscle cells responsiveness to vasoconstrictor stimuli. It is well accepted that MPs contribute, at least in part, to the alteration of vascular function in several cardiovascular diseases (6, 7). Evidence of the pathophysiological relevance of MPs in OSA was recently provided *in vitro* and *ex vivo*, by their ability to impair endothelium-dependent relaxation in response to acetylcholine and the endothelial response to flow when injected *i.v.* into mice (12). In line with our previous study (12), circulating level of MPs was not different between OSA and non OSA patients but levels of CD62L⁺ MPs were positively correlated with the severity of sleep disordered breathing.

In the present study, we provide further evidence that OSA MPs promote vascular hyper-reactivity in response to vasoconstrictor agents in mouse aorta. These findings are in line with our previous studies where MPs from septic shock patients enhance but not reduce, contraction in response to 5-HT (4). Septic MPs may rather be protective in counteracting the drop in peripheral resistance and progressive hypotension during severe sepsis and explain the fact that increased levels of MPs may predict a more favorable outcome in severe sepsis in terms of mortality rate and organ dysfunction (19). In contrast to septic shock patients, increased vascular reactivity in OSA patients are deleterious and they are probably involved in vascular remodeling leading to exacerbate vasoconstriction reported in this disease. Indeed, exaggerated vasoconstriction occurs in forearms of OSA patients in response to angiotensin II (14). In a rat model of intermittent hypoxia, enhanced responses to endothelin-1 has also been reported in several vascular beds (20, 21). Furthermore, an increased contraction to norepinephrine in mouse hindquarters has also been observed (22). In contrast, contractile responses to potassium, endothelin-1, 5-HT and thromboxane A2 mimetic were not affected in rat aorta after 35 days of intermittent hypoxia (21). Nevertheless, we provide evidence in the present study that MPs from OSA induced vascular hyper-reactivity independently of the vasoconstrictor used under the experimental conditions used and therefore participate in the regulation of vascular tone in this syndrome.

It has to be noted that OSA MPs induced vascular hyper-reactivity in the presence of functional endothelium only suggesting the obligatory role of this tunica. In contrast, OSA MPs rather elicited vascular hypo-reactivity in the absence of functional endothelium suggesting that they can also act directly on smooth muscle cells. The pathways involved in this vascular hypo-reactivity were not assessed since, *in vivo*, MPs interact with intact blood vessels in which the endothelium is present. Thus, the mechanisms associated with the increase in vascular reactivity to vasoconstrictor agents in response to OSA MPs were further

studied in terms of an alteration of the balance between the nature and the effects of endothelial factors on smooth muscle cells including NO and COX metabolites.

We previously reported decreased endothelial-NO production in response with OSA MPs (12). These data corroborate studies showing a decreased plasma concentration of NO metabolites in OSA, which is correlated with OSA severity (23). In our previous work (12), the mechanism by which MPs from OSA patients reduce NO production from endothelial cells has been explained by a negative regulation of eNOS via both an increase of its phosphorylation on the inhibitory site and up-regulation of caveolin-1. In conjunction with these results, we recently reported that MPs from metabolic syndrome patients reduce endothelial-NO release by a negative regulation of eNOS activity in the EA hy926 cell line. In the present study, we reinforce this hypothesis inasmuch *in vivo* injection of mice with OSA MPs decreased NO production in the aorta by a mechanism associated with reduced eNOS activity without alteration of its expression. Moreover, blockade of NO pathway with L-NA alone increased basal tone in aorta from control and N-OSA MP-treated mice but not in those taken from mice treated with OSA MPs suggesting that OSA MPs reduced basal NO production. In line with these data, decrease of basal level of NO has been reported in a rat model of intermittent hypoxia (24). Furthermore, L-NA enhanced maximal response to 5-HT in control and N-OSA MP-treated vessels. Surprisingly, in aorta from mice treated with OSA MPs, L-NA did not affect maximal response to 5-HT. It rather induced a rightward shift of the concentration-response curve to the agonist. Altogether, these data demonstrate that decreased endothelial-NO participate in vascular hyper-reactivity elicited by OSA MPs. It is unlikely that increased oxidative stress described as one of the possible mechanisms explaining reduced endothelial-NO in OSA inasmuch an absence of a link between reactive oxygen species and endothelial dysfunction by MPs from OSA patients has been observed in these

patients (12). Finally, the present study pointed out that blockade of NO pathway unmasks the existence of vasoconstrictor factor(s) released upon OSA MPs treatment.

Turning now to the participation of COX pathway in the increased vascular tone induced by OSA MPs, the contraction in response to 5-HT involved the participation of COX vasoconstrictor metabolites including those from COX-2 inhibitor-sensitive pathway in aorta independently of the treatment (vehicle, N-OSA or OSA MPs). Interestingly, blockade either of the non selective COX inhibitor, indomethacin, or the COX-2 inhibitor, resulted a greater reduction of 5-HT response in vessels from mice treated with OSA MPs suggesting that COX metabolites participates, in part, in the increased response. Indeed, both COX-1 and COX-2 expressions were increased in aorta taken from OSA MP-treated mice. With regard to COX-2 and in line with these results, up-regulation of this enzyme has been reported in endothelial cells treated with MPs from OSA (12) and in venous endothelial cells harvested from patients with untreated OSA (25). The nature of COX metabolites involved was further investigated and it was found that OSA MPs increased thromboxane A₂ and prostacyclin, without any variation of 8-isoprostane or prostaglandin E₂. Concerning thromboxane A₂, blockade of TP receptor by SQ-29548 significantly reduced response to 5-HT in vessels from vehicle and N-OSA MP-treated mice but not in those taken from animals injected with OSA MPs. These results suggest that SQ-29548-sensitive pathway is involved in the response to 5-HT in vessels from vehicle and N-OSA MPs. In contrast in those from OSA MP-treated mice, SQ-29548-sensitive pathway might not be implicated in the response or alternatively, vasodilator metabolites, probably prostacyclin, might mask the effect of thromboxane A₂. These results also indicate the implication of another vasoconstrictor factor, different to COX metabolites, that participate to the vascular hyper-reactivity induced by OSA MPs. Indeed, concomitant blockade of NO and COX pathways induced a rightward shift of the response to 5-HT in OSA MP- treated aorta. The nature of this vasoconstrictor factor remains to be identified.

In conclusion, we provide evidence that OSA MPs induce *in vivo* vascular hyper-reactivity to vasoconstrictor agents in aorta with the obligatory role of the endothelium. This effect is associated with a combination of a reduced endothelial NO synthase activity and NO production and a subtle interaction with COX pathway and metabolites. The critical role of MPs as a vector of biological messages leading to vascular dysfunction in OSA is therefore underlined.

These effects of OSA MPs, in addition to their capacity in reducing endothelial vasodilatation and increasing endothelial inflammation, strengthen the notion that MPs can be, not only considered as surrogate markers of endothelial dysfunction or injury, but also as effectors able to amplify pre-existing vascular dysfunctions, including vascular hyper-reactivity in this syndrome.

REFERENCES

1. Bradley TD, Floras JS. Obstructive sleep apnoea and its cardiovascular consequences. *Lancet* 2009;373:82-93.
2. Shamsuzzaman AS, Gersh BJ, Somers VK. Obstructive sleep apnea: implications for cardiac and vascular disease. *Jama* 2003;290:1906-1914.
3. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation* 2001;104:2649-2652.
4. Mostefai HA, Meziani F, Mastronardi ML, Agouni A, Heymes C, Sargentini C, Asfar P, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Circulating microparticles from patients with septic shock exert protective role in vascular function. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:1148-1155.
5. Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Ducluzeau PH, Mostefai HA, Draunet-Busson C, Leftheriotis G, Heymes C, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Endothelial dysfunction caused by circulating microparticles from patients with metabolic syndrome. *Am J Pathol* 2008;173:1210-1219.
6. Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Microvesicles: intercellular vectors of biological messages. *Mol Inter* 2011;11:88-94.
7. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci*. (In press).
8. Yun CH, Jung KH, Chu K, Kim SH, Ji KH, Park HK, Kim HC, Lee ST, Lee SK, Roh JK. Increased circulating endothelial microparticles and carotid atherosclerosis in obstructive sleep apnea. *J Clin Neurol* 2010;6:89-98

9. Geiser T, Buck F, Meyer BJ, Bassetti C, Haerberli A, Gugger M. In vivo platelet activation is increased during sleep in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Respiration* 2002;69:229-234.
10. Ayers L, Ferry B, Craig S, Nicoll D, Stradling JR, Kohler M. Circulating cell-derived microparticles in patients with minimally symptomatic obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2009;33:574-580.
11. Jelic S, Lederer DJ, Adams T, Padeletti M, Colombo PC, Factor P, LeJemtel TH. Endothelial repair capacity and apoptosis are inversely related in obstructive sleep apnea. *Vasc Health Risk Manag* 2009;5:909-920.
12. Priou P, Gagnadoux F, Tesse A, Mastronardi ML, Agouni A, Meslier N, Racineux JL, Martinez MC, Trzepizur W, Andriantsitohaina R. Endothelial Dysfunction and Circulating Microparticles from Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Am J Pathol* 2010;177:974-983.
13. Trzepizur W, Priou P, Paris A, Nardi J, Tual-Chalot S, Meslier N, Urban T, Andriantsitohaina R, Martinez MC, Gagnadoux F. Nocturnal release of leukocyte-derived microparticles in males with obstructive sleep apnoea. *Eur Respir J* 2011;37:1293-1295.
14. Kraiczi H, Hedner J, Peker Y, Carlson J. Increased vasoconstrictor sensitivity in obstructive sleep apnea. *J Appl Physiol* 2000;89:493-498.
15. Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, Savineau JP, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;182:261-268.
16. Agouni A, Mostefai HA, Porro C, Carusio N, Favre J, Richard V, Henrion D, Martinez MC, Andriantsitohaina R. Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release. *Faseb J* 2007;21:2735-2741.
17. Mostefai HA, Agouni A, Carusio N, Mastronardi ML, Heymes C, Henrion D, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Phosphatidylinositol 3-kinase and xanthine oxidase

regulate nitric oxide and reactive oxygen species productions by apoptotic lymphocyte microparticles in endothelial cells. *J Immunol* 2008;180:5028-5035.

18. Johns MW. A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale. *Sleep* 1991;14:540-545.

19. Soriano AO, Wenche J, Chirinos JA, Valdivia MA, Velasquez HS, Jimenez JJ, Horstman LL, Kett DH, Schein RM, Ahn YS. Levels of endothelial and platelet microparticles and their interactions with leukocytes negatively correlate with organ dysfunction and predict mortality in severe sepsis. *Crit Care Med* 2005;33:2540–2546.

20. Allahdadi KJ, Walker BR, Kanagy NL. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertension* 2005;45:705-709.

21. Lefevre B, Godin-Ribuot D, Joyeux-Faure M, Caron F, Bessard G, Lévy P, Stanke-Labesque F. Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat. *Respir Physiol Neurobiol* 2006;150:278-286.

22. Dematteis M, Julien C, Guillermet C, Sturm N, Lantuejoul S, Mallaret M, Lévy P, Gozal E. Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:227-235.

23. Noda A, Nakata S, Koike Y, Miyata S, Kitaichi K, Nishizawa T, Nagata K, Yasuma F, Murohara T, Yokota M. Continuous positive airway pressure improves daytime baroreflex sensitivity and nitric oxide production in patients with moderate to severe obstructive sleep apnea syndrome. *Hypertens Res* 2007;30:669-676.

24. Tahawi Z, Orolinova N, Joshua IG, Bader M, Fletcher EC. Altered vascular reactivity in arterioles of chronic intermittent hypoxic rats. *J Appl Physiol* 2001;90:2007-2013.

25. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, Colombo PC, Basner RC, Factor P, LeJemtel TH. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation* 2008;117:2270-2278.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Positive correlation between CD62L⁺ MPs and the severity of OSA. Correlation between CD62L⁺ MP levels and apnea-hypopnea index (AHI).

Figure 2: OSA MPs increase responsiveness of mouse aortic rings to vasoconstrictors agents. Concentration-responses curves to 5-HT (A, n=8) and to U-46619 (B, n=5) in mouse aortic rings from vehicle- (CTL), N-OSA MP- or OSA MP-treated mice. Contractile response to the concomitant application of KCl (80 mM) and a single concentration of U-46619 (1 μM) (C, n=6) in aortic rings from mice treated with either vehicle, N-OSA MPs or OSA MPs. **P*<0.05, ***P*<0.01 and ****P*<0.001.

Figure 3: Involvement of NO pathway in OSA MP-induced vascular hyper-reactivity. Concentration-responses curves to 5-HT in mouse aortic rings from vehicle- (CTL, A, n=5), N-OSA MP- (B, n=5) or OSA MP-treated mice (C, n=5) with or without the presence of NO-synthase inhibitor (L-NA, 100 μM). Concentration-responses curves to 5-HT of aortic rings from mice treated with either vehicle (CTL), N-OSA- or OSA- MPs in the presence of L-NA (D, n=5). ****P*<0.001.

Figure 4: Down-regulation of eNOS activity by OSA MPs. Quantification of the amplitude of NO-Fe(DETC)₂ signal in aorta from mice treated with either vehicle (CTL), N-OSA MPs or OSA MPs (A). Values are expressed as amplitude/mg weight of dried aorta (n=6). Western blots using antibodies raised against eNOS (B), phospho-eNOS Ser 1177 (C), or phospho-eNOS Thr 495 (D). Immunoblots were quantified by densitometric analysis. Data are representative of five separate blots, and the densitometry values are expressed in arbitrary units (A.U.) as mean ± SEM. The ratio of phosphorylation of eNOS at the inhibitory site (Thr

495) and activation site (Ser 1177) (E) is expressed in arbitrary units (A.U.) as mean \pm SEM. * P <0.05 and ** P <0.01.

Figure 5: OSA MPs and COX pathways. Western blots revealing expression of COX-1 (A) and COX-2 (B) in aorta from mice treated with either vehicle (CTL), N-OSA MPs or OSA MPs. Data are representative of six separate blots. Concentration of COX derivatives thromboxane A₂ (C), 8-isoprostane (D), prostacyclin (E), and prostaglandin E₂ (F) in the supernatants of mouse aortas pretreated with either vehicle (CTL), N-OSA MPs or OSA MPs, and stimulates with 5-HT (n=5). * P <0.05 and ** P <0.01.

Figure 6: Effect of thromboxane A₂ antagonist on the increase of OSA MP-induced contraction. Concentration-responses curves to 5-HT in mouse aortic rings from vehicle- (CTL, A, n=5), N-OSA MP- (B, n=5) or OSA MP-treated mice (C, n=5) in the absence or the presence of thromboxane A₂ antagonist (SQ-29548, 5 μ M). * P <0.05.

Figure 7: Interaction between NO and COX pathways. Concentration-responses curves to 5-HT in mouse aortic rings from vehicle- (CTL, A, n=5), N-OSA MP- (B, n=5) or OSA MP-treated mice (C, n=5) in the absence or the presence of L-NA plus indomethacin. Concentration-responses curves to 5-HT of aortic rings from mice treated with either vehicle (CTL), N-OSA MP- or OSA- MPs in the presence of L-NA plus indomethacin (D, n=5).*** P <0.001.

Figure 8: Role of the endothelium in the increased responsiveness to 5-HT induced by OSA MPs. Concentration-responses curves to 5-HT without functional endothelium (n=5) in mouse aortic rings from vehicle (CTL)-, N-OSA MP- or OSA MP-treated mice. * P <0.05 and ** P <0.01.

Table 1: Characterization of study population.

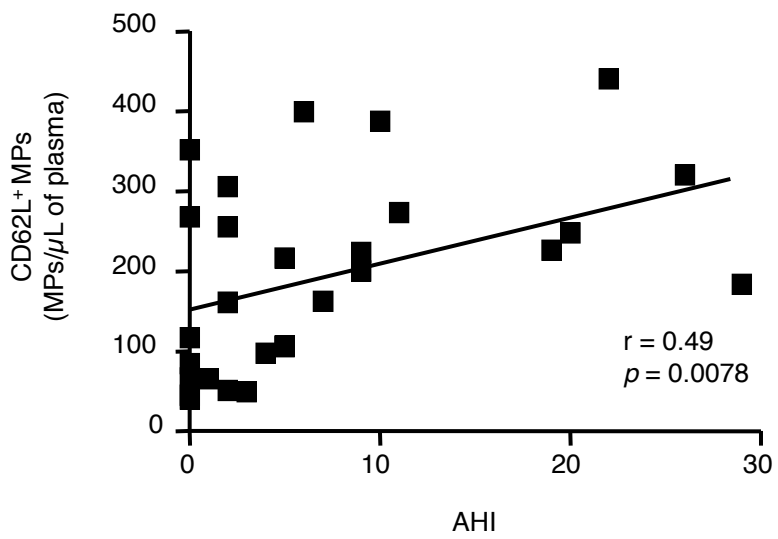
	N-OSA	OSA	p value
n	17	17	
Age, years	41.7±3	53.8±2	0.0143
Body mass index, kg/m ²	25.8±1	26.7±0.5	NS
Weight, kg	82.8±4	82±2	NS
Systolic BP, mmHg	124.1±4.1	137.7±4.9	NS
Diastolic BP, mmHg	72.9±2	80±3.1	NS
Smokers, n	5	2	NS
Plasma glucose, mmol/L	5.3±0.2	5.8±0.3	NS
HemoglobinA1c (%)	5.7±0.1	5.8±0.1	NS
Total cholesterol, mmol/dL	5.5±0.3	5.7±0.2	NS
Triglycerides, g/L	1.3±0.1	1.5±0.2	NS
HDL cholesterol, g/dL	1.3±0.1	1.4±0.1	NS
LDL cholesterol, g/dL	3.7±0.3	3.7±0.2	NS
Epworth sleepiness scale	9.3±1.5	9.9±1	NS
Apnea-hypopnea index, n/h	1.3±0.3	19±3.8	<0.0001
Mean SaO ₂ , %	93.7±0.4	93±0.4	NS
4% ODI, n/h	1.5±0.5	13.3±2.5	<0.0001

All values expressed as mean ± SEM. BP: blood pressure, HDL: high-density lipoproteins, LDL: low-density lipoproteins, SaO₂: oxyhemoglobin saturation, ODI: oxygen desaturation index.

Table 2: pD₂ values and maximal contractions (E_{max}) of serotonin obtained in aorta from mice treated with either vehicle (CTL), N-OSA MPs or OSA MPs in the absence or in the presence of COX inhibitor (indomethacin, 10 μM) or in the presence of COX-2 inhibitor (NS-398, 1μM).

		pD ₂	E _{max} (mN/mm)
CTL	Without inhibitors	5.4 ± 0.2	2.3 ± 0.2
	With indomethacin	6.3 ± 0.2*	1.1 ± 0.1*
	With NS398	5.8 ± 0.2	1.3 ± 0.1*
N-OSA	Without inhibitors	5.8 ± 0.2	2.1 ± 0.2
	With indomethacin	5.9 ± 0.2	1.1 ± 0.1***
	With NS398	5.5 ± 0.2	1.1 ± 0.1**
OSA	Without inhibitors	6.1 ± 0.1	3.1 ± 0.2
	With indomethacin	5.6 ± 0.3	1.3 ± 0.2***
	With NS398	5.1 ± 0.2	2.2 ± 0.4**

*P < 0.05, ***P < 0.001 vs without inhibitors.



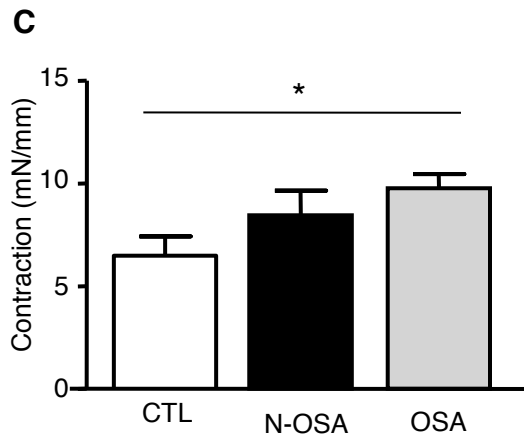
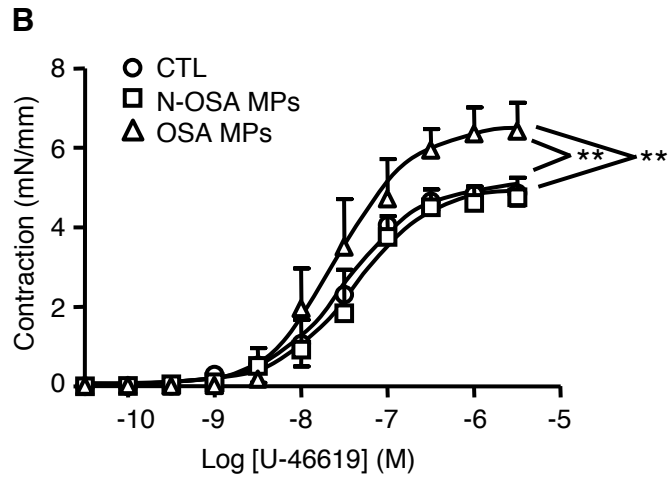
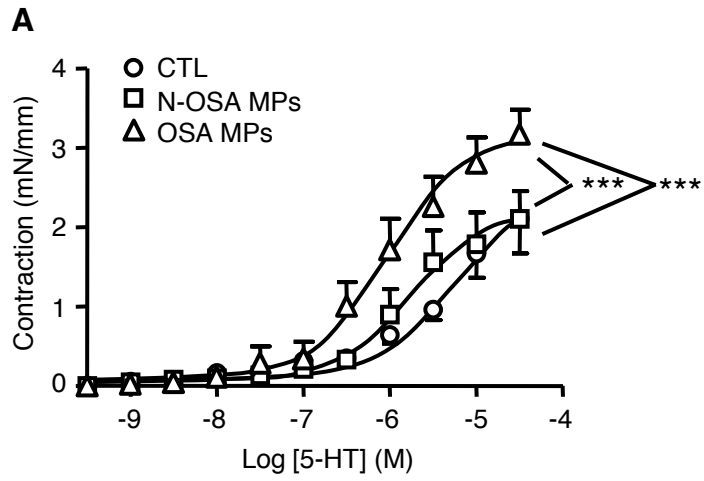


Figure 2

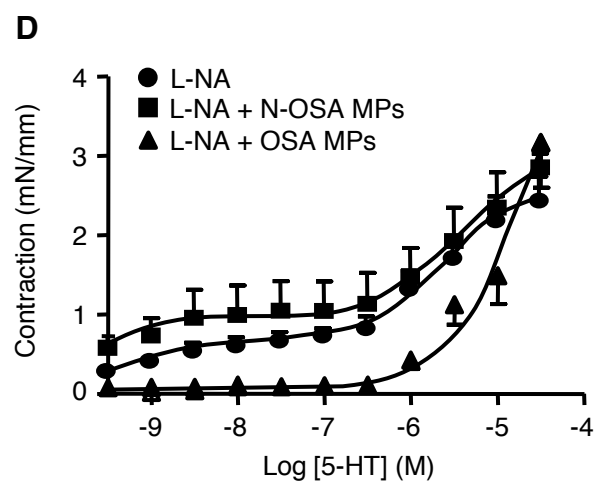
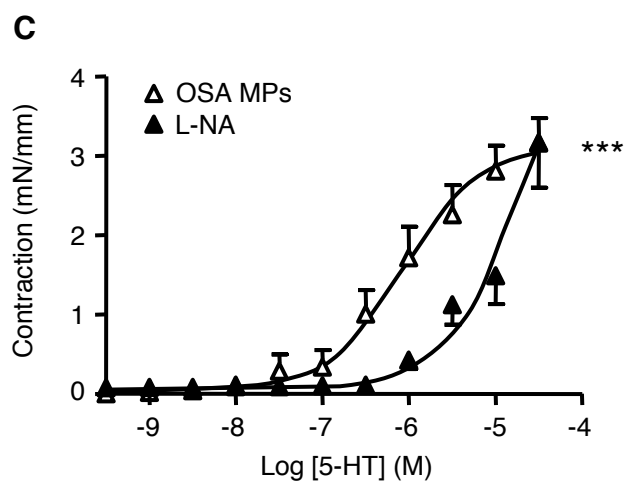
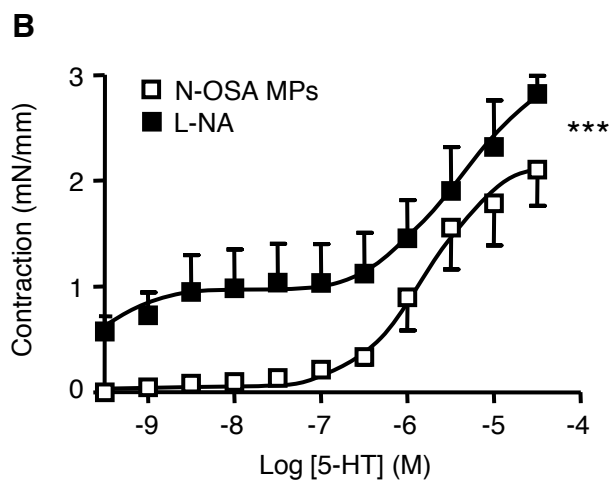
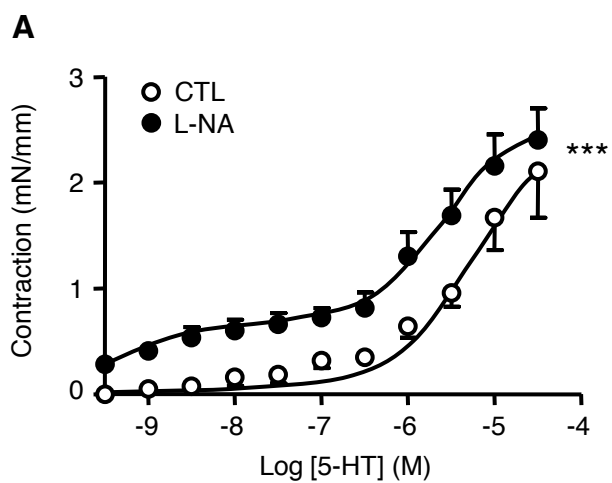


Figure 3

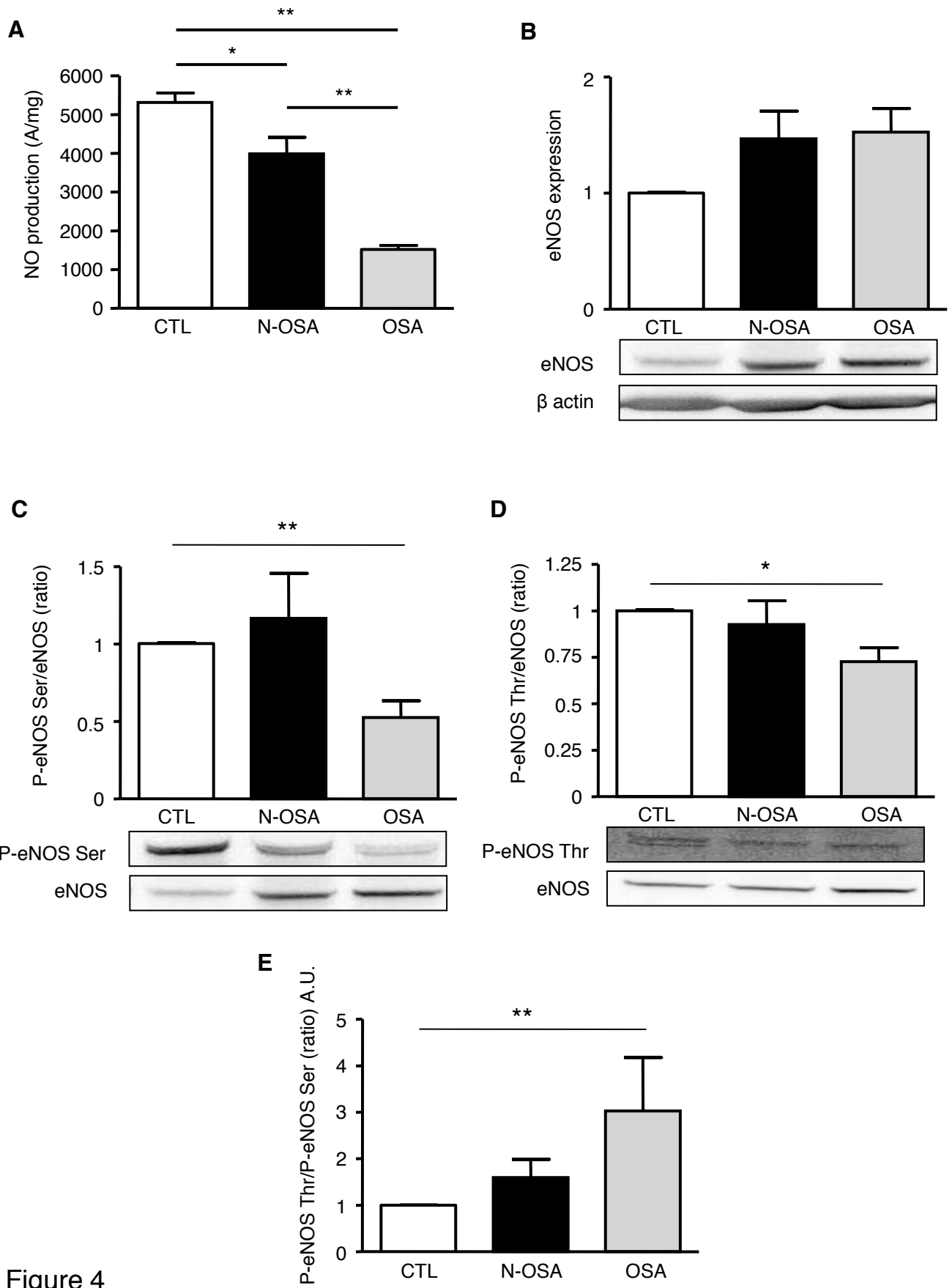


Figure 4

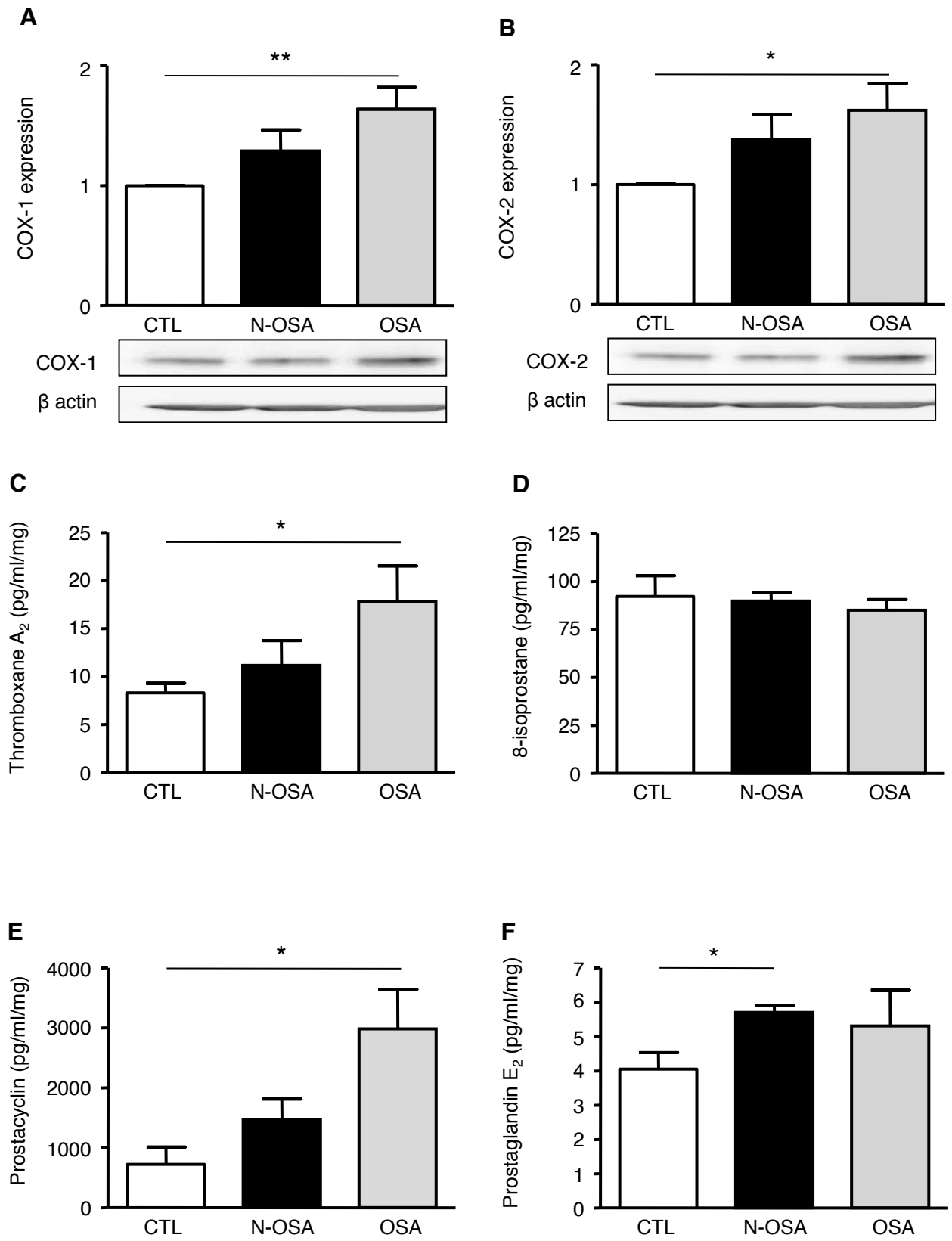


Figure 5

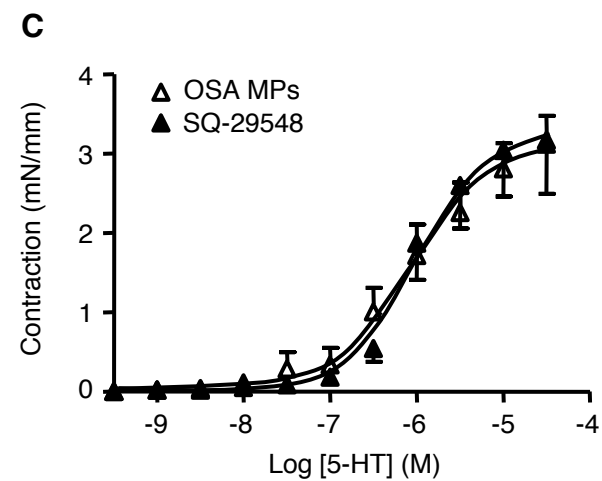
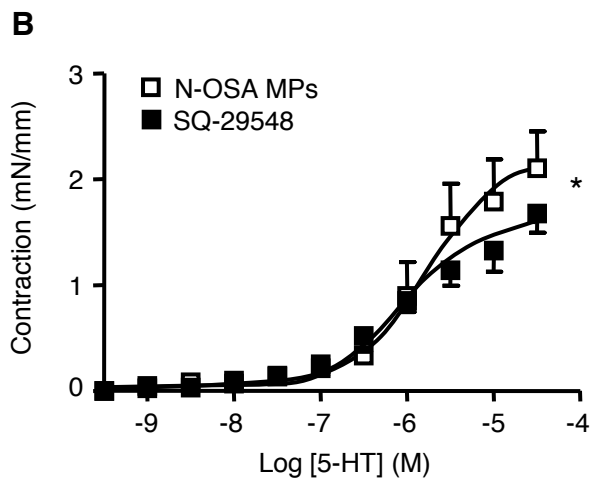
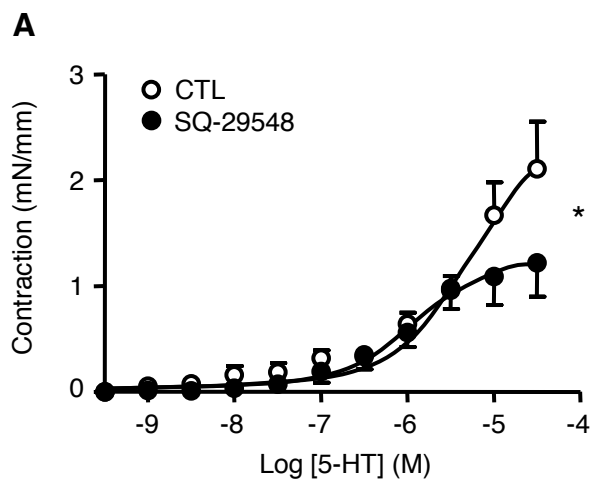


Figure 6

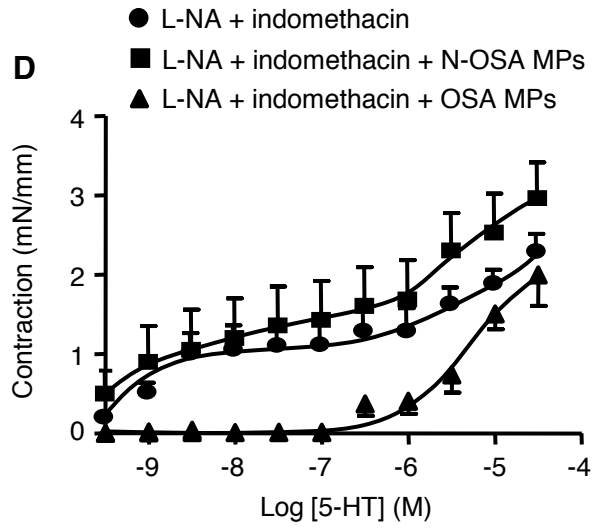
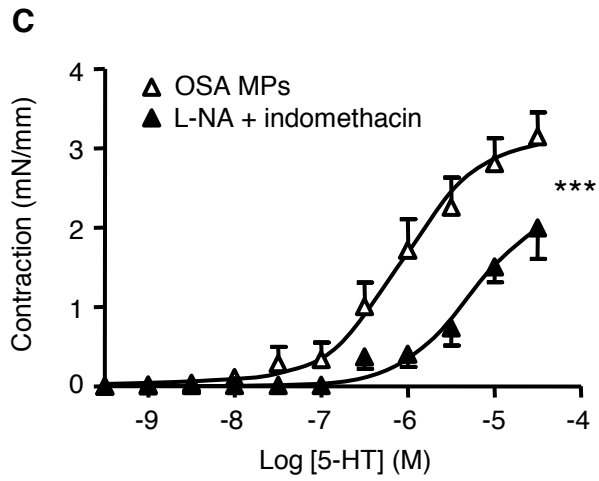
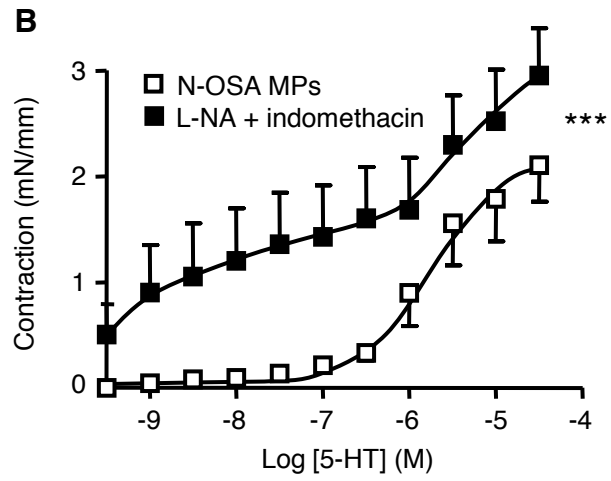
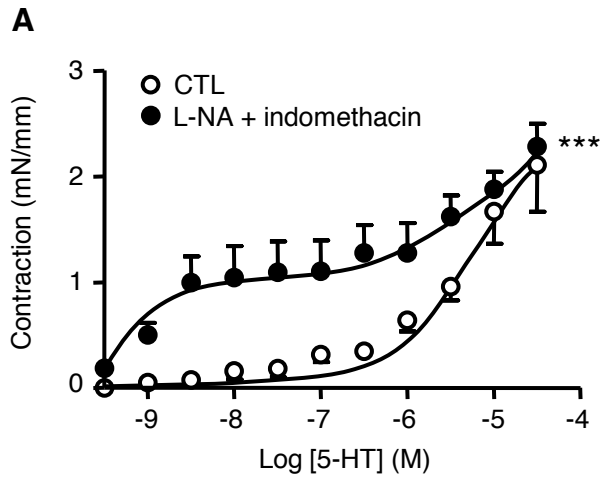


Figure 7

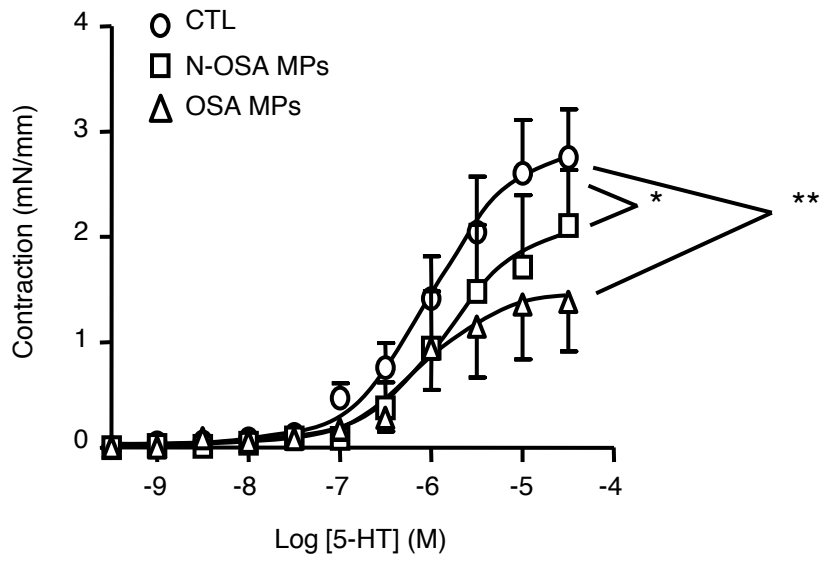


Figure 8

Résumé

Les maladies cardio-vasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le système circulatoire. Cependant, la complexité de l'étiologie de ces pathologies et l'implication de nombreux facteurs rendent leur compréhension délicate. Parmi ces facteurs, les microparticules (MPs) sont des microvésicules membranaires libérées par des cellules activées ou apoptotiques, détectables dans le sang en dehors de toutes situations pathologiques, mais dont l'altération du taux et du phénotype semblent très souvent corrélés à la sévérité d'une pathologie. De nombreuses publications ont également permis de mettre en évidence la participation des MPs en tant que vecteur dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires. Cette thèse a consisté à étudier l'influence des MPs dans deux pathologies cardio-vasculaires, l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) et le syndrome d'apnées obstructive du sommeil (SAOS), présentant l'hypoxie comme caractéristique commune. Nous avons ainsi établi une altération du taux circulants et de certaines populations de MPs ainsi qu'une participation de ces MPs à la dysfonction vasculaire observée dans l'HTAP et le SAOS. Ce travail participe ainsi à la compréhension du rôle des MPs dans les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces pathologies.

Mots clés : Microparticules; Fonction vasculaire; Hypertension artérielle pulmonaire; Syndrome d'apnées obstructive du sommeil.

Abstract

Cardiovascular diseases are a group of disorders of the circulatory system. However, the complexity of the etiology of these diseases and the involvement of many factors make understanding difficult. Among these factors, the microparticles (MPs) are membrane vesicles released from activated or apoptotic cells, detectable in the blood, even in healthy subjects, but the alteration of the level and phenotype is very often correlated with the severity of the pathology. Many works have also contributed to highlight the participation of MPs as vectors in the regulation of many cellular functions. This thesis studied the influence of MPs in two cardiovascular diseases, pulmonary arterial hypertension (PAH) and obstructive sleep apnea syndrome (OSA), with hypoxia as a common feature. We have established an alteration of circulating levels and some populations of MPs as well as a participation of MPs in the vascular dysfunction which occurred in PAH and OSA. This work contributes to understanding the role of MPs in the pathophysiological mechanisms involved in these pathologies.

Keywords : Microparticles; Vascular function; Pulmonary artery hypertension; Obstructive sleep apnea syndrome.