



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III – Paul Sabatier

Discipline ou spécialité : *Physiopathologie : des approches expérimentales aux nouvelles thérapeutiques*

Présentée et soutenue par *Anne FOUGERAT*

Le 29 septembre 2010

**ROLE DE LA PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE γ DANS LA PAROI ARTERIELLE :
UNE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE ET
DE SES COMPLICATIONS ?**

JURY

Pr Bertrand PERRET
Dr Philippe LESNIK
Pr Gilles FAURY
Pr Laurent MARTINY
Dr Muriel LAFFARGUE
Dr Monique BRETON-DOUILLON

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invité

Ecole doctorale : Biologie - Santé - Biotechnologies

Unité de recherche : *INSERM U563, CPTP*

Directeur(s) de Thèse : *Dr Muriel LAFFARGUE*

A ma maman,

A Alex,

A mon papa...

REMERCIEMENTS

Ah les remerciements... J'ai bien dû y penser une centaine de fois durant ma thèse. J'avais hâte d'en arriver à ce moment-là et d'écrire les mots justes pour chacun d'entre vous. Et bien finalement, c'est une tâche bien plus difficile à réaliser qu'on ne le croit, aucun article pour s'appuyer, seulement moi et le souvenir de ces quatre années de thèse...

Je souhaite tout d'abord remercier les membres de mon jury de thèse.

Monsieur le Professeur **Gilles Faury** pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. Je vous remercie pour votre implication malgré nos sujets éloignés, vos commentaires utiles et pertinents sur mon travail de thèse ainsi que pour la discussion intéressante lors de la soutenance. Je vous remercie également pour votre gentillesse et les échanges que nous avons eus après la soutenance.

Monsieur le Docteur **Philippe Lesnik** pour m'avoir également fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail. Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté malgré votre emploi du temps bien chargé cette semaine-là. Je vous remercie également d'avoir en grande partie permis une discussion très enrichissante au cours de la soutenance, pour vos commentaires ainsi que pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Monsieur le Professeur **Laurent Martiny** pour m'avoir fait l'honneur d'assister à ma soutenance de thèse. Je vous remercie également pour les questions et la discussion intéressantes. J'en profite pour vous remercier de m'avoir hébergé dans votre laboratoire, de votre confiance, de votre gentillesse et de votre accueil chaleureux. Ces quelques mois dans le grand nord ont été enrichissants à tout point de vue ! Enfin, un grand merci pour la cargaison de champagne qui a été appréciée comme il se doit après la soutenance.

Monsieur le Professeur **Bertrand Perret** pour avoir une fois de plus présider un jury de thèse, pour vos remarques et commentaires très utiles lors de la préparation de la soutenance ainsi que pour vos questions toujours pertinentes. Je vous remercie également de m'avoir accueillie dans le département LML et le bâtiment C pendant toutes ces années, pour l'intérêt que vous avez porté à mes travaux et pour vos encouragements.

Madame le Docteur **Monique Breton-Douillon**, ma première directrice de thèse. Je te remercie d'avoir été présente à ma soutenance de thèse. Je te remercie également de m'avoir fait confiance dès mes débuts dans la recherche, de ta gentillesse, de ton soutien et de ta disponibilité. Je te suis reconnaissante pour ton honnêteté, tu m'avais dit de bien réfléchir avant de commencer la longue aventure de la thèse, je t'ai écouté et je pense aussi que j'ai fait le bon choix. Nous avons longtemps partagé le même bureau et je reste nostalgique de ces années et de toutes nos discussions scientifiques...ou pas du tout. Mais la retraite te va si bien, je ne peux qu'être contente pour toi. Je t'admire pour tout ce que tu réalises pour tes petits bambins du Burkina et je suis très fière de t'avoir connue.

Madame le Docteur **Muriel Laffargue**, ma directrice de thèse. Mais bien plus en réalité. Merci tout d'abord pour toutes tes qualités personnelles qui ont fait que ce soit un réel plaisir de venir au labo tous les matins, pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton enthousiasme. Je te remercie également pour ta confiance, ton soutien tout au long de cette thèse et de m'avoir toujours impliquée dans les différents projets. Merci aussi de cette qualité rare pour un chef de faire des critiques constructives tout en sachant dire de temps en temps que nous faisons du bon travail. J'ai vraiment eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi toutes ces années et je pense que tu m'as beaucoup apporté. On m'avait dit que la fin de la thèse se finit souvent mal avec son directeur, cela n'a pas été notre cas et je crois que nous pouvons en être fières ! Je te souhaite le meilleur pour la nouvelle équipe que tu vas codiriger, pour tous tes futurs projets et bien sûr dans ta vie personnelle avec ta petite famille. Merci enfin pour ces mots gentils que tu as eu à mon égard lors de la soutenance et qui m'ont beaucoup touchée.

Même si la soutenance de thèse est une journée pleine d'émotion qui restera un inoubliable souvenir, la thèse c'est bien plus que cela et avant d'en arriver là il se passe beaucoup de choses. C'est avant tout une merveilleuse aventure humaine qui m'a permis de rencontrer de nombreuses personnalités. Je vous embarque avec moi pour découvrir les habitants du bâtiment C !

Je commence par le premier étage, un peu mon deuxième chez-moi ! Un grand merci tout d'abord à **Nicole**. Je me souviens encore de mes premiers jours de DESUPS, je suis ravie d'avoir fait mes premières manip avec toi, tu as été un coach parfait et tu as même réussi à me faire aimer la bio mol ! Ce travail est aussi un peu le tien. J'ai vraiment eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi et apprécié toutes nos discussions moins scientifiques. Je te remercie pour ta douceur, ta gentillesse, ton écoute et tous ces bons moments ; j'espère qu'il y en aura d'autres. Je te souhaite le meilleur pour la suite. Je ne peux parler de mes débuts sans penser à ma petite **Stef**. Je ne sais par où commencer tellement j'ai à te remercier. Tu étais là quand je suis arrivée et tu es de retour pour ma thèse, cela résume assez bien. Merci tout simplement d'avoir toujours été présente, de ton écoute de tout instant et de ta grande disponibilité. Un grand merci aussi pour ton aide lors de la rédaction de ce manuscrit ainsi que pour la préparation de la soutenance, pour ton soutien et tes encouragements toujours au bon moment. J'espère que cette année est la bonne pour toi et que tu auras ton poste, tu le mérites. Je te souhaite également de beaux projets personnels et j'espère que notre amitié dépassera les murs du bâtiment C. Un grand merci également à **Natalia**. Je suis ravie que ce soit toi qui me succède et d'avoir terminé ma thèse avec toi, quoique un peu triste de ne pas en avoir profité plus longtemps. C'était vraiment très agréable de travailler avec toi et de s'attaquer à ce gros dur de MCP-1 à deux ! Je te remercie également de tes longs mails qui m'ont tant réconfortée quand j'étais à Reims ainsi que pour l'organisation de ma soirée de thèse, cela m'a beaucoup touchée. Je ne serai pas loin si tu as besoin mais je pense que tu es plus qu'à la hauteur et que tu feras une thèse brillante. Ce qui est sûr c'est que je ne parierai plus avec toi pour passer du NTM à un mariage...

En face, c'est le 104. A l'époque, on pouvait entendre de loin la voix de **Clo** ! Tu nous manques beaucoup ma chère **Clo** ! Sous tes airs de gros dur, tu es une vraie maman poule qui

nous coucounait. Un grand merci pour toutes nos discussions et ces bons moments passés ensemble. **Emmanuelle**, reviens nous voir de temps en temps et bonne chance pour ton nouveau poste à l'INRA. **Nicolas**, qui a pris la relève. Une vraie pipelette sous ses airs discrets, à croire que toutes ces filles lui déteignent dessus ! Je te souhaite bon courage et plein de bonnes choses pour la suite. **Ronan**, bon courage pour la fin de ta thèse et félicitations pour cette nouvelle vie à trois qui démarre pour toi. Enfin **Sara**, félicitations nouveau docteur ! Merci pour tous tes encouragements et ta gentillesse. Je te souhaite beaucoup de bonheur à toi et toute ta petite famille.

Quand j'ai envie de faire une petite pause, c'est mes copines du 107 que je vais voir. En plus, il y a toujours quelques douceurs qui vous attendent ! Un p'tit cookiie **Audrey** ? Je te remercie pour ton écoute, ta douceur et ta gentillesse même si derrière (un verre ou deux de mojito aidant) se cache une vrai fofolle ! Tu es la prochaine sur la liste, je te souhaite plein de courage pour cette dernière année qui n'est pas des plus faciles, mais tu es bien entourée et plus qu'à la hauteur pour cette mission. Je vous souhaite le meilleur pour la suite et beaucoup de bonheur avec Thibault. N'oubliez-pas, on est là si vous voulez enflammer le dance-floor ! On prendra aussi **Armelle**, une vraie clubbeuse cachée, surtout si vous avez du Michael Jackson ou du U2 en stock ! Un grand merci pour tous ces bons moments passés ensemble et qui j'espère seront encore nombreux. Merci pour ton amitié et ton soutien. Je te souhaite le meilleur pour la suite et je suis sûre que tes projets seront une grand réussite, n'en doute pas. **Karine**, je n'ai pas eu le temps de beaucoup te connaître mais ton dynamisme et ta bonne humeur m'ont déjà marquée.

Nous voilà dans le bureau du fond. Merci **Patrick** pour tes encouragements. **Fabienne**, merci pour ta gentillesse et ton humour. Je suis ravie de te voir à nouveau t'éclater dans ce que tu fais, tu le mérites. Enfin **Hélène**, tu fais partie des anciennes mais tu mérites largement ton chapitre. Merci de m'avoir si souvent écoutée et de toute l'aide que tu m'as apportée. Je n'oublierai pas nos longues discussions du soir qui m'ont si souvent mises à la bourre !!! (avais-je vraiment besoin de ça pour être en retard ???) Je suis contente que tu ais trouvé un post-doc qui te convienne à Londres et que Julien ait pu te rejoindre. Je vous souhaite beaucoup de bonheur à tous les deux et promis on vient très bientôt vous voir.

Au premier étage se trouve aussi les reines de la lipidomique, **Justine** et **Véronique**, merci à toutes les deux pour vos encouragements. Merci **Justine** pour tous ces bons moments passés à la table café et merci aussi pour le lit bébé ! J'en prendrai bien soin pour le rendre à mamie c'est promis !! **Véronique**, toute discrète, on ne se connaît que très peu mais j'ai beaucoup apprécié nos discussions et notre journée de vendanges chez Michel, à refaire l'année prochaine ! **Sana**, je te souhaite bonne chance et beaucoup de réussite pour la suite.

Je n'oublie pas les anciens...

Celles qui étaient là à mes débuts et qui ont grandement participé à mon intégration dans le cercle des thésards, **Alex** et **Marie**. Merci aussi à **Thomas**, notre double docteur préféré, peut-être pourra-tu m'expliquer au Canada comment on peut sauver des vies, faire une thèse et

élever trois schtroumpfs, tout ça en même temps?! Une pensée également pour **Valérie, Carla, Sophie, Séverine, Jean-Philippe...**

... ni les petites nouvelles **Audrey et Mylène**, la relève est assurée.

Je monte maintenant d'un étage et me voilà dans le labo des très célèbres hyènes ! Un grand merci tout d'abord à **Véro**, pour ton amitié tout simplement. Merci pour cette bonne ambiance que tu cultives si bien au labo, pour tous ces bons moments passés ensemble, ces petites soirées macarons, tartiflette, sushis, fromage (et j'en passe !) à nous qui je suis sûre seront encore nombreuses. Merci aussi de me remettre dans le droit chemin quand je suis parfois « à l'ouest » (la faute à la p'tite !) et désolé de mon retard chronique ! Je suis vraiment heureuse que tu sois rentrée de ta fabuleuse Suisse (même si elle te manque beaucoup !) et de t'avoir connue. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite. Je ne peux parler de Véro sans avoir une pensée pour son/notre super **Michel** ; merci pour ta bonne humeur, ta gentillesse et ton aide précieuse pour les manips souris. Merci aussi de prendre le temps de nous ravitailler en vin, bœuf, chinoiseries... Je n'oublierai pas mes premières vendanges, c'était vraiment une merveilleuse journée, à renouveler ! Courage pour les derniers mois qu'il te reste et je te souhaite une très belle retraite bien méritée. **Christine P**, tu n'es plus là, mais sans doute la plus hyène des hyènes...même si derrière se cache un cœur gros comme ça ! Merci tout d'abord d'avoir si bien géré notre réserve. Merci aussi pour ton humour, ton rire qu'on entend de loin et tous ces bons moments passés à la table café qui continuent maintenant dans de bons restos ou autour d'une coupe de champagne ! **Christine C**, une autre reine du dance-floor ! Merci pour ton écoute et ta gentillesse. Je te souhaite beaucoup de réussite dans tes nouveaux projets. **Emmanuel**, notre deuxième double docteur préféré ! Merci pour ta bonne humeur constante malgré cette vie surhumaine dont seuls les « vrais » docteurs ont le secret ! Bonne chance pour la suite et beaucoup de bonheur avec ta petite (ou plutôt grande !) famille. Une pensée également pour **Denis**, j'espère que ta thèse s'est bien terminée et que tu t'épanouis maintenant avec ta moitié à Paris, et pour **Greg**, notre célèbre estomac sur pattes !

Le deuxième étage c'est aussi celui du général, que tu nous manques chère **Coco** ! Merci pour ton aide précieuse, ta disponibilité de tout instant et tes conseils au labo ainsi que pour ces bonnes soirées passées ensemble. Je te souhaite beaucoup de réussite dans tes projets, n'en fais pas trop quand même ! **Guillaume**, notre pipelette nationale ! Merci à toi pour ta bonne humeur constante et toutes ces anecdotes fabuleuses que tu nous racontes à la table café, même si parfois c'est un peu tôt pour moi le matin !!! Enfin, je suis sûre que tu feras mieux à la prochaine coupe du monde ! Je te souhaite d'obtenir très bientôt un vrai poste et beaucoup de bonheur avec Emilie. Cette dernière année, j'ai aussi rencontré les deux complices **Emily** et **Vincent**. Merci à vous deux pour votre gentillesse, votre sympathie et les bons moments que nous avons partagés. **Emily**, je suis ravie que tu prennes un nouveau départ et je suis sûre que ta thèse sera brillante, surtout ne change pas ! **Vincent**, continue de faire craquer les filles et de profiter de cette jeunesse qui te va si bien ! Bonne chance **Nizar** pour ta thèse même si je sais que tu vas assurer et bonne route avec Sara ! **Annelise**, pourquoi es-tu aussi grande et mince ? Merci à toi pour ta spontanéité et ta franchise. **Laetitia** que je n'ai pas eu le temps de mieux connaître, merci à toi aussi pour ta franchise, pour ton humour et bonne chance pour la suite. **Laurent**, merci pour tes encouragements et tes conseils. Et désolé de n'être toujours pas

au point sur le métabolisme des lipides... Bonne chance pour cette nouvelle équipe avec Muriel, je suis sûre que ce sera une grande réussite.

Un petit paragraphe spécial pour les ex-thésards. Ma petite **Camille**, merci pour ton sourire, ta bonne humeur constante et d'avoir si souvent partagé mes soirées au labo. Je te souhaite le meilleur pour ta carrière et ta vie personnelle avec Lilian. **Flo**, merci pour ces soirées arrosées de la NSFSA et bonne chance pour la suite. **Claudia**, merci pour ta douceur et ta gentillesse. Je ne peux qu'admirer ton adaptation remarquable. Je suis heureuse d'avoir pu mieux te connaître lorsqu'on a partagé la même chambre à Biarritz et d'avoir partagé de longues heures avec toi en salle de culture. Bonne route à tous les deux avec Pablo ! Merci **Céline**, même si je te connais très peu, pour ton calme et ta douceur. **Pierre**, notre savant fou, t'es sûr tu ne veux toujours pas couper tes cheveux pour qu'on voie ce que ça donne ?!! Merci pour ta gentillesse et nos discussions. Je te souhaite le meilleur pour ton post-doc et tes projets personnels. Dernière (mais pas des moindres), merci **Aurélie** pour ta gentillesse, ta « diplomatie » et ta discrétion. Nous avons mis du temps à nous connaître mais c'est un réel plaisir et j'espère que nous partagerons encore de nombreuses soirées. Je te souhaite beaucoup de bonheur pour la suite, dans le travail à Ranguel et de façon plus personnelle avec Frédéric ; j'attends avec impatience le carton d'invitation...

Je remercie également **Eric** pour ses précieux conseils d'immuno, **François, Jean-Luc, Michel B, Myriam, Stéphane** et **Gérald** (merci à vous deux d'avoir fait chauffer le plancher à ma soirée de thèse) ainsi que les anciennes **Michela, Jayati, Manuela** que j'ai moins côtoyées mais qui ont fait partie de ces années de thèse et que je n'oublie pas !

Je redescends au rez-de-chaussée et je retrouve ma petite **Yvette** qui comme d'habitude a mille choses à faire. Merci pour ta gentillesse, ta patience et ta disponibilité permanente. Désolé de t'embêter si souvent, heureusement que tu es là ! **Jean-Pierre, Elvire, Stéphanie, Isabelle**, merci pour vos encouragements et de nous prêter votre machine à café ! **Xavier**, merci de l'intérêt que tu as toujours porté à ce travail et de tes remarques et questions constructives et utiles. **Nicolas B**, merci de nous prêter votre bureau lorsqu'on doit scanner nos fameux blots ! Enfin, je n'oublie pas **Jacques** et **Nordine** qui veillent toujours au bon fonctionnement de notre bâtiment, ainsi que **Joël** qui traverse tous les midis les travaux de l'hôpital pour partager le déjeuner avec nous et qui gère si bien le magasin.

Même si elle n'est plus au labo et a préféré rejoindre l'HDE pour « sauver des vies », une de mes plus belles rencontres est certainement ma petite Mariannette. Merci **Marianne** pour ton sourire et ta joie de vivre que j'admire et qui ont apporté de vrais rayons de soleil à ma petite vie de thésarde. A tous nos « rôlages » en culture, nos pauses clope, nos potins, nos séries télé, nos fou-rires et toutes ces soirées « bouffes » que j'adore ! Je suis vraiment heureuse de te connaître et je sais que notre amitié continuera au-delà de cette thèse. Tu m'as beaucoup manqué cette dernière année et heureusement que la cantine est là pour qu'on se retrouve ! Du coup, je peux aussi profiter de **Françoise**, merci à toi pour ton inestimable gentillesse et bonne humeur. Merci d'être toujours à l'écoute, attentionnée et de veiller sur Marianne ! Un grand merci également à toutes les filles de l'IUP, **Isabelle, Sandrine, Nadia, Flavie** et

Emilie qui m'accueillent si chaleureusement le midi et avec qui j'ai beaucoup de plaisir à discuter.

Pour terminer la partie travail, je tiens à remercier toutes les personnes avec qui nous avons collaboré et qui ont permis de concrétiser ce projet. En particulier, je remercie tous les rémois qui m'ont accueillie très chaleureusement dans leur labo, appartement et soirée BH ! Je n'oublierai pas votre gentillesse et votre sympathie qui ont fait de ce séjour dans la capitale du champagne un plaisir inattendu.

J'en arrive au chapitre plus personnel. Je tiens tout d'abord à remercier mes amis « hors labo » qui me permettent de m'évader un peu du monde scientifique et dont la présence m'est indispensable. Merci **Ben, Agnès** et **Joachim** pour votre amitié, pour toutes ces journées, soirées, week-end passés ensemble et à toutes vos petites attentions qui me vont droit au cœur. **Fred, Sam** et **Marie, Cyril** et **Chouchou**, à toutes nos soirées albigeoises, toulousaines, lyonnaises, suisses... Même si elles se font plus rares, je sais qu'il y en aura plein d'autres ! Merci de votre soutien et de votre amitié depuis toutes ces années. Merci à **Seb** et **Emma, Sernin** et **Sonia, Sophie, Yohann** et **Gabin, Mimi, Lionel, Sarah** et **Lenni, Steph, Audrey, Inès** et **Raphaël**, pour votre accueil au sein de cette fabuleuse tribu qui ne cesse de s'agrandir et pour votre générosité. Quand est-ce qu'on repart au soleil tous ensemble ? Enfin, une mention toute spéciale à mes deux meilleures amies, qui sont toujours là au bon moment, dans les coups durs comme dans les joies et qui connaissent tout de moi. Merci d'être venu m'écouter parler pendant deux heures de sujets si éloignés des vôtres ! **Pauline**, merci tout simplement de ta présence et de ton soutien à chaque instant, d'être ce que tu es, surtout ne change pas et reste à mes côtés. Je te souhaite de tout mon cœur beaucoup de bonheur avec **Jean**, ta moitié, qui a plutôt intérêt à prendre bien soin de toi ! **Delphine**, malgré des hauts et des bas dans notre amitié, je suis sûre que tu sais qu'elle compte beaucoup pour moi. Merci pour ton écoute et toutes tes attentions qui me touchent.

Le deuxième pilier de mon équilibre c'est ma famille. Un grand merci à ma **maman** sans qui je n'en serais pas là aujourd'hui et à qui je dois tout, merci pour ton amour et ton soutien inconditionnel. Merci aussi d'être souvent (tout le temps ?) la personne qui subit mes mauvaises humeurs et mes coups de mou... J'espère être à ta hauteur dans ce nouveau rôle qui m'attend. Et merci pour toute la préparation de mon pot de thèse !

Ma **tatie** et tonton **Thierry**, merci à vous deux pour votre présence et vos encouragements, et pour tous ces bons moments que nous partageons.

Mes deux **mamies** adorées, qui ne comprennent peut être pas tout à fait ce que je fais mais qui sont très fières, merci de votre amour.

Mon frère **Pierre**, ma « presque » sœur **Anaïs, Thomas, Lucas, Faby** et **Didier**, qui sont bien trop loin de moi mais à qui je pense très souvent. Enfin ma vie d'étudiante est terminée !

Merci aussi à toute ma belle-famille, **Nini** et **Christian**, les **papis** et **mamies** de Duras et de Saint Même, tous mes **beaux-frères, belles-sœurs** et **leurs enfants**, pour tous vos encouragements et pour le plaisir que j'ai de connaître avec vous les joies d'une famille nombreuse.

A tous ceux qui ne sont plus là mais chaque jour à mes côtés j'en suis sûre et qui serait sans doute très fiers...

Enfin **Alex**, merci de me supporter chaque jour et de prendre tant soin de moi. Merci de ton amour, de si bien me comprendre et d'être toujours autant attentionné malgré les années. Je suis heureuse de cette nouvelle vie qui commence pour nous. Enfin merci pour ton aide précieuse pour les finitions de ce manuscrit qui a sans doute évité quelques crises de dernière minute.

ABRÉVIATIONS	17
RÉSUMÉ	21
ABSTRACT	23
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	25
INTRODUCTION GÉNÉRALE	27
PARTIE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	29
CHAPITRE 1 : LA PAROI VASCULAIRE SAIN ET PATHOLOGIQUE : EXEMPLE DE L'ATHEROSCLEROSE ET DE LA RESTENOSE.....	30
I- Structure de la paroi vasculaire	31
I-1. Structure de la paroi artérielle normale.....	31
I-2. Vieillessement de la paroi artérielle.....	32
II- L'artère pathologique : exemple de l'athérosclérose.....	35
II-1. Physiopathologie de l'athérosclérose : généralités.....	35
II-2. Modèles animaux d'étude de l'athérosclérose.....	36
II-3. Mécanismes cellulaires	39
II-3.1. Cellules endothéliales.....	39
II-3.2. Inflammation.....	41
II-3.2.1. Inflammation dans les lésions précoces (strie lipidique)	42
II-3.2.2. Inflammation dans les lésions avancées et compliquées.....	48
II-3.3. Les cellules musculaires lisses : rôle bénéfique ou néfaste selon le stade de développement de pathologie	52
II-3.3.1. Rôle des CML dans l'initiation et la progression de la plaque	52
II-3.3.2. Rôle des CML dans la stabilité de la plaque.....	54
II-3.4. Conclusion	57
II-4. Approches thérapeutiques pour le traitement de l'athérosclérose.....	59
II-4.1. « Traitements » des facteurs de risque	59
II-4.2. Traitement des plaques d'athérosclérose évoluées : l'angioplastie	61
III- Complication de l'athérosclérose : la resténose.....	62
III-1. Physiopathologie de la resténose : généralités	62
III-2. Modèles animaux d'étude de la resténose	64
III-3. Mécanismes cellulaires	67
III-3.1. L'endothélium.....	67
III-3.2. Inflammation.....	69
III-3.3. CML	73
III-3.4. Conclusion	75
III-4. Approches thérapeutiques pour le traitement de la resténose in-stent	76
III-4.1. Les stents actifs de première génération	76
III-4.2. Les futurs stents.....	79
III-4.3. Approches anti-inflammatoires	80
IV- Conclusion.....	81
CHAPITRE 2 : FONCTIONS PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE γ	83
I- La famille des PI3K.....	84
I-1. Structure et produits lipidiques des PI3K	84
I-1.1. PI3K de classe I.....	84
I-1.2. PI3K de classe II.....	86
I-1.3. PI3K de classe III	87
I-2. Mécanismes d'activation des PI3K de classe I.....	88
I-2.1. PI3K de classe IA	88
I-2.2. PI3K de classe IB	90
I-3. Mécanismes d'action des PI3K de classe I.....	91
I-3.1. Activité lipide kinase.....	91
I-3.2. Activité indépendante des produits lipidiques	92
I-4. Conséquences phénotypiques de l'inactivation de PI3K	92
II- Fonctions physiopathologiques de la PI3K γ	95

II-1.	Fonctions cardiaques de PI3K γ	95
II-2.	Fonctions de la PI3K γ dans l'inflammation.....	99
II-2.1.	PI3K γ et recrutement des cellules inflammatoires	99
II-2.2.	PI3K γ et fonctions des lymphocytes	101
II-2.3.	PI3K γ et production de ROS.....	102
II-2.4.	PI3K γ et fonctions mastocytaires	103
II-2.5.	PI3K γ et thrombose	104
II-2.6.	Conclusion	105
II-3.	Fonctions de PI3K γ dans la paroi vasculaire	107
II-3.1.	Fonctions de PI3K γ dans l'endothélium	107
II-3.2.	Fonctions de PI3K γ dans les cellules musculaires lisses vasculaires	109
III-	<i>Inhibiteurs pharmacologiques de PI3K</i>	110
IV-	<i>Conclusion</i>	114
PARTIE II : RESULTATS EXPERIMENTAUX		117
ARTICLE 1 : ROLE DE LA PI3Kγ DANS LES PROCESSUS INFLAMMATOIRES CONTROLANT L'ATHEROSCLEROSE		118
I-	<i>Introduction</i>	118
II-	<i>Résultats</i>	119
III-	<i>Conclusion</i>	128
ARTICLE 2 : ROLE DE LA PI3Kγ DANS LA MIGRATION DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES AORTIQUES.....		131
I-	<i>Introduction</i>	131
II-	<i>Résultats</i>	132
III-	<i>Conclusion</i>	156
PARTIE III : DISCUSSION ET PERSPECTIVES		159
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		160
I-	<i>PI3Kγ et athérosclérose : la PI3Kγ de quel type cellulaire est essentielle dans le développement de la pathologie ?.....</i>	160
I-1.	Dans quelles cellules immunitaires ?	161
I-2.	Implication de la PI3K γ d'autres types cellulaires ?	167
II-	<i>PI3Kγ et resténose ?</i>	168
II-1.	In vitro	169
II-1.1.	Rôle de l'activité kinase-indépendante de la PI3K γ dans la migration des CML ?	169
II-1.2.	Détermination des mécanismes moléculaires de la migration des CML dépendante de la PI3K γ	169
II-2.	In vivo	170
II-2.1.	PI3K γ et hyperplasie intimale ?	170
II-2.2.	PI3K γ et cicatrisation artérielle ?.....	171
PARTIE IV : BIBLIOGRAPHIE		173
PARTIE V : ANNEXE.....		201

ABRÉVIATIONS

ADP	adénosine diphosphate
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
AP-1	activator protein-1
Apo E	apolipoprotein E
ARNm	acide ribonucléique messenger
AT1R	récepteur à l'angiotensine II de type 1
ATP	adénosine triphosphate
BCR	B cell receptor
BH	breakpoint-cluster-region homology
BMS	bare metal stent
Btk	Bruton's tyrosine kinase
CCR2	C-C motif chemokine receptor-2
CD	cellule dendritique
CD40L	CD40 ligand
CETP	cholesteryl ester transfer protein
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CML	cellule musculaire lisse
CXCL16	chemokine (C-X-C) motif ligand 16
CRP	C-reactive protein
DES	drug eluting stent
ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine
EGF	epidermal growth factor
ENTH	epsin N-terminal homology
EPC	endothelial progenitor cell
ET-1	endothelin-1
FcεRI	récepteur de haute affinité des IgE
FGF	fibroblast growth factor
FKBP12	FK506-binding protein 12
fMLP	N-formylméthionyl-leucyl-phénylalanine
FT	facteur tissulaire
FOXO	forkhead box class O
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GFP	green fluorescent protein
GH	growth hormone
GPIbα	glycoprotéine Ibα
GPI-80	glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored protein
GRK-2	G protein-coupled receptor kinase-2
GSK-3	glycogen synthase kinase-3
HB-EGF	heparin-binding epidermal growth factor
HDL	high density lipoprotein
Hsp	heat-shock protein
ICAM-1	inter cellular adhesion molecule-1
IGFR	insulin-like growth factor receptor
IL	interleukin
IFN-γ	interferon-γ
IgE	immunoglobulin E

IP-10	inductible protein-10
I-TAC	interferon-inducible T-cell α chemoattractant
ITAM	immune-receptor tyrosine-based motifs
KI	knock-in
KO	knock-out
LAT	linker for T cell activation
LDL	low density lipoprotein
LDLox	LDL oxydés
LDLr	LDL receptor
LFA1	β 2-integrin
LPA	acide lysophosphatidique
LPS	lipopolysaccharide
LOX-1	lectin-type oxidized LDL receptor-1
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MEC	matrice extracellulaire
Mig	monokine induced by interferon- γ
mMCP-4	mouse mast cell protease-4
MMP	matrix metalloprotease
MO	moelle osseuse
MT-MMP	membrane-type MMP
mTOR	mammalian target of rapamycin
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NF-κB	nuclear factor- κ B
NKR	natural killer cell stimulatory receptors
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
PAK	p21-activated protein kinase
PDE	phosphodiesterase
PDGF	platelet-derived growth factor
PDK	phosphoinositide-dependant kinase
PH	phox homology
PI	phosphatidylinositol
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PI(3)P	phosphatidylinositol 3-monophosphate
PI(3,4)P2	phosphatidylinositol 3,4- <i>bis</i> phosphate
PI(4)P	phosphatidylinositol 4-monophosphate
PI(4,5)P2	phosphatidylinositol 4,5- <i>bis</i> phosphate
PIP3	phosphatidylinositol 3,4,5- <i>tris</i> phosphate
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PX	phox homology
Rag	recombination activating gene
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
ROS	reactive oxygen species
RTK	récepteur à activité tyrosine kinase
S1P	sphingosine 1-phosphate

SCF	stem cell factor
SDF-1α	stromal cell-derived factor-1 α
SH2	src homology 2
SH3	src homology 3
SPC	smooth muscle progenitor cell
SR	scavenger receptor
TCR	T cell receptor
TLR	toll-like receptor
TGF-β	transforming growth factor- β
TLR	toll-like receptor
TNF-α	tumor necrosis factor- α
VCAM-1	vascular cell-adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLA4	α 4-integrin
VLDL	very low density lipoprotein
Vps34p	vacuolar protein sorting 34

RÉSUMÉ

Le rôle de l'inflammation dans le développement des maladies cardiovasculaires reste un domaine majeur d'investigation dans la recherche de nouvelles thérapies. En effet, l'inflammation constitue un élément essentiel de la pathologie de l'athérosclérose mais également de la resténose, complication majeure du traitement par angioplastie de l'athérosclérose. Les cellules inflammatoires ainsi que les médiateurs immuns sont impliqués dans toutes les étapes du développement de l'athérosclérose. Elles participent également à la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses (CML) qui vont acquérir un phénotype migratoire et prolifératif aboutissant à l'hyperplasie intimale, celle-ci constituant le mécanisme majeure de la resténose.

L'isoforme gamma des phosphoinositide 3-kinases (PI3K γ) a fait l'objet d'un intérêt croissant ces dernières années dans les pathologies inflammatoires. Ces kinases appartiennent à la classe I des PI3K capables de générer du phosphatidylinositol 3,4,5-*trisphosphate* (PIP₃) impliqués dans la régulation d'un grand nombre de processus biologiques. La classe I des PI3K est divisée en deux sous-classes, la classe IA (p110 α , β et δ) classiquement activée par les tyrosine kinases, et la classe IB (p110 γ) activée par les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques. La génération de souris invalidées pour la PI3K γ a permis de montrer que les voies de signalisation impliquant cette kinase modulaient des fonctions immunitaires plaçant la PI3K γ comme un bon candidat dans la recherche de cibles thérapeutiques pour le traitement de pathologies auto-immunes. De plus, des études récentes ont montré un profil d'expression complexe de la PI3K γ incluant de faibles taux d'expression de cette kinase dans différents types cellulaires du système cardiovasculaire notamment dans les CML. L'ensemble de ces données a permis de poser l'hypothèse d'un rôle possible de la PI3K γ dans l'athérogénèse et ses complications.

Ainsi dans une première partie, nous nous sommes intéressés au rôle de la PI3K γ dans le développement de l'athérosclérose. L'administration intrapéritonéale d'un inhibiteur pharmacologique spécifique de la PI3K γ conduit à une diminution du développement de lésions athéromateuses précoces mais aussi de plaques plus avancées dans deux modèles murins d'athérosclérose. De plus, à l'aide de souris chimères dépourvues de la PI3K γ dans le système immunitaire, nous avons démontré le rôle central de la PI3K γ dans les processus inflammatoires de la paroi artérielle conduisant au développement de la plaque d'athérome et participant à sa déstabilisation.

La deuxième partie de ce travail s'est intéressée aux fonctions de la PI3K γ dans les cellules composant la paroi artérielle et plus particulièrement les CML. Ce travail réalisé *in vitro* a permis de mettre en évidence l'implication de la PI3K γ dans la migration des CML stimulées par la chimiokine MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1). De plus, nous avons montré que la PI3K γ pouvait servir d'amplificateur de la réponse au PDGF par un mécanisme autocrine/paracrine faisant intervenir le complexe MCP-1/CCR2 (MCP-1 receptor).

L'ensemble des propriétés de la PI3K γ dans la paroi artérielle que nous avons démontré placent cette kinase comme une cible thérapeutique de choix dans le traitement de l'athérosclérose et de ses complications.

ABSTRACT

The role of inflammation in cardiovascular diseases has become an active area of investigation for the development of novel and innovative drugs targeting inflammatory proteins. Inflammation is a crucial event in atherosclerosis and restenosis, a major complication of atherosclerosis treatment by angioplasty. Inflammatory cells and immune factors are involved in all stages of the atherosclerotic process. Moreover, these cells are in part responsible for smooth muscle cell (SMC) migration and proliferation leading to intimal hyperplasia.

The gamma isoform of phosphoinositide 3-kinase (PI3K γ) belongs to class I PI3K family producing 3-phosphoinositides and especially phosphatidylinositol-3,4,5-*tris*phosphate (PIP₃) involved in many biological effects. The class I of PI3K is divided in two subclasses: class IA (p110 α , β and δ) classically activated through tyrosine kinase receptors and class IB (p110 γ), mainly activated by G protein-coupled receptors. Mice lacking catalytic subunits p110 γ have demonstrated a role of this isoform in several inflammatory and immune functions marking PI3K γ as a good candidate for drug development in autoimmune diseases. In addition to its functions in the immune system recent studies have demonstrated a more complex expression pattern in other cell types, particularly in SMC. These properties suggest that PI3K γ could play a role in atherosclerosis and its complications.

In this work, we have first focused on the role of PI3K γ in atherosclerosis development. Our results demonstrate that a specific PI3K γ inhibitor is effective in murine models of established atherosclerosis. Intraperitoneal administration of PI3K γ inhibitor significantly decreased early atherosclerotic lesions and attenuated more advanced atherosclerosis in two mouse models of atherosclerosis. Moreover chimeric mice lacking PI3K γ exclusively in immune cells showed that PI3K γ plays an essential role in inflammatory processes of the vascular wall leading to the development of atherosclerosis and to plaque stability.

In a second part, we investigate the specific involvement of PI3K γ in arterial wall and especially in SMC functions. Our results show that this kinase is essential to SMC migration induced by MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) *in vitro*. Moreover we demonstrate that PI3K γ could amplify PDGF (platelet-derived growth factor)-stimulated SMC migration by an autocrine/paracrine pathway involving MCP-1 secretion and its receptor CCR2 activation.

Altogether our results indicate that PI3K γ could be a potential new therapeutic target in atherosclerosis treatment and its complications.

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures :

- Figure 1** : structure de la paroi artérielle normale.
- Figure 2** : composition cellulaire des plaques d'athérome.
- Figure 3** : les lésions athéromateuses des souris ApoE^{-/-}.
- Figure 4** : la cascade d'adhésion des leucocytes à l'endothélium.
- Figure 5** : les EPC contribuent à la réparation endothéliale et à l'angiogénèse dans les maladies cardiovasculaires.
- Figure 6** : les deux sous-types de monocytes chez l'homme et la souris.
- Figure 7** : rôles des lymphocytes T dans l'athérogénèse.
- Figure 8** : inflammation dans la formation de la strie lipidique.
- Figure 9** : inflammation dans la stabilisation de la plaque d'athérome.
- Figure 10** : rôles des SPC dans le développement de l'athérosclérose.
- Figure 11** : le système rénine-angiotensine.
- Figure 12** : l'angioplastie.
- Figure 13** : mécanismes de la resténose.
- Figure 14** : cellules endothéliales progénitrices et réendothélialisation.
- Figure 15** : transmigration des leucocytes à travers la couche de plaquettes.
- Figure 16** : mécanisme d'action de la rapamycine.
- Figure 17** : définition des thromboses de stent.
- Figure 18** : stents actifs et thrombose.
- Figure 19** : structure d'un phosphoinositide.
- Figure 20** : métabolisme simplifié des 3-phosphoinositides.
- Figure 21** : structures schématiques, spécificité de substrat *in vivo* et mécanismes d'activation des différentes classes de PI3K.
- Figure 22** : activation des PI3K de classe I.
- Figure 23** : mécanisme de transactivation de l'EGFR par des agonistes de RCPG dans les CML.
- Figure 24** : fonctions cellulaires principales des PI3K impliquant le PIP₃.
- Figure 25** : rôle kinase-dépendant de p110 γ dans le cœur.
- Figure 26** : rôle de protéine adaptatrice de la PI3K γ dans la signalisation de l'AMPc.
- Figure 27** : régulation des récepteurs β -adrénergiques par la PI3K γ .
- Figure 28** : implication de la PI3K γ dans les différentes étapes du recrutement des neutrophiles et des macrophages dans la paroi vasculaire.
- Figure 29** : modèle proposé des rôles distincts de PI3K γ et δ dans l'activation des mastocytes.
- Figure 30** : fonctions majeurs de la PI3K γ dans l'inflammation.
- Figure 31** : inhibiteurs « classiques » de toutes les isoformes de PI3K.

- Figure 32** : potentiel thérapeutique de l'inhibition des PI3K de classe I.
- Figure 33** : inhibition de PI3K γ et pathologies humaines.
- Figure 34** : schéma illustrant le rôle de la PI3K γ dans la migration des CML aortiques en réponse à MCP-1 et au PDGF.
- Figure 35** : l'inhibition pharmacologique de l'activité PI3K γ modifie le ratio CD4⁺/CD8⁺ chez les souris ApoE^{-/-}.
- Figure 36** : lésions athéromateuses développées par les souris ApoE^{-/-}/Rag2^{-/-} reconstituées avec des splénocytes sauvages ou PI3K γ ^{-/-}.
- Figure 37** : production des ARNm de l'IL-6, TNF- α et MCP-1 dans les mastocytes dérivés de la moelle osseuse de souris sauvages et PI3K γ ^{-/-}.
- Figure 38** : principales perspectives de l'article 1.

Tableaux :

- Tableau 1** : principales différences entre l'athérosclérose et l'artériosclérose.
- Tableau 2** : remodelage artériel lors du vieillissement.
- Tableau 3** : MMP exprimées dans la paroi vasculaire.
- Tableau 4** : principales similarités et différences entre les modèles murins d'athérosclérose et la pathologie humaine.
- Tableau 5** : les différents modèles de lésion artérielle chez la souris.
- Tableau 6** : comparaison des différents modèles animaux de resténose avec la pathologie humaine.
- Tableau 7** : phénotype général des souris déficientes en sous-unité catalytique de PI3K.
- Tableau 8** : altérations immunologiques des souris déficientes en PI3K γ ou PI3K δ , et exprimant une forme inactive de PI3K γ ou PI3K δ .
- Tableau 9** : nouvelle génération d'inhibiteurs de PI3K.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde et la deuxième cause de décès en France. L'athérosclérose, pathologie de la paroi artérielle complexe et multifactorielle, représente une composante clé de ces maladies. Le rôle de l'inflammation dans le développement des pathologies cardiovasculaires, et en particulier de l'athérosclérose, constitue depuis quelques années un domaine majeur d'investigation. En effet, l'inflammation constitue un élément essentiel de la pathologie de l'athérosclérose, impliquée dans toutes les étapes du développement de la plaque d'athérome, depuis son initiation jusqu'à ses complications. Les mécanismes inflammatoires jouent également un rôle central dans le processus de resténose, principale complication du traitement par angioplastie de l'athérosclérose. L'angioplastie avec pose de stent est actuellement le seul traitement de l'athérosclérose. Les processus inflammatoires sont en partie responsable de la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses (CML) qui migrent et prolifèrent dans l'intima, aboutissant à l'hyperplasie intimale caractérisant cette complication. Les pathologies de l'athérosclérose et de la resténose présentent de nombreux points communs en termes de mécanismes cellulaires, débutant toutes les deux par un dysfonctionnement de l'endothélium qui entraîne une réponse inflammatoire participant à la prolifération et migration anormales des CML.

Les phosphoinositide 3-kinases (PI3K) constituent une famille d'enzyme capable de produire des seconds messagers lipidiques impliqués dans un grand nombre d'effets biologiques. Trois classes de PI3K ont été identifiées et les PI3K de la classe I sont divisées en deux sous-classes : la classe IA (PI3K α , β et δ) classiquement activée par les tyrosine kinases, et la classe IB (PI3K γ) activée par les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques. La PI3K γ , qui fait l'objet de ce travail de thèse, a tout d'abord été décrite dans les cellules hématopoïétiques. Cette isoforme joue en effet un rôle majeur dans les processus inflammatoires, auto-immuns, allergiques et a fait l'objet d'un intérêt croissant ces dernières années dans les pathologies auto-immunes. De plus, des études récentes ont montré un faible taux d'expression de la PI3K γ dans différents types cellulaires du système cardiovasculaire, en particulier dans les cellules composant la paroi artérielle (cellules endothéliales et CML). L'ensemble de ces données apparaît particulièrement intéressant dans le contexte des pathologies cardiovasculaires et c'est pourquoi nous nous sommes intéressés au rôle de la PI3K γ dans les pathologies de la paroi artérielle telles que l'athérosclérose et ses

complications. L'introduction bibliographique de ce manuscrit comporte deux chapitres permettant de mieux aborder l'ensemble de nos résultats. Le premier chapitre est consacré à la paroi vasculaire saine et pathologique. Nous détaillerons dans cette partie la pathologie de l'athérosclérose et la principale complication de son traitement, la resténose. Après avoir abordé les généralités et présenté les modèles d'étude animaux, nous préciserons les mécanismes cellulaires mis en jeu en insistant plus particulièrement sur le rôle majeur de l'inflammation dans ces deux pathologies. Une description des différentes approches thérapeutiques visant à limiter l'incidence de ces deux maladies de la paroi vasculaire sera finalement réalisée. Dans le deuxième chapitre, nous nous intéresserons aux fonctions physiopathologiques de l'isoforme γ des PI3K. Les fonctions de la PI3K γ présentant un intérêt dans le contexte des pathologies cardiovasculaires seront en particulier détaillées. Ainsi, nous décrirons le rôle de cette isoforme dans le système cardiovasculaire, inflammatoire et dans les cellules composant la paroi artérielle (cellules endothéliales et CML). Une brève présentation des inhibiteurs ciblant ces kinases sera réalisée à la fin de ce chapitre.

La partie suivante regroupe les résultats expérimentaux obtenus au cours de ce travail de thèse. Dans une première partie, nous nous sommes intéressés au rôle de la PI3K γ dans les processus de l'athérosclérose. Nous avons montré le rôle central de la PI3K γ des cellules hématopoïétiques dans les processus inflammatoires conduisant au développement de l'athérosclérose et à la déstabilisation de la plaque. Il semble maintenant important de déterminer les mécanismes cellulaires et d'identifier le type cellulaire immunitaire dans lequel la PI3K γ est plus particulièrement essentielle dans le développement de l'athérosclérose. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les effets vasculaires de la PI3K γ *in vitro*, plus particulièrement son rôle dans les fonctions des CML. Nos résultats démontrent l'implication de cette kinase dans la migration des CML en réponse à deux facteurs majeurs impliqués dans la resténose : la chimiokine MCP-1 et le PDGF. Des modèles *in vivo* reproduisant l'hyperplasie intimale caractéristique de la pathologie de la resténose sont à présent nécessaires pour valider ces résultats.

L'ensemble de ces résultats sont donc prometteurs et pourraient contribuer à proposer la PI3K γ comme une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose et de ses complications.

PARTIE I :
INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : La paroi vasculaire saine et pathologique : exemple de l'athérosclérose et de la resténose

L'intégrité de la paroi artérielle et le maintien de l'homéostasie vasculaire sont sous la dépendance de relations très complexes entre les différents acteurs cellulaires de la paroi des vaisseaux. Toute perturbation de cet équilibre conduit notamment à un dysfonctionnement endothélial observé lors du vieillissement et à l'origine de plusieurs pathologies vasculaires telles que l'athérosclérose. L'athérosclérose est une maladie complexe et multifactorielle dans laquelle l'inflammation constitue un élément essentiel et participe à toutes les étapes du développement de la pathologie. Les cellules inflammatoires sont également impliquées dans la prolifération/migration des cellules musculaires lisses (CML) responsables de l'hyperplasie intimale constituant le mécanisme majeur de la resténose, principale complication du traitement par angioplastie de l'athérosclérose.

Dans ce premier chapitre, nous nous intéresserons tout d'abord à la structure de la paroi vasculaire normale et aux mécanismes cellulaires du vieillissement artériel. Nous décrirons ensuite une pathologie de cette paroi artérielle, l'athérosclérose, en détaillant les processus mis en jeu dans les différents types cellulaires et en insistant plus particulièrement sur le rôle majeur de l'inflammation. Nous traiterons de la même façon la pathologie de la resténose en décrivant ici plus en détail le rôle des CML conduisant à l'hyperplasie intimale. Nous verrons que les mécanismes cellulaires mis en jeu dans ces deux pathologies présentent de nombreux points communs. Nous clôturerons la description de ces deux pathologies par un aperçu des approches thérapeutiques développées pour lutter contre ces deux altérations de la paroi vasculaire.

I- Structure de la paroi vasculaire

I-1. Structure de la paroi artérielle normale

Les artères répondent toutes à un modèle commun d'organisation. Leur paroi est organisée en trois tuniques concentriques morphologiquement distinctes, avec de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la media et l'adventice (**Figure 1**).

La tunique interne ou intima est en contact direct avec le sang. Elle est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales formant l'endothélium qui constitue une barrière sélectivement perméable entre le sang et les tissus. L'endothélium assure d'autres fonctions telles que la régulation de l'hémostase, le contrôle de la résistance périphérique, l'inflammation et l'immunité, la croissance vasculaire et l'angiogénèse. C'est au niveau de l'endothélium que se développent les lésions athéromateuses.

La tunique moyenne ou media est séparée de la tunique interne par une lame élastique interne circulaire et est essentiellement composée de CML vasculaires organisées de façon concentrique. A l'extérieur, la media est séparée de l'adventice par une lame élastique externe. Des fibres de collagène et d'élastine sont également retrouvées dans cette couche, en quantité plus ou moins importante selon la fonction des vaisseaux. Les CML et les lames élastiques forment une unité lamellaire. L'activité des CML est régie par des fibres vasomotrices du système nerveux sympathique qui permettent la vasoconstriction ou la vasodilatation en fonction des besoins de l'organisme. Grâce à leurs propriétés contractiles, les CML assurent le maintien du tonus vasculaire et régulent l'élasticité de la paroi.

L'adventice, en périphérie, est composé de fibroblastes et d'un tissu conjonctif peu organisé constitué de fibres de collagène et d'élastine. Il permet de protéger les vaisseaux et de les ancrer aux structures environnantes.

Les cellules formant les différentes couches de la paroi artérielle sont irriguées à la fois par le sang circulant dans le vaisseau mais aussi, pour les vaisseaux de gros diamètre, par un réseau capillaire, les *vasa vasorum*. Ce réseau capillaire va permettre d'apporter les nutriments aux cellules les plus éloignées de la lumière du vaisseau.

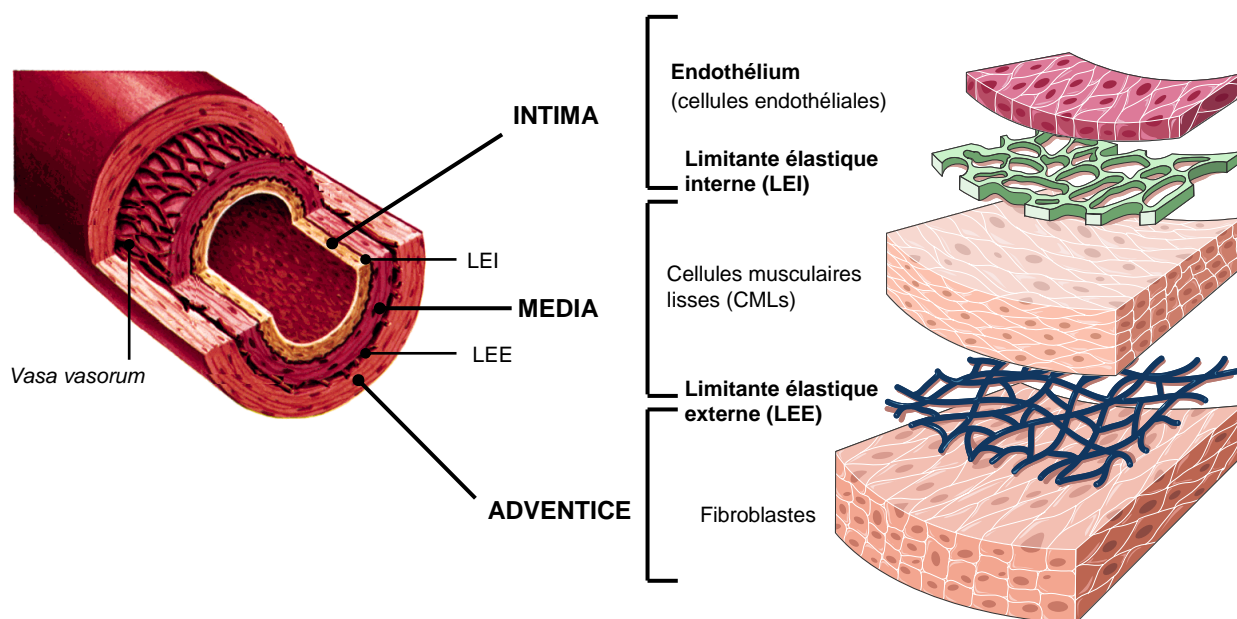


Figure 1 : Structure de la paroi artérielle normale. La paroi artérielle est constituée de trois tuniques concentriques : l'intima, la media et l'adventice.

I-2. Vieillessement de la paroi artérielle

Au cours du vieillissement, le système cardiovasculaire, et plus particulièrement le système artériel connaissent des modifications importantes. Ce processus de vieillissement physiologique, qui diffère des maladies artérielles, apparaît dès l'enfance au niveau des artères coronaires et à l'adolescence au niveau de l'aorte. Le vieillissement artériel se traduit par un épaississement et une rigidification de la paroi artérielle, ce qui correspond à la définition de l'artériosclérose. L'artériosclérose ne conduit pas à une diminution de la lumière des vaisseaux comme dans l'athérosclérose mais plutôt à une augmentation du diamètre des artères. À la différence du processus athéromateux qui est localisé en certains points de l'arbre vasculaire, l'artériosclérose est le résultat de modifications généralisées sur l'ensemble de la longueur du système artériel. Le vieillissement artériel est conservé au cours de l'évolution dans de nombreuses espèces tels que le rat, le lapin et le singe (**Tableau 1**).

	VIEILLISSEMENT				Athérosclérose
	Humains (>65 ans)	Singes (15-20 ans)	Rats (24-90 mois)	Lapins (2-6 ans)	
Dilatation luminale	+	+	+	+	-
↑ Rigidité	+	+	+	+	+
Dysfonction endothéliale	+	+	+	+	+
Épaisseur intimale	+	+	+	+	+
Implication des lipides	-	-	-	-	+
↑ nombre CML	+	+	+	+	+
Macrophage	+	-	-	-	+
Lymphocyte T	+	-	-	-	+
↑ matrice	+	+	+	+	+
MMP dérégulation	+	+	+	?	+
↑ MCP-1/CCR2	+	+	+	+	+
↑ ICAM	+	+	+	+	+
↑ TGFβ	+	+	+	+	+
↑ NADPHox	+	+	+	+	+
↑ VEGF	+	?	?	?	+
↓ NO	+	+	+	+	+
Athérosclérose	-	+	-	+	+
? = information inconnue					

Tableau 1 : Principales différences entre l'athérosclérose et le vieillissement. (D'après Wang, M., 2010, *Current Opinion In Nephrology and Hypertension*) [1]

Le vieillissement vasculaire se traduit par des modifications structurales et fonctionnelles de l'endothélium, comme l'altération de la vasotension/vasorelaxation physiologique et l'acquisition par l'endothélium d'un phénotype inflammatoire [2] [3]. Cette dysfonction endothéliale est essentiellement due à une diminution de la production de NO (nitric oxide) et à une réactivité augmentée aux vasoconstricteurs comme l'endothéline-1 (ET-1, endothelin-1) ou l'angiotensine II, d'où une augmentation du tonus artériel. Ce mécanisme est suivi d'une augmentation de l'expression de molécules pro-inflammatoires telles que le TNF- α (tumor necrosis factor- α) et oxydatives par l'endothélium. Le vieillissement est aussi associé à une diminution de la capacité de régénération de l'endothélium et à la sénescence des cellules endothéliales.

Au cours du vieillissement, il y a un épaississement intimal et medial de la paroi des vaisseaux dû à une augmentation de la masse des CML et de la quantité de collagène extracellulaire. De plus, les CML perdent leur capacité de contraction et passent d'un phénotype contractile à un phénotype synthétique. L'âge entraîne également un remodelage important de la matrice extracellulaire. En particulier, les fibres élastiques de la media sont

dégradées et fragmentées, dû à une augmentation de l'expression des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9 (MMP, matrix metalloprotease), et la synthèse d'élastine est diminuée. La glycation des protéines du collagène et l'augmentation du rapport collagène/élastine participent aussi à la rigidification des artères.

Enfin, la calcification de la paroi artérielle est également une marque du vieillissement. Elle est aussi un stade évolué des plaques d'athérome mais les deux mécanismes sont différents : la calcification artériosclérotique est médiale et intramembranaire alors que la calcification athéroscléreuse est endochondrale et retrouvée essentiellement dans l'intima.

Les mécanismes biologiques, cellulaires et moléculaires mis en jeu lors du vieillissement de la paroi artérielle sont donc complexes et une partie d'entre eux sont communs aux processus qui conduisent aux lésions athéroscléreuses (**Tableau 2**). La prévalence de l'athérosclérose est fortement corrélée à l'âge et fait du vieillissement un des facteurs de risques cardiovasculaires majeurs.

	Athérosclérose	Vieillessement	
Localisation	Grosses et moyennes artères (bifurcations, coudes...)	Toutes artères	
Type de lésions	Focales	Etendues	
Couche concernée	Intima	Média	
Diamètre artériel	Diminution (sténose)	<u>Grosses artères</u> Dilatation	<u>Artérioles</u> Sténose
Manifestation clinique	Ischémie tissulaire	Insuffisance cardiaque	Ischémie tissulaire
Exploration	Biologie (profil lipidique, inflammation), imagerie	Exploration fonctionnelle (imagerie)	
Base de la calcification	Noyau lipidique	Produits de dégradation de la MEC	
Mécanismes physiopathologiques	Dépôt lipidique Inflammation Dysfonction endothéliale Remodelage matriciel Calcification	Anomalie de la vasorégulation endothéliale Remodelage matriciel Calcification	

Tableau 2 : Remodelage artériel lors du vieillissement et comparaison avec l'athérosclérose. (D'après Cottart, CH., 2009, C.R. Biologies) [4]

II- L'artère pathologique : exemple de l'athérosclérose

II-1. Physiopathologie de l'athérosclérose : généralités

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle qui affecte les artères de gros et moyen calibres et représente un événement inévitable associé au vieillissement. Les facteurs de risque de l'athérosclérose, tels que l'âge, le tabac, l'alimentation riche en graisse, l'hypertension, les dyslipidémies, l'obésité, les infections et le stress, initient les mécanismes pathologiques conduisant à un dysfonctionnement de l'endothélium. L'altération de l'endothélium résulte d'une augmentation de la perméabilité endothéliale favorisant l'accumulation des lipoprotéines dans l'intima et l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales. Ces processus entraînent l'adhésion et l'infiltration des leucocytes dans l'intima. Dans la paroi vasculaire, les monocytes se différencient en macrophages qui phagocytent les lipoprotéines modifiées et se transforment ainsi en cellules spumeuses. Parallèlement, les lymphocytes T sont responsables de la réponse immunitaire adaptative. L'accumulation des leucocytes dans l'intima constitue la strie lipidique, asymptomatique, qui peut évoluer vers des lésions avancées et compliquées, en fonction de la réponse inflammatoire. Les cytokines et les facteurs de croissance sécrétés par les leucocytes et les cellules endothéliales stimulent la prolifération et la migration des CML. Les CML participent à la formation de la chape fibreuse qui entoure le noyau lipidique et sépare le pool lipidique prothrombotique du flux sanguin. Dans l'intima, les CML sécrètent des protéines de la matrice extracellulaire (MEC) qui contribuent à l'évolution d'une plaque riche en lipides à une plaque fibrotique, et à plus long terme calcifiée [5, 6] **(Figure 2)**.

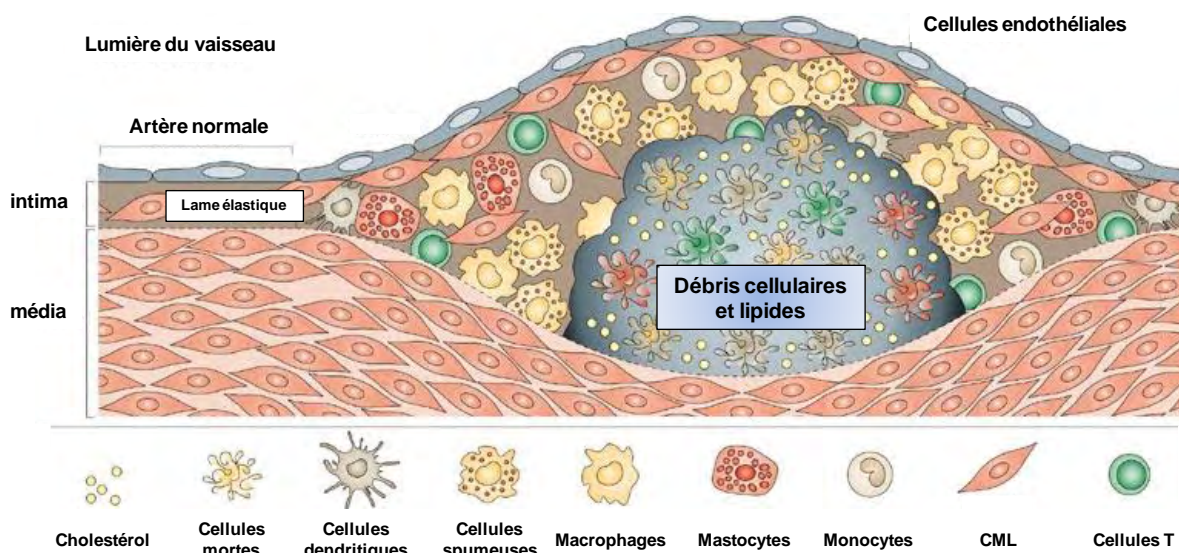


Figure 2 : Composition cellulaire des plaques d'athérome. Les plaques d'athérome sont constituées d'un core lipidique et de débris apoptotiques, recouverts d'une chape fibreuse formée par les cellules musculaires lisses (CML) et le collagène qui stabilisent la plaque. Les cellules immunitaires (monocytes/macrophages, lymphocytes T, mastocytes, cellules dendritiques) présentes dans les lésions produisent des cytokines, des protéases et des molécules pro-thrombotiques qui modulent l'inflammation de la plaque et les fonctions vasculaires. (D'après Hansson, G.K. and Libby, P., 2006, *Nat Rev Immunol*) [7]

Dans les années 90, la balance cellules inflammatoires/CML a constitué un déterminant majeur de la stabilité de la plaque d'athérome. Dans les plaques stables, une couche épaisse de CML et de MEC entoure le core lipidique. Cliniquement, ces lésions sont stables et présentent peu de risque de rupture. A l'inverse, dans les plaques instables, la chape fibreuse est mince et contient peu de CML mais de nombreuses cellules inflammatoires. Ces plaques sont susceptibles de se rompre, causant alors des thromboses qui peuvent aboutir à l'occlusion du vaisseau. Le degré d'inflammation et l'épaisseur de la chape déterminent les risques de rupture de plaque [8]. Les ruptures de plaque répétées augmentent le risque de sténoses et peuvent conduire aux accidents vasculaires tels que l'infarctus du myocarde, les attaques cérébrales ou la gangrène des membres inférieurs.

II-2. Modèles animaux d'étude de l'athérosclérose

Un des premiers modèles d'études *in vivo* de l'athérosclérose a été développé chez le lapin [9]. De nombreux modèles tels que la souris, le porc ou encore le chien ont par la suite permis l'étude des lésions athéromateuses [10]. Nous détaillerons ici les modèles murins. Ce sont des modèles économiques, rapides à obtenir et qui permettent la manipulation de gènes. Les souris sauvages, qui présentent des taux élevés de HDL (high density lipoprotein) et de faibles taux de LDL (low density lipoprotein) et VLDL (very low density lipoprotein), sont

résistantes à l'athérosclérose. La seule exception est représentée par les souris de fond génétique C57Bl/6 qui peuvent développer des plaques d'athérome suite à un régime gras. Cependant, la formation des lésions induite chez ces souris est limitée au sinus aortique et au stade de la strie lipidique [10]. Ainsi, les modèles de souris athéromateuses nécessitent une perturbation du métabolisme des lipoprotéines *via* un régime ou une manipulation génétique. Parmi les différents modèles, les souris déficientes en apolipoprotéine E (ApoE^{-/-}) [11] et les souris déficientes pour le récepteur aux LDL (LDLr^{-/-}) [12] sont les plus utilisées.

L'apolipoprotéine E est une glycoprotéine synthétisée par les macrophages et le foie essentielle pour le transport et le métabolisme des lipides. La délétion du gène *ApoE* chez la souris conduit à une hypercholestérolémie sévère et au développement de lésions spontanées à partir de 8 semaines qui sont très bien caractérisées (**Figure 3**). De plus, les lésions développées par les animaux sont comparables à celles observées chez l'homme, de la formation de la strie lipidique à des lésions plus complexes. Un régime enrichi en gras et en cholestérol permet d'accélérer la maladie chez ces souris [10].

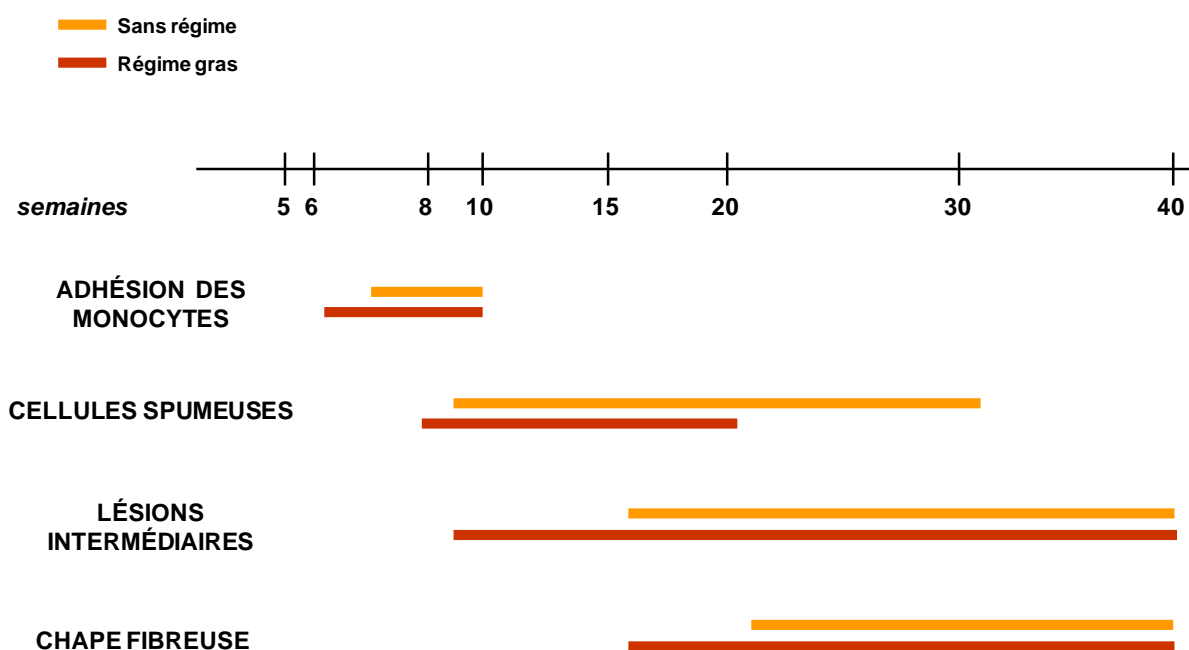


Figure 3 : Les lésions athéromateuses développées par les souris ApoE^{-/-} sont très bien caractérisées. L'adhésion des monocytes est observée entre 6 et 10 semaines. La strie lipidique se forme à partir de 8 semaines et progresse rapidement en lésions avancées caractérisées par la formation de la chape fibreuse. Sous régime hyperlipémiant, la formation des lésions est accélérée et la taille des lésions est augmentée. (D'après Jawien, J., 2004, *J Physiol Pharmacol*) [10]

Les souris LDLr^{-/-} représentent un modèle d'hypercholestérolémie familiale et développent des lésions athéromateuses lorsqu'elles sont soumises à un régime enrichi en cholestérol [12]. Le profil des lipoprotéines des souris LDLr^{-/-} ressemble à celui retrouvé chez

l'Homme. Comme les souris ApoE^{-/-}, les lésions développées sont morphologiquement identiques à celles observées chez l'Homme.

Plus récemment, un autre modèle murin a été développé en introduisant dans des souris C57Bl/6 une forme mutée du gène humain de l'ApoE3 (mutation rare chez l'homme): les souris ApoE*3Leiden [13]. Ces souris sont hyperlipidémiques et développent des lésions athéromateuses sous un régime hypercholestérolémiant. Comme les modèles décrits précédemment, elles développent des lésions similaires à celles observées chez l'Homme. La clairance des lipoprotéines contenant l'ApoE est altérée mais de façon moins importante que chez les souris ApoE^{-/-} et elles sont plus sensibles que les souris ApoE^{-/-} et LDLr^{-/-} aux molécules qui diminuent les taux de lipides, comme par exemple les statines. En fait, selon le modèle utilisé, la réponse à des molécules ciblant préférentiellement l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycéridémie, l'hypertension ou l'inflammation est différente.

Les différents modèles murins d'athérosclérose ont permis une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie humaine. Cependant, les différences au niveau de l'anatomie, du métabolisme des lipides et de l'expression des gènes compliquent la transposition des résultats chez l'Homme. Par exemple, contrairement à ce qu'on observe chez l'Homme, les HDL sont les lipoprotéines circulantes majeures chez la souris. La protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP, cholesteryl ester transfer protein), qui permet le transport du cholestérol estérifié et des triglycérides entre les lipoprotéines chez l'Homme, est absente chez la souris. Chez les souris ApoE^{-/-} le cholestérol est principalement retrouvé dans les VLDL et pas dans les LDL comme chez l'Homme [13]. De plus, les modèles murins d'athérosclérose permettent difficilement l'étude de la rupture de plaque et de la thrombose qui s'en suit, complications pourtant majeures de la maladie chez l'Homme. Récemment, Westrick *et al.* ont reporté néanmoins différents modèles murins de thrombose induite par laser argon, chlorure ferrique, actions mécaniques et photochimiques ou encore induite sur des souris ApoE^{-/-} pour tenter d'étudier les phénomènes de thrombose artérielle [14].

Le choix du modèle utilisé est donc d'une grande importance et l'extrapolation des résultats à la pathologie humaine doit être faite avec prudence. Comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, ces modèles transgéniques chez la souris ont néanmoins permis de déterminer en grande partie les mécanismes cellulaires qui conduisent au développement de l'athérosclérose. De plus, le transfert de moelle osseuse ou de cellules spléniques à ces souris athéromateuses a contribué de façon importante à déterminer le rôle spécifique des différents types cellulaires du système immunitaire dans le développement de la pathologie.

II-3. Mécanismes cellulaires

L'athérosclérose implique des réponses cellulaires hautement spécifiques de type inflammatoire et fibroproliférative. L'altération fonctionnelle de l'endothélium initie la pathologie qui débute par l'infiltration des LDL dans le sous-endothélium qui après oxydation déclenchent une réponse inflammatoire. Les cellules inflammatoires et les médiateurs immuns sont impliqués dans toutes les étapes du développement de l'athérosclérose, depuis son initiation jusqu'à ses complications. Elles participent également à la modulation phénotypique des CML qui vont acquérir un phénotype migratoire et prolifératif participant ainsi activement à la formation de la chape fibreuse.

II-3.1. Cellules endothéliales

Dans des conditions normales, les cellules endothéliales résistent à l'adhésion des leucocytes. Quand elles sont activées par divers stimuli, tels que l'hypertension, le tabac, l'obésité ou l'inflammation, elles expriment de nombreuses molécules d'adhésion qui permettent le recrutement sélectif des leucocytes [15]. Une fois que les leucocytes ont adhéré à l'endothélium activé, des protéines proinflammatoires, les chimiokines, vont induire leur entrée dans l'intima (**Figure 4**). Le « rolling » (ralentissement) des leucocytes sur l'endothélium est dépendant de la P-sélectine exprimée par les cellules endothéliales qui interagit avec PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) qui est exprimé par les monocytes, neutrophiles et lymphocytes. L'absence de P-sélectine conduit à une diminution de la strie lipidique qui est associée à une réduction des macrophages dans la plaque d'athérome [16]. PSGL-1 interagit aussi avec la E-sélectine exprimée par l'endothélium. Les souris déficientes en E-sélectine montrent également une diminution de la taille des lésions athéromateuses [17]. La déficience combinée des E et P-sélectines conduit à une diminution de 80% de la taille des plaques précoces et de 40% de la taille des plaques tardives [18]. Les cellules endothéliales activées expriment également à leur surface des molécules de la famille des immunoglobulines, VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule-1) et ICAM-1 (inter cellular adhesion molecule-1) qui se lient aux intégrines des monocytes et lymphocytes T, VLA4 (α 4-integrin) et LFA1 (β 2-integrin) respectivement, permettant ainsi une forte interaction qui attache les leucocytes à la paroi vasculaire. Ainsi, les souris LDLr^{-/-} Vcam^{D4/D4}, qui présentent une expression très réduite de VCAM-1 (2-8%) présentent une diminution de la formation des lésions précoces [19]. De même, le traitement de souris ApoE^{-/-} avec un anticorps anti-ICAM-1 conduit à une diminution du recrutement des macrophages dans les plaques [20].

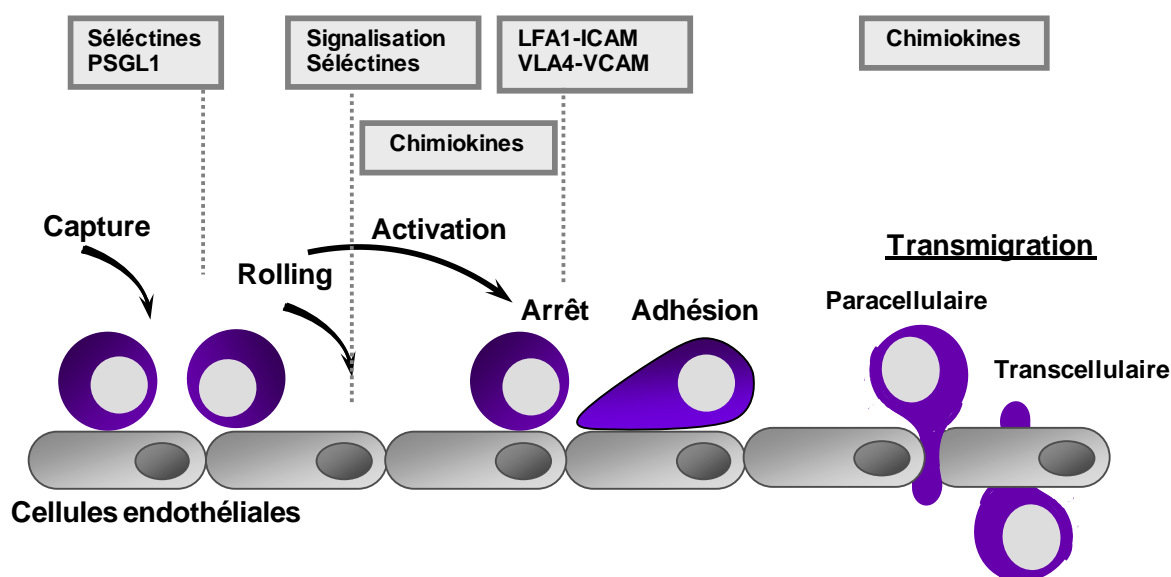


Figure 4 : La cascade d'adhésion des leucocytes sur l'endothélium. Les sélectines, les chimiokines et les intégrines stimulent les différentes étapes du recrutement des leucocytes dans l'espace sous-endothélial. (D'après Ley, K., *Nat rev immunol*, 2007) [21]

Le rôle des cellules endothéliales progénitrices (EPC, endothelial progenitor cell) dans le développement de l'athérosclérose n'est pas clairement établi. Rauscher *et al.* ont examiné les effets du transfert de progéniteurs endothéliaux de la moelle osseuse ($CD31^+/CD45^-$) issus de souris jeunes ou âgées $ApoE^{-/-}$ sur l'athérosclérose. Ils démontrent que le transfert de cellules issues de souris jeunes, mais pas âgées, à des souris $ApoE^{-/-}$ prévient la progression de l'athérosclérose malgré l'hypercholestérolémie [22]. A l'inverse, George *et al.* montrent que le transfert d'EPC issues de la rate à des souris $ApoE^{-/-}$ conduit à une augmentation de la taille des lésions et à une diminution de la chape fibreuse. Le transfert d'EPC induirait un état pro-inflammatoire (diminution de l'IL-10 et augmentation des cellules $CD3^+$) favorisant le développement de l'athérosclérose et la déstabilisation de la plaque [23]. Plus récemment, l'injection d'EPC humaines $CD31^+/CD45^-$ à des souris $ApoE^{-/-}/Rag2^{-/-}$ (recombinaison activating gene 2) n'a pas montré d'effet sur le développement ni la progression de l'athérosclérose [24]. L'ensemble de ces données ne permet pas de conclure quant au rôle des EPC dans le développement de l'athérosclérose. Les différences de résultats peuvent s'expliquer par l'origine différente des EPC utilisées (moelle osseuse, rate, EPC humaines), par l'utilisation de souris receveuses différentes ($ApoE^{-/-}$ versus $ApoE^{-/-}/Rag2^{-/-}$) et par différentes sous-populations d'EPC réinjectées. Ainsi, bien que les taux circulants d'EPC soient inversement corrélés chez l'Homme aux facteurs de risque de l'athérosclérose, le rôle précis de ces cellules dans la pathologie reste à définir [25]. Deux scénari possibles existent : 1) en augmentant la réendothélialisation, les EPC pourraient participer à la réparation de

l'endothélium et ainsi prévenir de l'initiation/progression de l'athérosclérose, 2) en augmentant l'angiogénèse, les EPC pourraient à l'inverse réguler négativement le développement et la stabilité de la plaque [26] (**Figure 5**). Le rôle des EPC est peut être également différent selon le stade de la pathologie considéré. De plus, il semble qu'il existe différents types d'EPC, avec des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles différentes mais la définition précise de ces cellules progénitrices n'est pas clairement établie [27].

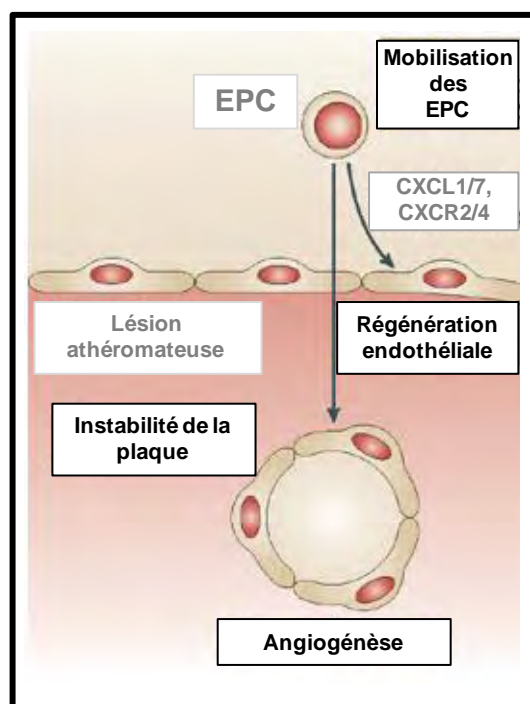


Figure 5 : Les EPC contribuent à la réparation endothéliale et à l'angiogénèse dans les maladies cardiovasculaires. Les EPC pourraient d'une part contribuer à la régénération de l'endothélium suite à un dysfonctionnement endothélial, et d'autre part, ces cellules progénitrices pourraient augmenter la taille des lésions en s'incorporant aux lésions et contribuant à la néovascularisation de la plaque. (D'après Weber C, 2008, Nat Rev) [28]

Les leucocytes recrutés par l'endothélium vont ensuite s'infiltrer dans l'espace sous-endothélial par diapédèse (ou transmigration endothéliale), où ils vont s'activer et débiter les nombreux processus inflammatoires qui caractérisent le développement de l'athérosclérose.

II-3.2. Inflammation

L'inflammation joue un rôle central dans le processus d'athérosclérose depuis son initiation, pendant sa progression et jusqu'à ses complications, plaçant ainsi cette pathologie vasculaire parmi les maladies inflammatoires chroniques. L'immunité innée et l'immunité adaptative participent aux processus inflammatoires de l'athérosclérose. Parmi les cellules immunitaires impliquées dans la pathologie, les macrophages jouent un rôle central en

participant à la fois à la formation du core lipidique et à la production de médiateurs de l'inflammation. De nombreuses études mettent également en évidence le rôle majeur des lymphocytes T dans les premières étapes du développement de l'athérosclérose. De plus, les mastocytes et les neutrophiles ont récemment été identifiés au niveau des sites de lésions et semblent jouer de multiples fonctions dans les différentes étapes du développement de la pathologie [29].

II-3.2.1. Inflammation dans les lésions précoces (strie lipidique)

Une fois recrutés par l'endothélium, les monocytes et les lymphocytes T migrent dans l'espace sous-endothélial par diapédèse guidés par un gradient de chimiokines [21]. De nombreuses chimiokines contribuent à ce processus, notamment MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1 ou CCL2, chemokine ligand 2) et l'IL-8 (IL, interleukin) pour le recrutement des macrophages, et des chimiokines inductibles par l'IFN- γ (interferon- γ) telles que IP-10 (inductible protein-10), Mig (monokine induced by IFN- γ) et I-TAC (IFN-inducible T-cell α -chemoattractant) pour l'activation des cellules T. Par exemple, des souris susceptibles à l'athérosclérose dépourvues de MCP-1 ou de son récepteur (CCR2, C-C motif chemokine receptor-2) présentent une diminution importante du développement des plaques ainsi que de l'infiltration des monocytes [30] [31]. De même, l'inhibition par un antagoniste ou la délétion génétique en CXCR3 (récepteurs de IP-10, Mig et I-TAC) dans des modèles murins d'athérosclérose conduit à une diminution de la taille des lésions athéromateuses précoces [32] [33].

Les monocytes sont les premières cellules inflammatoires qui ont été associées à l'athérosclérose [34]. La déplétion en monocytes circulants (par le clodronate) est associée à une diminution importante de la formation des plaques chez le lapin, suggérant l'importance des monocytes dans l'athérosclérose [35]. Chez la souris, il existe deux sous-types distincts de monocytes dans la circulation : les Ly-6C^{low} résidents et les Ly-6C^{high} inflammatoires (**Figure 6**). Les souris ApoE^{-/-} soumises à un régime hypercholestérolémique présentent une forte augmentation des monocytes Ly-6C^{high} alors que le nombre de monocytes Ly-6C^{low} est inchangé. Les monocytes Ly-6C^{high} adhèrent préférentiellement à l'endothélium activé, s'accumulent dans les plaques et deviennent rapidement des macrophages de lésion [36] [37]. Les monocytes Ly-6C^{high} expriment plus de cytokines pro-inflammatoires, de myéloperoxydase et certaines protéases que les monocytes Ly-6C^{low}. Les récepteurs aux chimiokines CX3CR1 (récepteur de la fractalkine ou CX3CL1), CCR2 et CCR5 (récepteur de

RANTES et MIP-1 α/β) sont impliqués dans le recrutement des monocytes Ly-6C^{high}. Ainsi par exemple, les souris ApoE^{-/-} CX3CR1^{-/-} soumises à un régime gras pendant 10 semaines présentent une diminution de la taille de lésions de 32% associée à une diminution du recrutement des macrophages [38]. La formation des lésions est diminuée de 67% chez les souris CX3CR1^{-/-} MCP-1^{-/-} ApoE^{-/-} en comparaison avec les contrôles et les simple KO (knock-out) et l'inhibition combinée de MCP-1, CXCR3 et CCR5 diminue de 90% la taille des lésions chez les souris ApoE^{-/-}, corrélé avec une diminution du nombre de monocytes circulants [39]. Chez l'Homme, les monocytes n'expriment pas l'antigène Ly-6C, il est donc difficile d'interpréter les données obtenues chez la souris. Néanmoins, il existe également chez l'Homme deux sous-populations majoritaires de monocytes : CD14^{high}CD16^{low} (85 à 95% des monocytes circulants) et CD14^{low}CD16^{high} qui diffèrent aussi dans l'expression des molécules d'adhésion et des récepteurs aux chimiokines (**Figure 6**) [40]. Cependant dans l'athérosclérose, le rôle des différents sous-types de monocytes reste à déterminer.

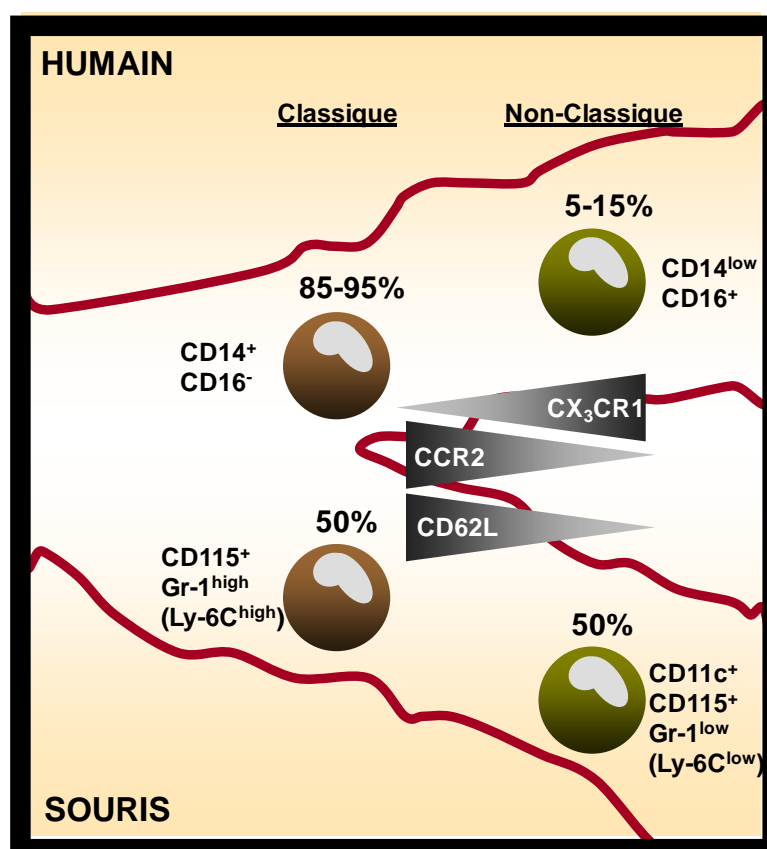


Figure 6 : Les deux sous-types de monocytes chez l'Homme (haut) et la souris (bas). (D'après Gautier, E.L., 2009, ATVB) [41]

La production de M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) par les cellules endothéliales et les CML stimule la différenciation des monocytes en macrophages qui

accumulent des lipides et sécrètent des facteurs pro-inflammatoires dans l'intima (**Figure 8**). Les monocytes peuvent se différencier en deux sous-types de macrophages : les macrophages M1 classiquement activés et inflammatoires et les macrophages M2 anti-inflammatoires et exprimant les récepteurs scavengers. Ces deux sous-types de macrophages ont donc des fonctions opposées dans l'inflammation mais sont tous deux présents dans les lésions. L'importance des macrophages dans l'athérogénèse a pu être montrée grâce à l'utilisation de souris Op/Op (*Csf1*^{-/-}) déficientes en monocytes à cause d'une mutation dans le gène M-CSF (*Csf1*). Ces souris, soumises à un régime hypercholestérolémique, développent très peu de lésions [42]. Stoneman *et al.* ont montré que les cellules CD11b⁺ (CD11b⁺, intégrines des monocytes) jouent un rôle crucial dans l'athérogénèse mais que, une fois formée, la plaque n'est pas réduite par une déplétion en cellules CD11b⁺ [43].

Les macrophages sont capables d'internaliser les lipoprotéines oxydées ou glyquées grâce à leurs récepteurs scavengers. Ces récepteurs dits « éboueurs » sont fortement exprimés à la surface des macrophages et comprennent CD36, CD68, CXCL16 (CXC-chemokine ligand 16), LOX-1 (lectin-type oxidized LDL receptor-1) et SR-A (scavenger receptor-A). Ils ne sont pas régulés ce qui entraîne une accumulation de cholestérol dans les macrophages qui se transforment en cellules spumeuses formant la strie lipidique. Ainsi, les souris déficientes en SR-A ou CD36 sont protégées de l'athérosclérose [44]. Cependant, dans une autre étude, les souris ApoE^{-/-} déficientes en SR-A et CD36 montrent une augmentation de la taille des lésions associée à une augmentation des cellules spumeuses [45]. Dans les deux études, les auteurs observent une diminution de l'apoptose. Par contre, le développement de l'athérosclérose est étudié à des stades différents (8 semaines *versus* 12 semaines). Le rôle de l'apoptose des macrophages est différent selon le stade de la pathologie considérée (cf paragraphes II.3.2.1. et II.3.2.2.), pouvant expliquer les différences de résultats obtenus dans ces deux études.

En parallèle, les LDL oxydés, le LPS (lipopolysaccharide) et Hsp60 (heat-shock protein 60) interagissent avec les TLR (toll-like receptor) exprimés à la surface des cellules endothéliales et des macrophages, conduisant à l'activation des macrophages. Les macrophages activés synthétisent et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des facteurs de croissance comme le FGF (fibroblast growth factor) et le PDGF (platelet-derived growth factor), des MMP, des ROS (reactive oxygen species), des eicosanoïdes et le facteur tissulaire. L'ensemble de ces facteurs sont impliqués dans la progression et la déstabilisation de la plaque (cf paragraphe II.3.2.2.).

L'apoptose des macrophages est également impliquée dans le développement des lésions précoces [46, 47]. Deux études utilisant des approches différentes montrent en effet que l'apoptose des macrophages atténue la formation des lésions précoces. Liu *et al.* utilisent la moelle osseuse de souris KO pour un gène pro-apoptotique ($Bax^{-/-}$) pour reconstituer les souris $LDLr^{-/-}$ préalablement irradiées et montrer que l'apoptose des macrophages est protectrice dans les lésions précoces [48]. La deuxième étude montre également un rôle bénéfique de l'apoptose des macrophages dans les stades précoces, en utilisant une surexpression du gène anti-apoptotique $Bcl2$ spécifiquement dans les macrophages (promoteur CD68) permettant de protéger les macrophages de l'apoptose [49]. Ce processus permettrait ainsi de diminuer le nombre de cellules inflammatoires dans les lésions grâce à une efferocytose (élimination des cellules apoptotiques) efficace.

Les lymphocytes T sont activés par l'interaction avec les antigènes présentés à la surface des macrophages par les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II et débute ainsi la réponse immunitaire adaptative (**Figure 8**). Dans les lésions athérosclérotiques, les lymphocytes sont essentiellement des lymphocytes T $CD4^{+}$, et la plupart d'entre eux possèdent un $TCR\alpha\beta$ (T cell receptor). Des souris $LDLr^{-/-}$ croisées avec des souris $Rag1^{-/-}$ (recombination activating gene 1), dépourvues de lymphocytes, présentent une réduction importante de la formation des stries lipidiques démontrant l'importance des lymphocytes T dans le développement de la plaque d'athérosclérose [50]. De même, des souris $ApoE^{-/-}$ croisées avec des souris immunodéficientes présentent une diminution de la taille des lésions par rapport aux souris $ApoE^{-/-}$. Le transfert de lymphocytes T $CD4^{+}$ à ces souris immunodéficientes permet de réverser ce phénotype, indiquant le rôle essentiel de cette sous-population lymphocytaire [51]. La différenciation en lymphocytes Th1 est stimulée notamment par l'IL-12 et l'IL-18 et inhibée par l'IL-10. L'inhibition de l'IL-12 ou de l'IL-18 chez les souris $ApoE^{-/-}$ conduit à une diminution de la taille des lésions, renforçant ainsi le rôle des lymphocytes Th1 $CD4^{+}$ dans l'athérogénèse [52] [53] [7]. La taille des lésions de souris $ApoE^{-/-}/IFN-\gamma^{-/-}$ est diminuée par rapport à des souris $ApoE^{-/-}$, suggérant que l'effet pro-athérogène des lymphocytes Th1 est associé à leur production d' $IFN-\gamma$ [54]. La production d' $IFN-\gamma$ et de $TNF-\alpha$ par les cellules T conduit à l'activation des macrophages, la production de protéases et de molécules inflammatoires, l'activation des cellules endothéliales, l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion et à une inhibition de la prolifération des CML et de la production de collagène. Le rôle des lymphocytes Th2, qui sécrètent IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 et stimulent les lymphocytes B, est quant à lui encore

controversé [55] et la réponse Th2 ne prévient pas forcément la formation des lésions [56]. Plus récemment, une nouvelle sous population de lymphocytes T, les lymphocytes T régulateurs, a montré des fonctions régulatrices sur le développement de l'athérosclérose. Ait-Oufella *et al.* ont montré que l'injection d'une sous-population de lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺ était capable de réduire la formation de lésions athéromateuses chez la souris [57]. Il existe différents sous-types de lymphocytes T régulateurs : ceux induits par l'IL-10 sont appelés Tr1, et ceux induits par le TGF- β (transforming growth factor- β) sont des Th3. Ainsi, la déficience en TGF- β et en IL-10 induit la formation de lésions athéromateuses [58].

Bien que peu nombreux, les lymphocytes T présents dans les lésions modulent donc de façon importante l'initiation et la progression précoce de l'athérosclérose [50] (**Figure 7**).

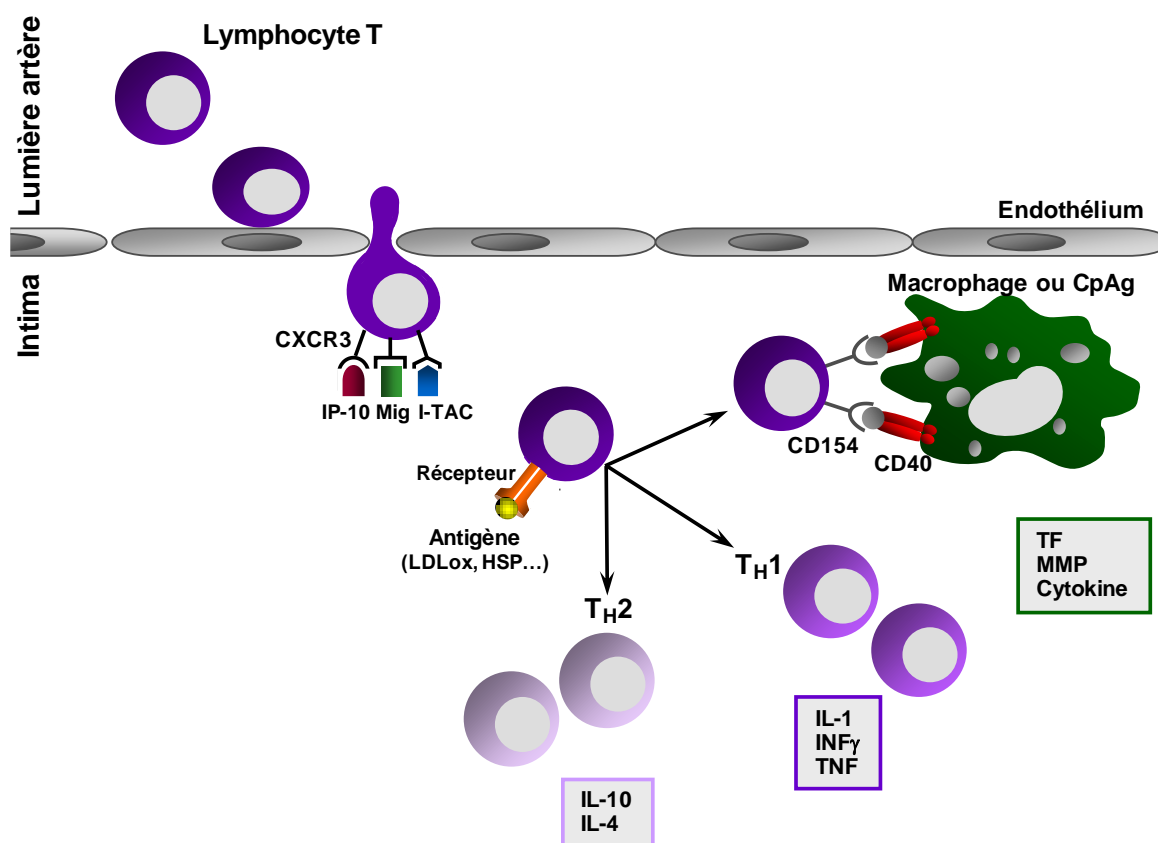


Figure 7 : Rôles des lymphocytes T dans l'athérogénèse. Les lymphocytes sont recrutés dans le sous-endothélium par un trio de chimiokines induites par l'IFN- γ (IP-10, Mig, I-TAC) qui se lient aux récepteurs CXCR3 à la surface des cellules T. Dans l'intima, les lymphocytes T sont activés par l'interaction avec des antigènes (LDLox, Hsp) et se différencient en cellules Th1 ou Th2 en fonction des cytokines sécrétées dans le milieu. Les lymphocytes Th1, majoritaires dans les lésions athéromateuses, produisent alors des cytokines pro-inflammatoires et stimulent l'expression du facteur tissulaire et de MMP par les macrophages. (D'après Libby, P., 2002, Nature) [8]

Le rôle des lymphocytes B dans l'athérosclérose a été évalué plus récemment. Le transfert de moelle osseuse issue de souris déficientes en cellules B à des souris LDLr^{-/-}, conduit à une augmentation de 40% de la taille des lésions, associée à une diminution de la production d'anticorps anti-LDLox [59]. De même, le transfert de cellules B à des souris ApoE^{-/-} réduit la taille des lésions, suggérant que les lymphocytes B et leurs produits ont des fonctions athéro-protectrices [60].

Parmi les cellules du système immunitaire, les mastocytes ont tout d'abord été montrés comme des acteurs de la lutte contre les parasites. De plus en plus de travaux montrent que les mastocytes sont également impliqués dans les pathologies inflammatoires et des études récentes indiquent le rôle des mastocytes dans le développement de l'athérosclérose. Les souris LDLr^{-/-} croisées avec des souris dépourvues de mastocytes matures (Kit^{W-sh/W-sh}) présentent une diminution de la taille des lésions, des dépôts de lipides, de l'infiltration des macrophages et des lymphocytes et une augmentation du contenu en collagène [61]. Le recrutement des mastocytes dans l'intima implique SCF (stem cell factor) et l'éotaxine ou CCL11, une chémokine surexprimée dans les lésions athéroscléreuseuses [62]. Bien que les mastocytes représentent une population minoritaire dans les plaques, ils pourraient jouer de nombreux rôles dans le développement des lésions précoces [63] [64]. L'histamine sécrétée par les mastocytes pourrait conduire à une augmentation de la perméabilité endothéliale favorisant l'infiltration des lipoprotéines plasmatiques. La dégranulation des mastocytes produit aussi de l'héparine qui se lie aux LDL, pouvant ainsi participer au maintien des LDL dans le sous-endothélium. Les LDL pourraient être dégradés par la chymase des mastocytes et former des gouttelettes lipidiques phagocytées par les macrophages entraînant ainsi la formation de cellules spumeuses [65]. Enfin, les enzymes contenues dans les granules de mastocytes (chymase et tryptase) sont capables de dégrader les HDL et d'inhiber ainsi l'efflux de cholestérol par les macrophages.

Les mastocytes pourraient donc à la fois stimuler la capture de cholestérol et inhiber son efflux, participant de ce fait à la formation de la strie lipidique (**Figure 8**). Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires afin de définir le rôle des mastocytes dans le développement de l'athérosclérose.

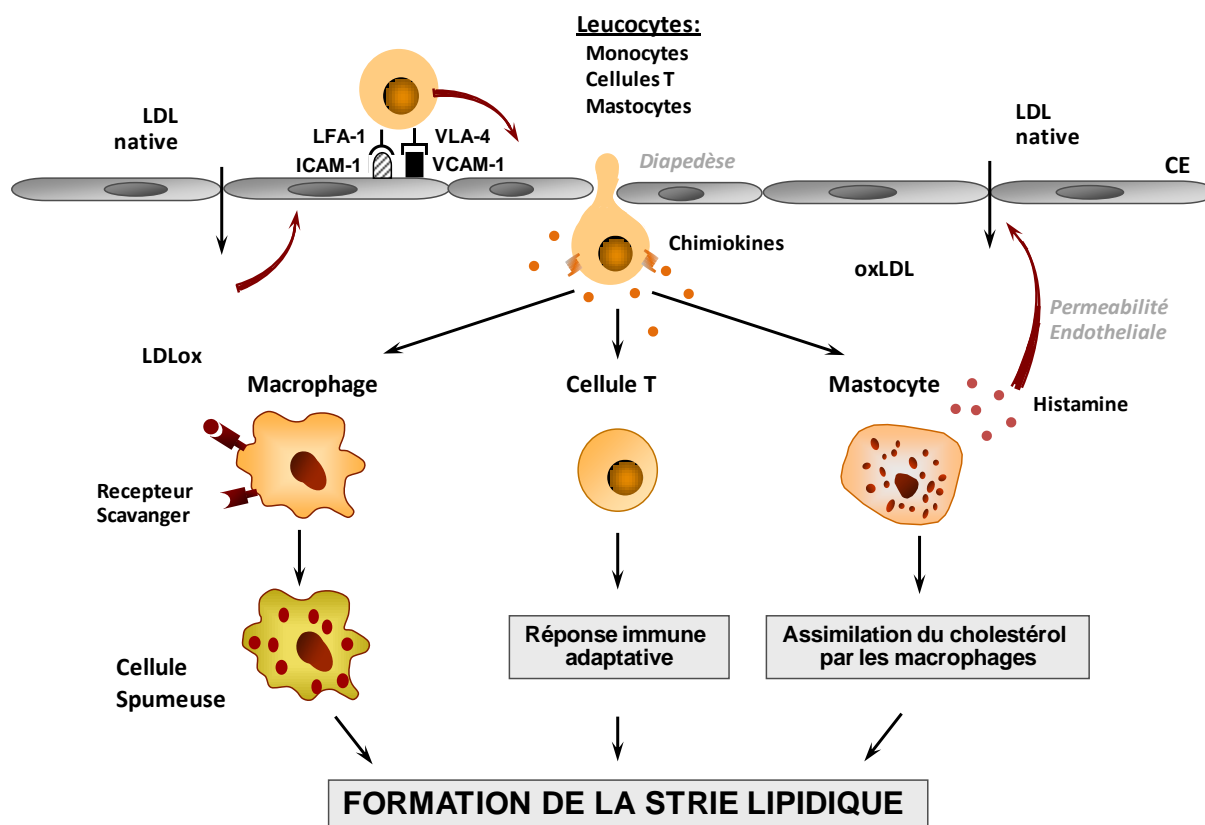


Figure 8 : Inflammation dans la formation de la strie lipidique. Suite à l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales, les leucocytes (monocytes, lymphocytes T, mastocytes) s'infiltrent dans l'intima par diapédèse. Les monocytes se différencient en macrophages qui accumulent les LDL oxydés grâce à leurs récepteurs scavengers et se transforment en cellules spumeuses. En parallèle, les cellules T induisent la réponse immune adaptative et les mastocytes relarguent le contenu de leurs granules augmentant ainsi la perméabilité endothéliale et inhibant l'efflux de cholestérol par les macrophages. (D'après Fougerat, A., *Clinical Sciences*, 2009) [66]

II-3.2.2. Inflammation dans les lésions avancées et compliquées

Les stries lipidiques peuvent ensuite progresser en des plaques matures caractérisées par un cœur lipidique recouvert d'une chape fibreuse (cf paragraphe II-3.3.) et de nombreuses cellules inflammatoires activées (**Figure 9**). Lors de la progression de l'athérosclérose, le nombre de macrophages, lymphocytes T, mastocytes et cellules dendritiques augmente.

Les macrophages participent à la déstabilisation de la plaque d'athérome par leur production de MMP qui dégradent alors les composants de la MEC et fragilisent ainsi les lésions. L'apoptose des CML stimulée par les macrophages [67] ainsi que l'apoptose des macrophages eux-mêmes [68] conduit également à une diminution de la stabilité de la plaque. Dans les plaques avancées, l'augmentation de l'apoptose est associée à une nécrose, ce qui suggère une phagocytose inefficace des cellules apoptotiques [69]. Bien que le mécanisme ne

soit pas clair, ce défaut de phagocytose des cellules apoptotiques (=efferocytose) dans les plaques avancées est la cause majeure de la formation des cores nécrotiques contribuant à la formation de plaques vulnérables [46, 47]. Alors que l'apoptose des macrophages est protectrice dans les lésions précoces, un défaut d'élimination des débris apoptotiques est observé dans les lésions avancées, conduisant à une augmentation de l'inflammation et une augmentation du développement de l'athérosclérose [49].

Les lymphocytes T sont également retrouvés au niveau des sites de rupture de plaque. Les cytokines Th1 (IFN- γ et TNF- α) inhibent la prolifération des CML et leur production de collagène, réduisant ainsi la stabilité de la plaque [70]. Les cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF- α stimulent l'activité des MMP ainsi que leur production par les CML [71]. Le CD40L (CD40 ligand) produit par les lymphocytes induit aussi la production de MMP par les macrophages et du facteur tissulaire qui initie la cascade de coagulation [72] [73]. Enfin, ces facteurs sécrétés par les lymphocytes peuvent aussi induire l'apoptose des CML qui participe à la fragilisation de la plaque [74] (cf paragraphe II-3.3.2.).

Des neutrophiles sont également localisés au niveau des sites de rupture et d'érosion de plaque [75]. Des travaux récents ont aussi identifié les neutrophiles dans les lésions de souris ApoE^{-/-} et LDLr^{-/-} [76] [77]. De plus, l'inhibition (par modification génétique ou par un antagoniste) de CXCR4 (récepteur de SDF-1, stromal cell-derived factor-1) aggrave l'athérosclérose de souris ApoE^{-/-} et augmente le contenu en neutrophiles dans les plaques, associé à un phénotype apoptotique et pro-inflammatoire [76].

Sous l'action du G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), les monocytes, préférentiellement les Ly-6C^{low}, se différencient en cellules dendritiques (CD). Les CD sont des cellules présentatrices d'antigènes spécialisées nécessaires à l'activation des cellules T naïves. La fonction des CD vasculaires dans l'athérosclérose est peu documentée. Chez la souris, les CD s'accumulent dans l'intima par un mécanisme impliquant VCAM-1 et CX3CR1 [78]. Dans les plaques avancées et au niveau des sites de rupture, le nombre de CD est augmenté par rapport aux lésions précoces et elles sont retrouvées en contact avec les cellules T, suggérant un rôle dans la modulation des lymphocytes T [79]. Gautier *et al.* ont observé l'effet des CD sur le développement de l'athérosclérose. Des souris surexprimant Bcl2 spécifiquement dans les CD (promoteur CD11c) présentent une augmentation de la

durée de vie des CD et de l'activation des cellules T. Le croisement de ces souris avec des souris ApoE^{-/-} conduit également à une augmentation des CD associée à une augmentation de l'activation des cellules T. Par contre, les auteurs n'observent pas d'accélération de la progression de l'athérosclérose car de façon surprenante l'augmentation des CD conduit à une diminution des taux plasmatiques en cholestérol qui compense la réponse pro-inflammatoire des lymphocytes Th1 [80].

Les mastocytes, retrouvés dans les plaques avancées [81], pourraient également participer à la déstabilisation de la plaque [82]. Sun *et al.*, qui ont démontré le rôle des mastocytes dans l'athérosclérose, observent d'ailleurs une diminution de la taille des lésions en absence de mastocytes matures essentiellement à des stades avancés [61]. Bot *et al.* montrent que l'activation des mastocytes pendant l'athérogénèse conduit à une augmentation de la progression de la plaque chez les souris ApoE^{-/-}. De plus, l'activation locale des mastocytes dans l'adventice de plaques avancées induit l'apoptose des macrophages, une augmentation du recrutement des leucocytes et une hémorragie intra-plaque [83].

En sécrétant du TNF- α , les mastocytes pourraient induire l'apoptose des cellules endothéliales. Les protéases (chymase et tryptase) produites par les mastocytes sont capables d'activer des pro-MMP, telles que la pro-MMP1 [84] et la pro-MMP3 [85], pouvant ainsi conduire à la dégradation du collagène et à la fragilisation de la plaque. La chymase peut aussi agir directement sur les fonctions des CML en inhibant la synthèse de collagène et en induisant leur apoptose [86] [87].

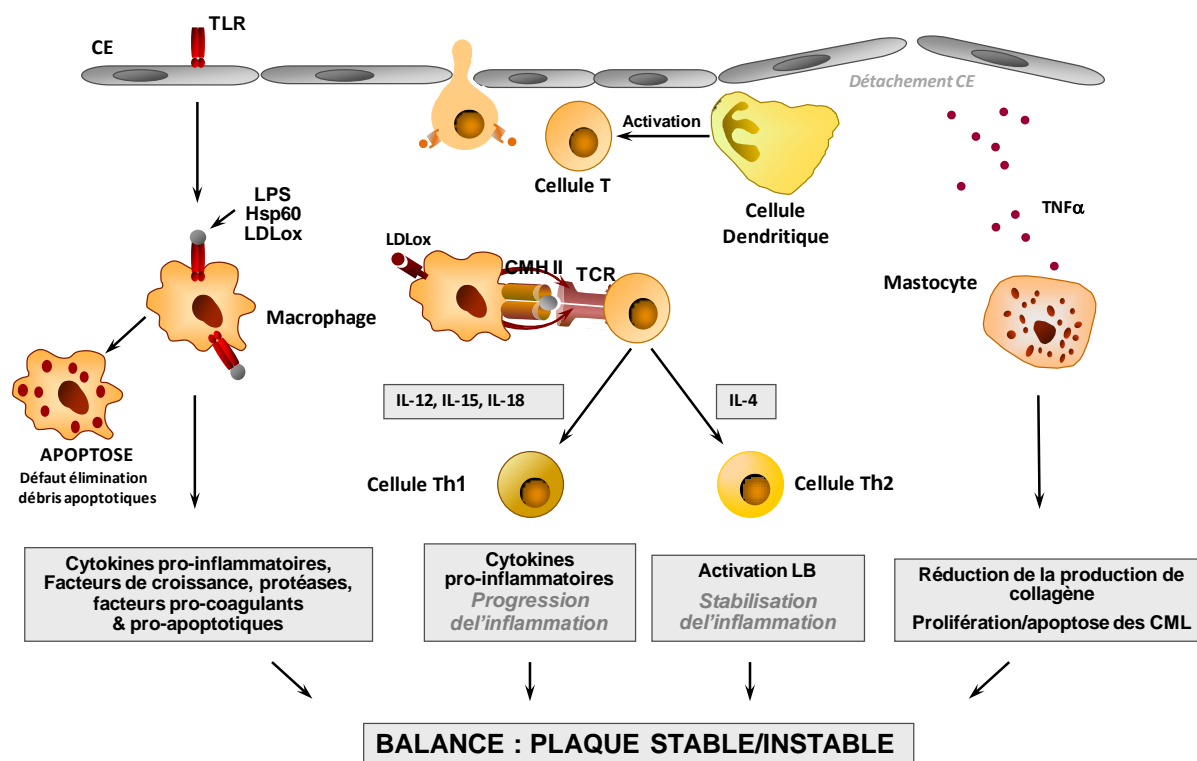


Figure 9 : Inflammation dans la stabilisation de la plaque d'athérome. Par l'intermédiaire des TLR qui lient le LPS, les LDL oxydés, Hsp60, les macrophages sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, des protéases, des facteurs pro-apoptotiques et pro-coagulants. L'apoptose des macrophages amplifie également la réponse inflammatoire. Les lymphocytes T sont activés par l'interaction avec les antigènes présentés à la surface des macrophages par les molécules du CMH de classe II. Selon le profil d'interleukines sécrétées, les lymphocytes se dirigent vers un phénotype Th1 qui va induire une amplification de la réponse inflammatoire ou Th2 qui va stabiliser l'inflammation en interagissant avec les lymphocytes B qui produisent des anticorps dirigés contre les LDL oxydés. Parallèlement, les mastocytes sécrètent du TNF α qui provoque le détachement des cellules endothéliales, et le contenu des granules qui induit une diminution de la production de collagène par les CML et influence les CML vers la prolifération ou l'apoptose. Les cellules dendritiques jouent un rôle dans l'activation des lymphocytes T. L'ensemble de ces réponses peut donc orienter la plaque vers un phénotype stable ou instable. (D'après Fougerat, A., *Clinical Sciences*, 2009) [66]

Au niveau des sites de rupture de plaque, le nombre de cellules inflammatoires est fortement augmenté [88]. C'est aussi à ce niveau que se forment les thrombi, principale conséquence de la rupture de la plaque d'athérome. Les macrophages, les lymphocytes T et les mastocytes agissent en synergie pour déclencher le processus de thrombose. L'ensemble de ces cellules stimulent notamment l'expression du facteur tissulaire par les macrophages et les CML. La cascade de coagulation ainsi activée met en jeu les plaquettes et conduit à la formation de thrombine. La rupture de plaque entraîne l'exposition du core thrombogène aux plaquettes sanguines et induit leur agrégation et la thrombose. En plus de ces effets sur la cascade de coagulation, la thrombine est également liée aux processus inflammatoires de

l'athérosclérose en agissant directement sur les cellules vasculaires telles que les cellules endothéliales, les CML ou sur les macrophages [89]. Ainsi, les processus de thrombose peuvent amplifier l'inflammation qui à son tour va induire le processus thrombotique, créant ainsi une boucle d'amplification qui maintient les signaux athérogènes.

L'inflammation intervient donc dans toutes les phases de l'athérosclérose, depuis son initiation jusqu'à sa complication ultime, la thrombose. Comme nous l'avons vu, les cellules inflammatoires participent avec les cellules endothéliales à la modulation phénotypique des CML qui vont ensuite conduire à la formation de la chape fibreuse.

II-3.3. Les cellules musculaires lisses : rôle bénéfique ou néfaste selon le stade de développement de pathologie

II-3.3.1. Rôle des CML dans l'initiation et la progression de la plaque

Les cellules endothéliales, les plaquettes et les cellules inflammatoires activées sécrètent des facteurs de croissance et des cytokines qui induisent la modulation phénotypique des CML qui passent d'un phénotype contractile hautement différencié et insensible aux facteurs de croissance à un phénotype actif, synthétique et prolifératif. Les CML migrent de la media vers l'intima où elles prolifèrent et déposent des composants de la MEC pour former la chape fibreuse qui entoure le core lipidique. Les différents facteurs sécrétés en réponse à l'inflammation, tels que le PDGF, le FGF, l'ET-1, l'IL-1, l'IFN- γ et la thrombine, stimulent la prolifération/migration des CML. Ces facteurs permettent aussi l'activation de protéases, les MMP, qui dégradent la matrice favorisant également la prolifération/migration des CML [90]. Les MMP constituent une famille de 25 protéases, sécrétées ou membranaires, qui dégradent de nombreux composants de la MEC. 14 ont été identifiées dans la paroi vasculaire [91] (**Tableau 3**) et leur expression est augmentée dans les plaques vulnérables humaines [92]. La MMP-2 est exprimée de façon constitutive par les CML [70] et constitue, avec la MMP-14 (ou MT-MMP-1, membrane type-MMP-1) [93] la MMP majoritaire associée à la migration des CML [94]. En dégradant l'élastine, les MMP conduisent à la production de peptides d'élastine appelés aussi matrikines car capables d'induire de nombreux effets biologiques tels que la production de ROS et le chimiotactisme des cellules inflammatoires [95], la production de NO par les cellules endothéliales [96] et la prolifération des CML [97]. La dégradation de la matrice permet à son tour la libération d'autres facteurs conduisant à l'activation des MMP, entraînant le maintien de la modulation phénotypique des CML. L'ensemble de ces processus

conduit à la formation d'une chape fibreuse entourant le core lipidique formée de cellules inflammatoires et de débris nécrotiques [6].

GROUPE	MMP	NOM COMMUN
Collagénases	MMP-1	Collagénase-1, Collagénase interstitielle
	MMP-8	Collagénase-2, Collagénase du neutrophile
	MMP-13	Collagénase-3
Gélatinases	MMP-2	Gélatinase-A
	MMP-9	Gélatinase-B
Stromélysines	MMP-3	Stromélysine-1
	MMP-10	Stromélysine-2
	MMP-7	Matrilysine
MT-MMP	MMP-14	MT1-MMP
	MMP-15	MT2-MMP
	MMP-16	MT3-MMP
	MMP-17	MT4-MMP
Autres	MMP-11	Stromélysine-3
	MMP-12	Métalloélastase macrophagique

Tableau 3 : MMP exprimées dans la paroi vasculaire. (D'après Newby, A.C., 2005, *Physiol Rev*) [91]

La balance complexe entre les différents facteurs sécrétés par les cellules de la paroi athéromateuse va ensuite déterminer la stabilité de la plaque d'athérome. Ainsi, de façon simplifiée, soit les CML vont continuer à proliférer et à sécréter des molécules de la matrice qui stabilisent la plaque, soit les cellules inflammatoires vont inhiber la prolifération/migration des CML, induire leur apoptose et fragiliser la plaque [98] (cf paragraphe II-3.3.2).

Bien que la production de matrice soit le rôle majeur des CML dans la progression des lésions, un rôle de ces cellules a été suggéré récemment dans l'initiation de la maladie [99]. En effet, bien que la majorité des CML de la paroi vasculaire humaine soit localisée dans la média, un nombre non négligeable est retrouvé dans l'intima. De plus, des études

immunohistologiques sur des coupes d'artères humaines montrent que les régions susceptibles au développement de l'athérosclérose contiennent un grand nombre de CML, alors que les régions plus résistantes en contiennent peu [100]. Comme les macrophages, les CML peuvent exprimer des récepteurs impliqués dans la capture des lipides, tels que le récepteur des LDL, le récepteur des VLDL, CD36, CXCL16, former des cellules « apparentées » aux cellules spumeuses et participer ainsi à l'accumulation précoce des lipides dans la plaque [101]. Comme les cellules endothéliales, les CML peuvent aussi exprimer des molécules d'adhésion, telles que VCAM-1 et ICAM-1, ce qui peut conduire à la stabilisation et au maintien des leucocytes dans les lésions [102]. Les CML sont également capables de protéger les leucocytes de l'apoptose [103]. Enfin, les cytokines comme le PDGF, le TGF- β , l'IFN- γ et MCP-1, sécrétées par les différents types cellulaires des lésions peuvent aussi être produites par les CML et participent à l'initiation et à la propagation de la réponse inflammatoire [104].

II-3.3.2. Rôle des CML dans la stabilité de la plaque

La chape fibreuse formée par les CML et la matrice permet de séparer efficacement le sang circulant des composants thrombogènes du centre lipidique de la plaque. Cependant, si la plaque devient instable, elle est susceptible de se rompre conduisant à la formation d'un thrombus et à l'occlusion du vaisseau. La stabilité de la plaque d'athérome est donc une notion majeure. Une plaque stable se caractérise par la présence d'un centre lipidique peu important et d'une chape fibreuse épaisse et solide, peu sensible à la rupture. A l'inverse, une plaque instable est caractérisée par un core lipidique important, de nombreuses cellules inflammatoires et une chape fibreuse mince contenant peu de CML. Les CML et la matrice qu'elles synthétisent jouent donc un rôle central dans la stabilité de la plaque d'athérome et les complications associées à l'athérosclérose.

Comme décrit précédemment (paragraphe II-3.2.2.), les cellules inflammatoires activées dès les stades précoces de la maladie jouent un rôle crucial dans la stabilité/instabilité de la plaque d'athérome. L'apoptose des CML représente aussi un mécanisme majeur associé aux ruptures de plaque [105]. D'un point de vue mécanistique, les CML expriment des « récepteurs de mort » tels que Fas et les récepteurs aux TNF- α dont la liaison avec leur ligand produit par les cellules inflammatoires conduit à leur apoptose. L'induction de l'apoptose des CML chez des souris ApoE^{-/-} conduit à une diminution de la chape fibreuse et du contenu en collagène, à une augmentation des débris cellulaires et de l'inflammation [106]. Des travaux plus récents montrent que l'apoptose faible des CML pendant l'athérogénèse ainsi que dans des plaques établies conduit à une augmentation de la taille des lésions et une

fragilisation de la plaque. De plus, l'apoptose chronique des CML chez des souris jeunes entraîne la calcification des lésions [107]. En condition d'hyperlipidémie, la phagocytose des CML apoptotiques est réduite et conduit à la nécrose des CML qui sécrètent de l'IL-1 α pouvant stimuler la production de cytokines inflammatoires (IL-6, MCP-1) par les CML environnantes [108]. L'apoptose des CML qui conduit à une diminution de ces cellules participe donc de façon importante à la formation de plaques vulnérables. De plus, si l'apoptose est associée à un défaut d'élimination des cellules mortes par les macrophages, la nécrose apparaît et induit une augmentation de l'inflammation.

Les MMP sécrétées par les différents types cellulaires de la paroi artérielle sont également impliquées dans ce phénomène. Alors que les MMP favorisent une plaque stable en stimulant la prolifération/migration des CML, elles peuvent aussi participer à la fragilisation des lésions en dégradant la matrice [109].

De récentes études indiquent la présence de CML progénitrices (SPC, smooth muscle progenitor cells) dans les plaques d'athérome [110]. Les SPC peuvent dériver de la moelle osseuse, de la circulation (SPC circulantes) ou de la paroi vasculaire (SPC résidents dans les tissus) [111]. En utilisant des souris ApoE^{-/-} irradiées reconstituées avec de la moelle osseuse issue de souris GFP et soumises à un régime gras pendant 8 semaines, Sata *et al.* montrent que 42% des cellules positives pour la SM α -actine (SM, smooth muscle) dans les lésions sont également GFP⁺ [112]. A l'inverse d'autres données récentes indiquent que les CML dans les plaques avancées prennent leur origine dans la paroi vasculaire et que le remodelage vasculaire après une rupture de plaque implique des CML locales plutôt que circulantes ou dérivées de la moelle osseuse [113].

Récemment, Zoll *et al.* ont démontré que le transfert de SPC humaines à des souris ApoE^{-/-} immunodéficientes réduit la progression des lésions précoces, mais pas avancées, et conduit à une stabilisation de la plaque par rapport aux animaux contrôles [24]. Les SPC circulantes auraient ainsi un effet protecteur dans l'athérogénèse et un transfert de SPC dans des plaques établies pourrait prévenir l'instabilité et la rupture de plaque. Le rôle des SPC dans le développement des lésions athéromateuses reste cependant peu documenté et parfois controversé. Des études complémentaires apparaissent donc nécessaires pour définir la contribution de ces cellules dans la pathologie de l'athérosclérose (**Figure 10**).

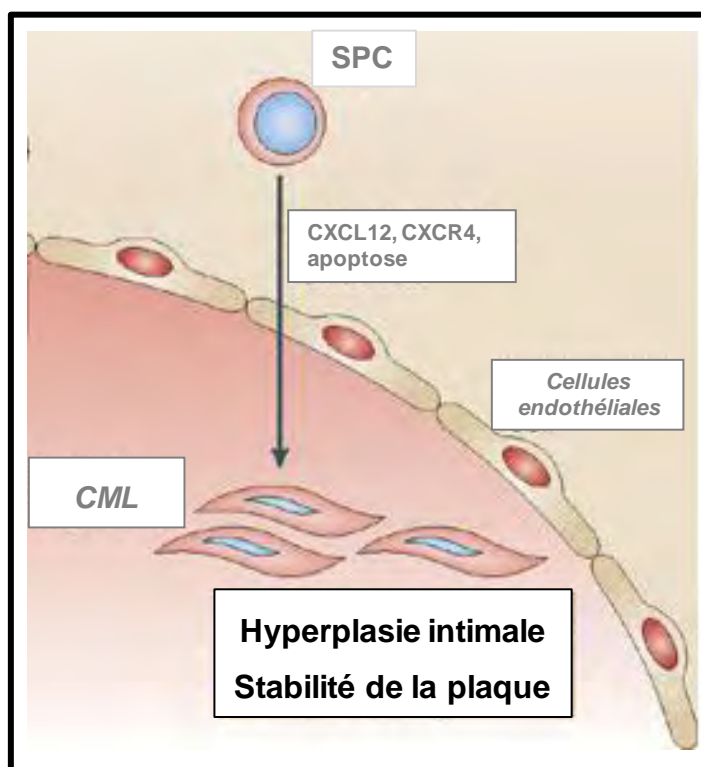


Figure 10 : Rôles des SPC dans le développement de l'athérosclérose. (D'après Weber C, 2008, *Nat Rev*) [28]

En conclusion, le rôle des CML dans l'athérosclérose est donc complexe. Elles peuvent participer aux étapes d'initiation de la pathologie et favoriser ainsi le développement de la plaque d'athérome. Par contre, leurs fonctions dans les stades tardifs sont plutôt bénéfiques puisqu'elles permettent la formation d'une chape fibreuse solide et stable, peu sensible à la rupture de plaque.

II-3.4. Conclusion

La pathologie de l'athérosclérose est donc complexe et les différents types cellulaires impliqués peuvent jouer des rôles opposés selon le stade de la maladie considéré. Des données récentes indiquent par ailleurs la présence et l'implication de cellules progénitrices (EPC et SPC) dans les lésions athéromateuses qui nécessitent cependant d'être approfondies. Les cellules inflammatoires et les médiateurs immuns sont plus particulièrement impliqués dans toutes les étapes du développement de l'athérosclérose et placent ainsi cette pathologie vasculaire parmi les maladies inflammatoires chroniques. Le rôle de l'inflammation dans l'athérogénèse est actuellement un domaine majeur d'investigation dans la recherche de nouvelles thérapies.

Les modèles de souris athéromateuses ont permis de grandes avancées dans la compréhension du développement de l'athérosclérose. Aux vues des différences avec l'Homme (**Tableau 4**), il est cependant nécessaire de rester prudent lors de la transposition des données à la pathologie humaine.

Type cellulaire	Résultats sur modèles de souris	Pertinence en pathologie humaine
Leucocytes		
Neutrophiles	<ul style="list-style-type: none"> • Absence réduit la formation de l'athérosclérose précoce et de l'anévrisme • Expansion via Cxcr4 augmente leur nombre dans les plaques, exacerbe l'athérosclérose précoce 	<ul style="list-style-type: none"> • Présents au site de rupture et d'érosion de la plaque dans les maladies aiguës de l'artère coronaire (ACAD, acute coronary artery disease) • Augmente le nombre de leucocytes et le niveau des myéloperoxydases dans les ACA • Pas d'étude interventionnelle disponible
Mastocytes	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition de leur fonction prévient l'athérogenèse et la déstabilisation de la plaque • Déficience en production de cytokines réduit l'athérosclérose et la formation des anévrysmes 	<ul style="list-style-type: none"> • Détecté dans les plaques d'artère coronaire et carotide au niveau du site d'érosion, rupture ou hémorragie • Pas d'étude interventionnelle disponible
Monocytes et macrophages	<ul style="list-style-type: none"> • Flux continu observé à chaque stade de l'athérogenèse • Différents sous-types de monocytes utilisent différents récepteurs aux chimiokines pour entrer dans la plaque et différentes voies de différenciation • Absence réduit stade précoce mais pas tardif de l'athérogenèse 	<ul style="list-style-type: none"> • Cellules de la strie lipidique et des lésions athéroscléreuses complexes • Sous-type de monocytes sont des marqueurs potentiels de monocytose induite par l'hypercholestérolémie • Pas d'étude interventionnelle disponible (cibler leur recrutement pourrait réduire le développement de l'athérosclérose)
Cellules T	<ul style="list-style-type: none"> • Flux continu observé à chaque stade de l'athérogenèse • Déficit en cellules Th1 diminue l'athérosclérose et cellules Th1 stimulées par INFγ favorise l'athérosclérose • Cellules T h2, TGFβ et IL-10 diminue l'inflammation vasculaire et l'athérosclérose • Cellule T CD8+ favorise la formation d'anévrisme 	<ul style="list-style-type: none"> • Pas d'étude interventionnelle disponible (cibler leur recrutement pourrait réduire le développement de l'athérosclérose)
Cellules B	<ul style="list-style-type: none"> • Présents à la base des stries lipidiques précoces et de façon constitutive dans l'adventice • Protection contre l'athérosclérose dans les souris splénectomisées 	<ul style="list-style-type: none"> • Principalement localisées dans l'adventice dans les plaques humaines • Présentes dans les plaques athéromateuses de l'aorte abdominale • Protocole d'immunisation contre l'athérosclérose avec des lipides modifiés ou des lipoprotéines comme antigène
DC	<ul style="list-style-type: none"> • Accumulation dans l'intima des régions susceptibles à l'athérosclérose • leur nombre dans la plaque est corrélé avec la taille de la plaque et son niveau d'inflammation • pDC sont présents dans les plaques de l'artère carotide et contribue à l'instabilité de la plaque 	<ul style="list-style-type: none"> • Forme un réseau dans l'intima de jeunes individus sains • le nombre de précurseurs des DC et les DC matures sont augmentés au site de rupture • les précurseurs des DC circulants sont réduits chez les patients atteints d'ACA
Progéniteurs vasculaires		
SPC	<ul style="list-style-type: none"> • Contribue au remodelage néointimal après lésion de l'artère et stabilise les plaques d'athérome 	<ul style="list-style-type: none"> • CML dérivée d'un donneur sont recrutée au niveau des artères athéroscléreuses • Augmentation dans le sang des patients CAD stables et diminution dans les ACA
EPC	<ul style="list-style-type: none"> • Régénération des CE et recrutement des cellules de la MO dérivées des EPC^{Tie2+} au niveau des sites athéromateux • Administration des EPC et des cellules de la MO augmente la taille des plaques et leur instabilité • Transfert ou mobilisation contribue régénération endothéliale après lésion et améliore la fonction des CE dans l'athérosclérose 	<ul style="list-style-type: none"> • Résultats contradictoires sur leur définition exacte et rôle fonctionnel

Tableau 4 : Principales similarités et différences entre les modèles murins d'athérosclérose et la pathologie humaine. (D'après Weber, C., Nat Rev Immunol, 2008) [28]

II-4. Approches thérapeutiques pour le traitement de l'athérosclérose

De nombreuses thérapies ont été développées pour diminuer le risque, le développement et la progression de l'athérosclérose. La majorité des thérapies actuelles ciblent les facteurs de risque de la maladie comme l'hypercholestérolémie et l'hypertension. Parmi ces différents traitements, l'utilisation des statines basée sur la réduction du taux plasmatique de LDL cholestérol est la stratégie la plus largement utilisée. Au-delà de leurs effets hypolipémiants, les statines possèdent aussi des propriétés anti-inflammatoires. Ainsi l'inflammation constitue une cible potentielle dans la recherche de nouvelles thérapies visant à prévenir le développement de l'athérosclérose. Néanmoins, le seul véritable traitement actuel de l'athérosclérose établie relève de la cardiologie interventionnelle et consiste à réaliser une angioplastie avec pose de stent.

II-4.1. « Traitements » des facteurs de risque

➤ Modification des lipides

L'un des facteurs de risque majeur du développement de l'athérosclérose est la concentration plasmatique élevée en LDL modifiés, principalement par oxydation. De nombreuses stratégies thérapeutiques visent ainsi à diminuer le taux de LDL cholestérol circulant ou à augmenter celui du HDL cholestérol. Parmi ces thérapies, les statines ont montré leur efficacité dans la prévention de la progression de l'athérosclérose [114]. Les statines sont des inhibiteurs de l'enzyme HMG-CoA réductase (hydroxy-3-méthyl glutaryl Coenzyme A reductase) impliquée dans la synthèse de cholestérol. Les statines bloquent ainsi la synthèse de mévalonate, précurseur du cholestérol, et induisent une diminution de la concentration hépatique en cholestérol qui conduit à l'activation de la transcription de gènes tels que le LDLr impliqués dans la clairance plasmatique des LDL. La diminution importante (27 à 55%) des concentrations plasmatiques en LDL-cholestérol est l'effet principal des statines mais elles induisent également une augmentation modérée des taux de HDL-cholestérol (de 5 à 10%) *via* une diminution de l'activité de la CETP et une augmentation de l'activité des récepteurs PPAR- α [115]. Les fibrates, qui sont des agonistes des récepteurs PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor) régulant la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique, permettent de diminuer les taux de triglycérides et de LDL-cholestérol et d'augmenter les taux de HDL-cholestérol [116]. Une méta-analyse récente regroupant 18 études montre que le traitement avec les fibrates ne diminue pas la mortalité (toutes causes comprises) mais réduit l'incidence des principaux événements

cardiovasculaires [117]. L'agent pharmacologique permettant la plus forte augmentation des taux de HDL-cholestérol (jusqu'à 35%) est la niacine (ou acide nicotinique). Le Niaspan, qui correspond à une reformulation de la niacine à libération prolongée, est utilisé en association avec les statines et induit une régression de l'athérosclérose en augmentant les taux de HDL-cholestérol probablement *via* une diminution de l'expression de la CETP [118] [119].

➤ Le système rénine-angiotensine

Le système rénine-angiotensine comprend une cascade d'événements qui débute avec l'activation de la rénine sécrétée par les reins permettant la conversion de l'angiotensinogène en angiotensine I. L'angiotensine I, inactive, est ensuite convertie en un peptide actif, l'angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA). L'angiotensine II constitue l'élément actif du système dont les effets sont principalement médiés par les récepteurs de type I (AT1R) (**Figure 11**). L'angiotensine II est fortement impliquée dans le développement de l'athérosclérose en particulier en stimulant le stress oxydatif et donc l'oxydation des LDL. Ainsi, des inhibiteurs de l'ECA et des antagonistes des récepteurs AT1 sont utilisés pour réduire l'athérosclérose [120].

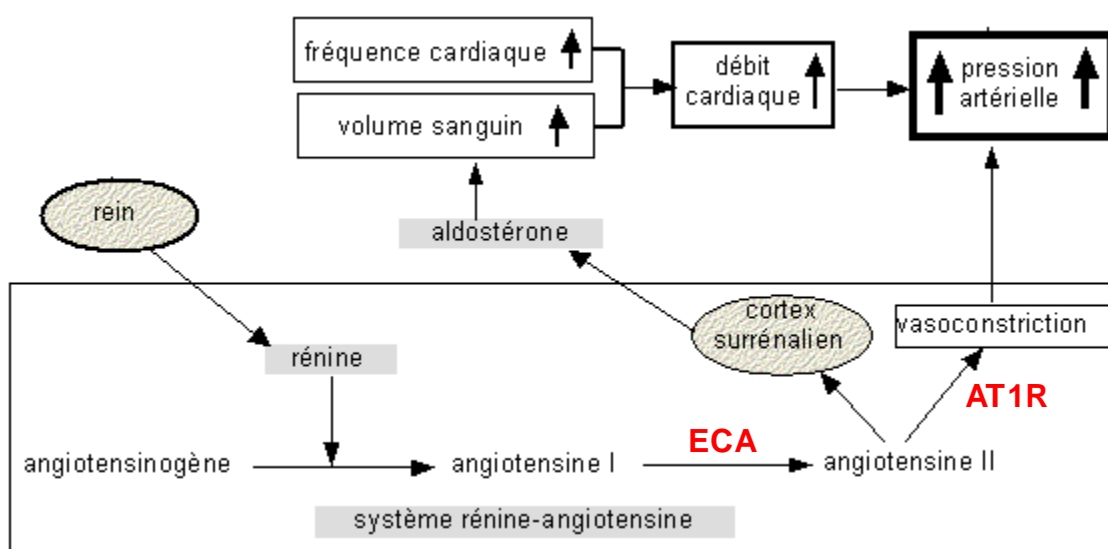


Figure 11 : Le système rénine-angiotensine.

En plus de leurs effets sur la modification des facteurs de risque tels que l'hyperlipidémie et l'hypertension, les nombreuses molécules utilisées en thérapie cardiovasculaire ont des propriétés anti-inflammatoires [121]. En effet, les inhibiteurs de l'ECA, les antagonistes de AT1R, les activateurs de PPAR- α semblent impliquer dans les processus inflammatoires. De même, l'action athéro-protectrice des statines peut aussi être

attribuée à ses propriétés anti-inflammatoires [122]. En effet, les patients traités avec des statines présentent une diminution des taux plasmatiques en CRP (C reactive protein, marqueur de l'inflammation) [123]. De plus, il a été montré que les statines ont un effet sur les fonctions des lymphocytes [124]. Les HDL, qui ont un rôle athéro-protecteur, ont également montré des effets anti-inflammatoires *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, la recherche de nouvelles thérapies ciblant l'inflammation est actuellement un domaine majeur d'investigation pour le traitement de l'athérosclérose [125].

II-4.2. Traitement des plaques d'athérosclérose évoluées : l'angioplastie

Le principal traitement de l'athérosclérose est l'angioplastie percutanée. Cette approche de cardiologie interventionnelle consiste à introduire dans l'artère un cathéter muni à son extrémité d'un ballonnet, de le placer en regard de la lésion, puis de le gonfler dans le but d'écraser la plaque d'athérome contre la paroi artérielle, permettant ainsi de rétablir le flux sanguin. La majorité des angioplasties sont réalisées avec pose d'un stent, petit ressort métallique permettant de prévenir le remodelage constrictif et le retour élastique de l'artère (**Figure 12**). Cependant, cette technique de dilatation mécanique de l'artère présente environ 5% d'échec. En effet, l'implantation de stent cause d'une part des thromboses nécessitant un traitement anti-plaquettaire de longue durée (6 mois à 2 ans) augmentant les risques d'hémorragie et d'autre part, la prolifération/migration anormale des CML venant à nouveau obstruer la lumière du vaisseau et responsable du processus de resténose. D'autres stratégies ont donc été développées pour limiter la resténose intra-stent (cf paragraphe III-4.).

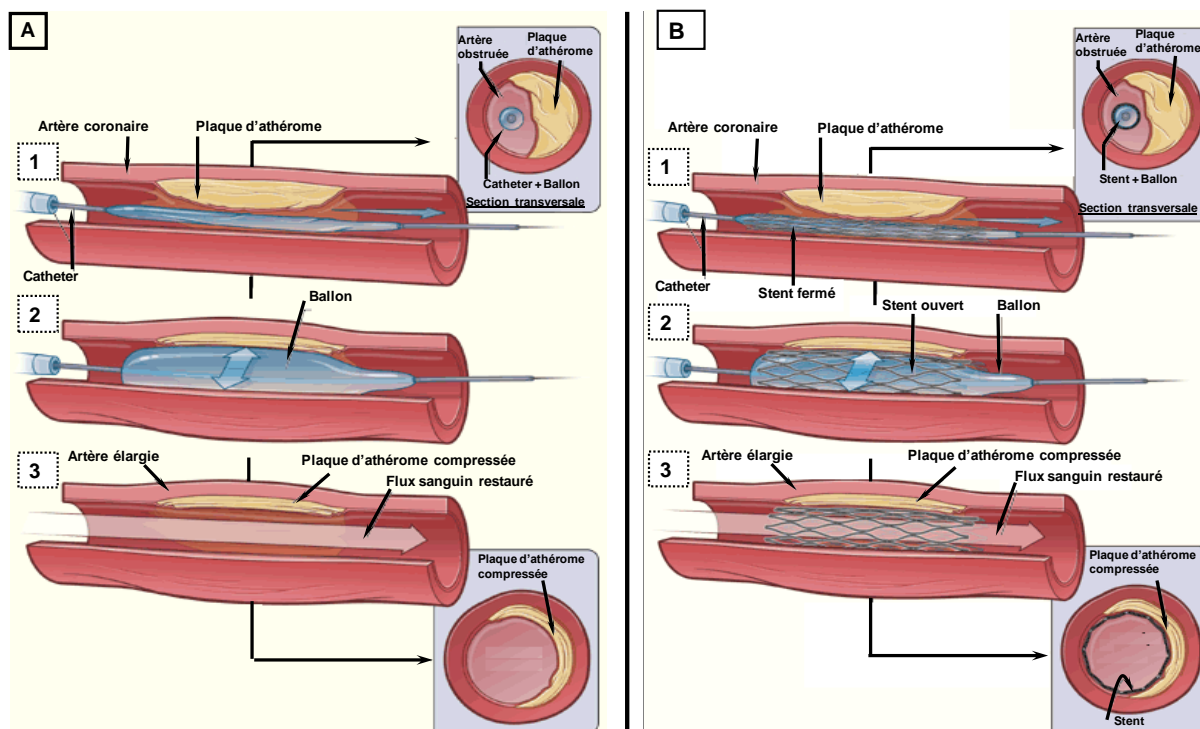


Figure 12 : L'angioplastie. A, simple au ballonnet ; B, l'angioplastie avec pose de stent. (D'après le site : http://www.nhlbi.nih.gov/health/dci/Angioplasty/Angioplasty_WhatIs.html).

III- Complication de l'athérosclérose : la resténose

Le principal traitement de l'athérosclérose est l'angioplastie qui consiste à introduire dans l'artère un cathéter muni à son extrémité d'un ballonnet qui est gonflé afin d'écraser la plaque d'athérome contre la paroi et rétablir ainsi la circulation sanguine. Dans 90% des cas, l'angioplastie est réalisée avec pose d'un stent afin d'éviter le retour élastique de l'artère. La principale limite de cette technique est la survenue d'un nouveau rétrécissement de la lumière du vaisseau dans les six mois après l'intervention. Ce phénomène, appelé resténose, est dû en partie à la lésion vasculaire et à la dénudation de l'endothélium engendrées par la pose du stent qui déclenchent des processus inflammatoires et conduisent à la prolifération et la migration des CML responsables d'une nouvelle hyperplasie intimale.

III-1. Physiopathologie de la resténose : généralités

La resténose représente la complication majeure du traitement de l'athérosclérose par angioplastie avec ou sans pose de stent. Il existe deux mécanismes principaux de la resténose : l'hyperplasie intimale et le remodelage constrictif. Le remodelage constrictif correspond à une adaptation du vaisseau aux nouvelles conditions suite à l'insertion dans l'artère d'un

ballonnet. Il est associé à une modification de la vasomotricité des cellules endothéliales, à une augmentation de l'expression de marqueurs contractiles comme la SM α -actine (smooth muscle α -actin) et de protéines de la MEC (collagène, fibronectine), et se caractérise notamment par une fibrose de l'adventice mais les mécanismes mis en jeu sont peu connus [126]. L'hyperplasie intimale joue un rôle central dans la resténose intra-stent alors qu'elle ne participe qu'à 10% de la resténose après angioplastie au ballonnet, et correspond à la migration/prolifération des CML venant obstruer à nouveau l'artère. En plus d'écraser la plaque d'athérome, la conséquence immédiate de l'implantation d'un stent est la dénudation de l'endothélium. Une couche de plaquettes et de fibrine se dépose alors au niveau de la lésion conduisant à la formation d'un thrombus. Les plaquettes activées expriment des molécules d'adhésion entraînant le recrutement des leucocytes qui s'infiltrent dans la paroi vasculaire guidés par un gradient de chimiokines sécrétées par les CML et les macrophages résidents. Les facteurs de croissance et les chimiokines libérés par les plaquettes, les leucocytes et les CML stimulent la migration des CML de la media vers l'intima où elles prolifèrent et produisent des composants de la matrice aboutissant à l'hyperplasie intimale. La néointima formée est donc essentiellement composée de CML, de matrice et de macrophages [127] [128] (**Figure 13**). Des stents délivrant des substances (DES, drug eluting stents) capables d'inhiber l'hyperplasie intimale ont été développés et ont permis de réduire la resténose. Cependant, ces stents dits « actifs » n'améliorent pas le pronostic à long terme en termes de survie en comparaison des stents « nus » (BMS, bare metal stents). D'autres stratégies thérapeutiques sont actuellement envisagées pour lutter contre la resténose (cf paragraphes III.4.2. et III.4.3.).

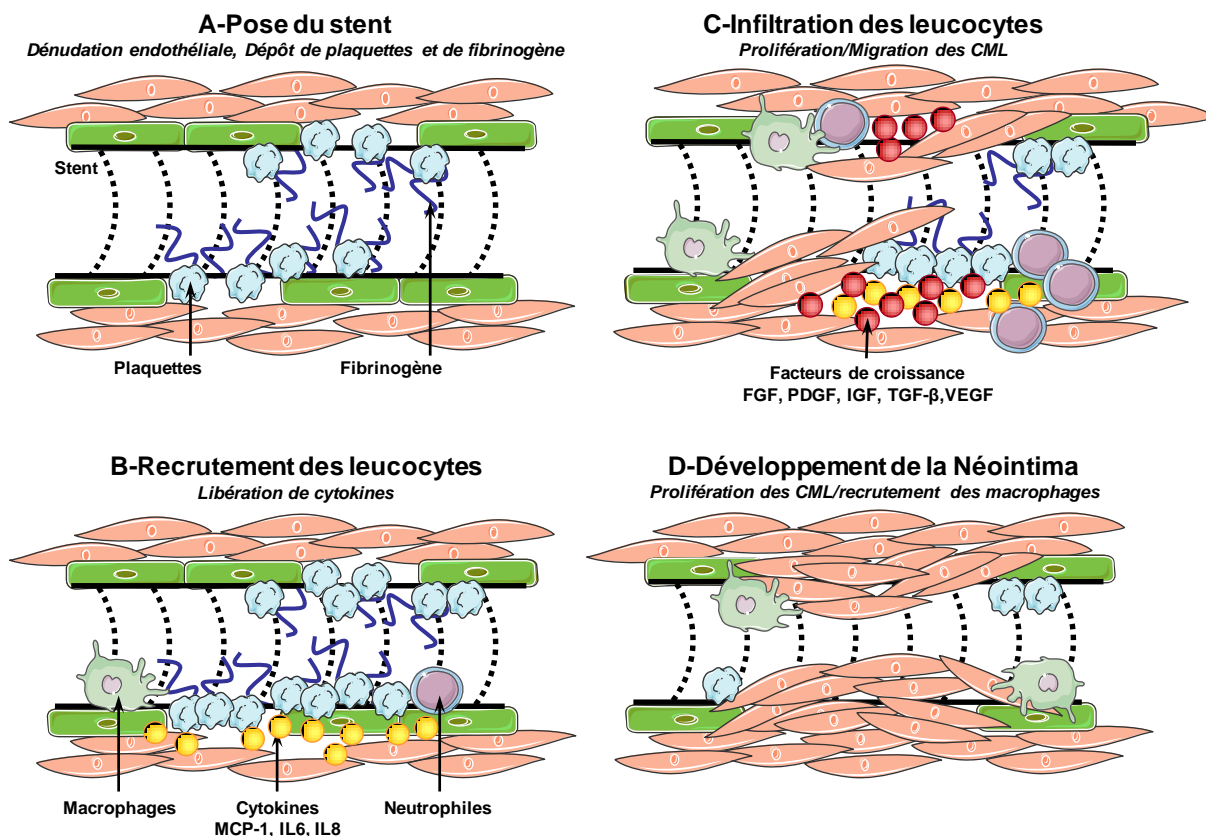


Figure 13 : Mécanismes de la resténose. (D'après, Costa, M.A., Circulation, 2005) [127]

III-2. Modèles animaux d'étude de la resténose

Tous les modèles animaux de resténose sont basés sur une lésion de la paroi artérielle qui entraîne un processus de remodelage vasculaire. Les modèles d'étude de la resténose sont réalisés dans différentes espèces, comme les rongeurs (souris, rat, lapin), le porc ou encore le singe. Les méthodes utilisées pour léser le vaisseau incluent des techniques mécaniques, chimiques, thermiques ou de ligature du vaisseau [129].

Historiquement, les premiers modèles d'étude de la resténose ont été développés chez le lapin et le rat. L'artère iliaque de lapins hypercholestérolémiques constitue un des modèles les plus utilisés. En général, le régime riche en cholestérol est suivi d'une lésion mécanique de l'artère à l'aide d'un cathéter conduisant à la dénudation de l'endothélium. Après 4 à 6 semaines et si la lésion est suffisante, une deuxième lésion mécanique est réalisée. De nombreuses études sont également réalisées chez le rat. L'endothélium de la paroi vasculaire est lésé par l'introduction d'un ballon dans l'artère carotide du rat qui est ensuite gonflé. Le ballonnet est ensuite retiré et l'artère ligaturée.

Différents modèles murins ont ensuite été développés. La souris représente en effet un modèle peu coûteux, facile d'utilisation, qui se reproduit rapidement et permet la manipulation de gènes. Par contre, la petite taille des artères de souris rend les manipulations de lésions artérielles difficiles d'un point de vue technique. Différentes méthodes de lésions sont utilisées chez la souris comprenant principalement des lésions mécaniques avec un guide et de ligature du vaisseau [130] [131]. Selon le modèle utilisé, les mécanismes cellulaires engendrés sont différents comme résumé dans le **Tableau 5**. Il est également important de noter que le fond génétique influence la réparation vasculaire en réponse à une lésion. Ainsi, les souris C57Bl/6J sont par exemple résistantes à l'hyperplasie intimale dans la carotide suite à la dénudation mécanique de l'endothélium. Par contre, ces souris présentent une hyperplasie intimale importante en absence du gène ApoE.

Le modèle de ligature de la carotide se caractérise par une altération du flux sanguin et des forces de cisaillement conduisant à la formation d'une néointima riche en CML après 2 à 4 semaines [132]. Plus récemment, Roque *et al.* ont développé un modèle murin de lésion dans l'artère fémorale à l'aide d'un guide d'angioplastie qui induit la formation d'une néointima observable à partir de 8 jours et significative à 14 jours ; la réparation endothéliale est complète 3 semaines après la lésion [133]. Ce modèle présente de nombreux avantages : hyperplasie intimale importante, mortalité réduite en comparaison du modèle de ligature de la carotide, réponse inflammatoire précoce impliquant les neutrophiles comme observé dans la pathologie humaine (**Tableau 5**). De plus, ce modèle est de loin le plus physiopathologique en comparaison des modèles de lésions chimiques ou de ligature de vaisseau. Par contre, cette méthode est plus difficile d'un point de vue technique.

Enfin, en fonction de la taille du guide utilisé, il est possible chez la souris de réaliser des lésions carotidiennes superficielles ou profondes permettant de visualiser respectivement la régénération endothéliale uniquement ou la régénération endothéliale et l'hyperplasie intimale. Dans l'artère fémorale, l'observation de ces deux mécanismes dépend du temps après réalisation de la lésion : à partir de 3 à 5 jours pour la réendothélialisation, 14 à 28 jours pour l'hyperplasie intimale.

	Lésion mécanique artère carotide	Lésion mécanique artère fémorale	Ligature
Dénudation endothéliale	++	++	-
Altération du flux sanguin	-	-	+++
Thrombose	+	+	+
inflammation	-	++	+
Néointima	-/+	+++	+++
Difficultés de manipulation	+++	+++	+
Relevance physiologique	+	+	-

Tableau 5 : Les différents modèles de lésion artérielle chez la souris.

Bien que le modèle murin présente de nombreux avantages, l'anatomie et la physiologie des artères de souris sont très différentes de celles de l'Homme. Afin de reproduire le plus fidèlement possible la pathologie humaine, des modèles porcins de resténose ont été développés. Chez le porc, les lésions sténosantes sont induites dans l'artère fémorale, carotide, coronaire ou dans l'aorte. Dans le modèle de lésion de la carotide, la dénudation endothéliale est réalisée par l'introduction, à partir de l'artère fémorale, d'un cathéter muni d'un ballonnet dans l'artère carotide. Le ballonnet est gonflé trois à quatre fois pour léser l'endothélium. Le modèle de lésion de l'artère coronaire présente l'avantage d'utiliser les mêmes guides que ceux servant à l'angioplastie chez l'Homme. De plus, une angioplastie au ballon ainsi qu'une pose de stent peuvent être réalisées et entraînent des lésions plus profondes favorisant l'hyperplasie intimale. Dans ce modèle, la réponse néointimale est similaire à celle observée chez l'Homme en termes de taille et de densité cellulaire [134].

Chez l'Homme, l'implantation d'un stent est suivie d'une dénudation de l'endothélium qui déclenche les processus inflammatoires pour aboutir finalement à l'hyperplasie intimale caractérisant la resténose. L'angioplastie simple implique également le retour élastique de l'artère et le remodelage constrictif. Aucun modèle animal ne permet de reproduire fidèlement toutes ces étapes observées chez l'Homme et chaque modèle présente des avantages et des inconvénients (**Tableau 6**).

Homme	Souris (artère fémorale)	Rat (artère carotide)	Lapin (artère iliaque)	Porc (artère coronaire)
<u>Dommages artérielles</u>				
- Dénudation endothéliale	+	+	+	+
- Lésion de la media	-	-	+	+
<u>Thrombus</u>	+	-	+	+
<u>Inflammation</u>	+	-	+	+
<u>Néointima</u>	+	+	+	+
<u>Remodelage constrictif</u>	-	-	+	+

Tableau 6 : Comparaison des différents modèles animaux de resténose avec la pathologie humaine.

Bien que la souris constitue un modèle pratique d'utilisation et apporte de nombreuses données concernant les mécanismes mis en jeu lors de la resténose, l'artère coronaire de porc représente actuellement le modèle le plus proche de la pathologie humaine d'un point de vue anatomique, physiologique et physiopathologique. De plus, ce modèle présente une néointima importante en réponse à la lésion et permet l'utilisation des mêmes outils que ceux appliqués chez l'Homme.

Enfin, le type de vaisseau semble également important. Ainsi, contrairement aux artères élastiques (aorte, carotides, artères iliaques), les vaisseaux de type musculaire comme les artères coronaires et fémorales permettent la formation de lésions plus importantes et contenant de nombreuses CML.

III-3. Mécanismes cellulaires

Le processus de resténose met en jeu des mécanismes communs avec l'athérosclérose comme la dysfonction endothéliale, le recrutement des monocytes et la prolifération/migration des CML mais présente également des caractéristiques qui lui sont propres que nous détaillerons dans les parties suivantes.

III-3.1.L'endothélium

Le déploiement du ballon ou du stent induit immédiatement une dénudation de l'endothélium ou déendothélialisation. Comme décrit précédemment (cf paragraphe I-1.), l'intégrité de l'endothélium est essentielle au maintien de l'homéostasie vasculaire et permet d'éviter le contact entre les substances thrombogènes et le sang circulant. Les produits des

cellules endothéliales inhibent en effet les fonctions plaquettaires et la thrombose, contrôlent la perméabilité vasculaire et inactivent des facteurs de croissance inhibant ainsi la prolifération des CML. Le NO produit par les cellules endothéliales non lésées permet en particulier de diminuer les processus inflammatoires et inhibe la prolifération/migration des CML. Ainsi, l'expression de la eNOS (endothelial nitric oxide synthase) par transfert de gène dans l'artère carotide déendothélialisée chez le rat restaure la production de NO et inhibe la formation de la néointima de 70% 14 jours après la lésion [135]. Le VEGF (vascular endothelial growth factor), qui stimule la prolifération des cellules endothéliales et représente un puissant régulateur de la perméabilité vasculaire, a montré un rôle dans la régénération endothéliale et la réduction de la formation de la néointima associée dans des modèles de lésion induite chez le rat et le lapin [136] [137] [138]. Cependant, le rôle du VEGF dans ces processus est controversé. En effet, le VEGF induit aussi la migration et l'activation des monocytes [139], l'expression de chimiokines comme MCP-1 [140], et semble jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose [141]. De plus, l'expression du VEGF et de ses deux récepteurs (VEGFR-1 et VEGFR-2) est augmentée après implantation d'un stent chez le porc [142]. Ohtani *et al.* montrent que l'inhibition du VEGF endogène conduit à une diminution de l'inflammation dans les phases précoces et à une réduction de la formation de la néointima chez le rat, le lapin et la souris [143]. Les études montrant un rôle du VEGF dans l'inhibition de la resténose utilisent du VEGF recombinant pouvant expliquer les différences de résultats avec Ohtani *et al.* et suggérant un mécanisme d'action différent entre le VEGF endogène et exogène.

Bien que les dommages endothéliaux ne semblent pas toujours associés à la formation de la néointima [144], la dénudation de l'endothélium suite à l'implantation d'un stent contribue de façon importante à l'épaississement intimal. De nombreuses études montrent que la réendothélialisation de la paroi vasculaire lésée diminue l'hyperplasie intimale. Ainsi, Walter *et al.* montrent que le traitement avec les statines conduit à une augmentation du nombre d'EPC et de la réendothélialisation associée à une diminution de l'hyperplasie intimale chez le rat [145]. De plus, l'injection intraveineuse d'EPC différenciées *in vitro*, à des souris dont l'endothélium de la paroi carotidienne a été lésé, induit une augmentation de la réendothélialisation et une diminution de l'hyperplasie intimale [146]. George *et al.* ont évalué le rôle des EPC dans la resténose intra-stent chez l'Homme. Une diminution du nombre d'EPC circulantes est observée chez les patients présentant une resténose intra-stent qui pourrait contribuer à la prolifération cellulaire excessive observée chez ces patients [23]. Chez le porc, le nombre de cellules endothéliales progénitrices CD133⁺ est fortement

augmenté dans la néointima dans les premiers jours suivant l'implantation d'un stent nu [147]. De plus, Inoue *et al.* montrent que le nombre d'EPC est augmenté suite à une angioplastie simple au ballonnet ou avec un stent nu alors qu'il est fortement diminué après le déploiement d'un stent actif. Dans cette étude, les auteurs indiquent que les stents actifs inhibent la mobilisation et la différenciation des cellules de la moelle osseuse et agissent donc non seulement sur les cellules endothéliales au niveau local, mais aussi à distance sur les progéniteurs [148]. Ainsi, contrairement aux données obtenues dans les modèles d'athérosclérose, le rôle bénéfique des EPC dans la resténose semble clairement identifié. Ces cellules progénitrices en participant à la réendothélialisation pourraient prévenir non seulement de la resténose intra-stent, mais aussi des thromboses de stent (cf paragraphe III.4.1.) (Figure 14).

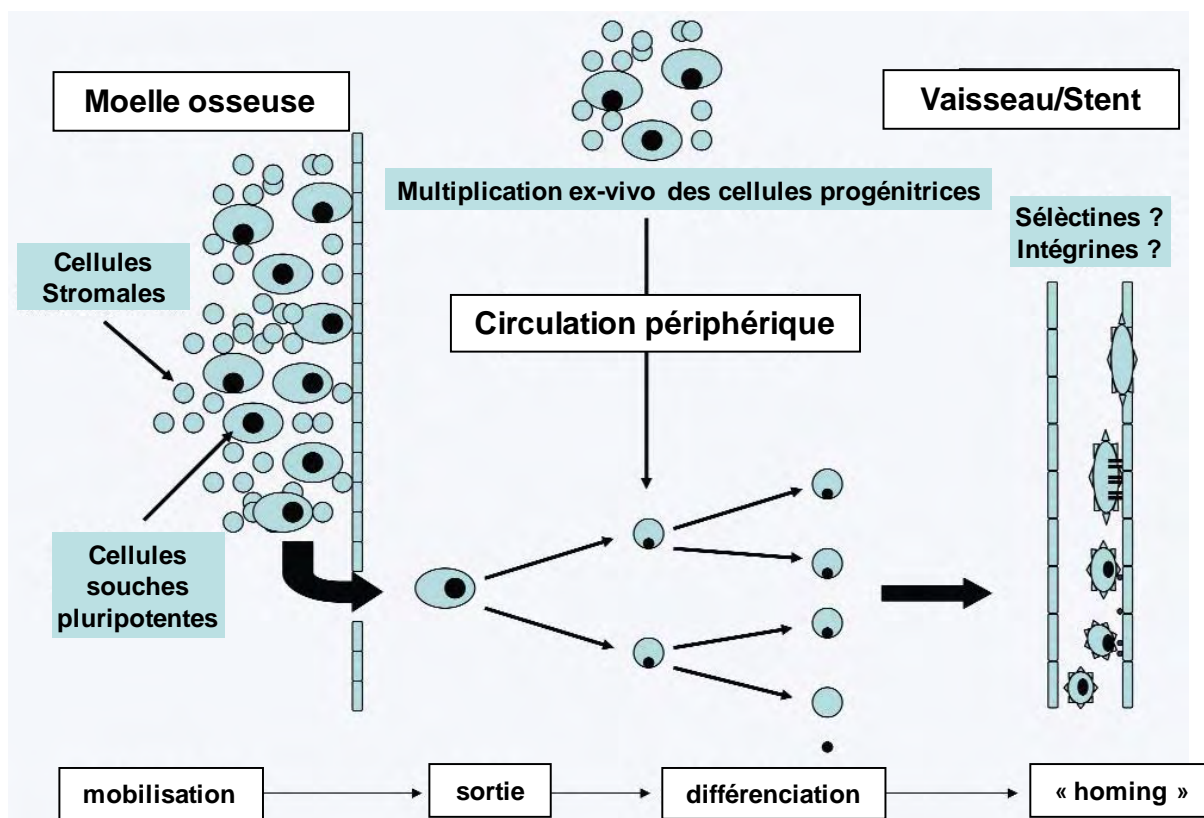


Figure 14 : Cellules endothéliales progénitrices et réendothélialisation. L'injection d'EPC ainsi que la mobilisation des EPC endogènes conduisent à une augmentation de la réendothélialisation dans de nombreux modèles de dénudation endothéliale. (D'après Werner, N., 2006, *J Cell Mol Med*) [27]

III-3.2. Inflammation

L'inflammation joue un rôle central dans le processus de resténose. Les plaquettes et les macrophages sont des acteurs majeurs de la formation de la néointima. De nombreuses études montrent une augmentation des marqueurs de l'inflammation après une angioplastie [149].

Afin d'évaluer l'inflammation suite à la pose d'un stent, Fukuda *et al.* mesurent le nombre de monocytes circulants dans le sang périphérique et montrent une corrélation positive entre le nombre de monocytes et le volume de la néointima [150].

La première étape suite à l'implantation d'un stent se caractérise par l'adhésion des plaquettes et un dépôt de fibrine à la surface de l'endothélium lésé. A la surface du vaisseau lésé, les plaquettes expriment des molécules d'adhésion comme la P-sélectine qui se lie à son récepteur PSGL-1 exprimé par les leucocytes, permettant ainsi d'initier l'adhésion et le « rolling » des leucocytes. Ainsi, l'inhibition de la P-sélectine à l'aide d'un anticorps réduit la formation de la néointima de 40% dans un modèle de lésion induite par angioplastie chez le rat [151]. De même, l'inhibition de la P-sélectine conduit à une diminution de l'interaction précoce entre les plaquettes et les leucocytes et de l'épaississement intimal chez le porc [152]. Les leucocytes adhèrent ensuite fermement au vaisseau *via* l'expression de molécules de la famille des intégrines telles que Mac-1, LFA-1 qui se lient aux récepteurs présents à la surface des plaquettes comme ICAM-1, la glycoprotéine Ib α (GPIb α) et par le cross-linking du fibrinogène avec son récepteur GPIIb/IIIa [153]. Mac-1 est exprimé à la surface des monocytes et des neutrophiles et joue un rôle central dans l'hyperplasie intimale. L'absence de Mac-1 ou son inhibition à l'aide d'un anticorps monoclonal réduit la formation de la néointima dans un modèle murin d'angioplastie avec ou sans stent [154] [155]. Chez l'Homme, l'expression et l'activation de Mac-1 sont fortement augmentées 24h après l'implantation d'un stent et maximales à 48h [156]. Les leucocytes migrent ensuite à travers la couche de plaquettes et de fibrine guidés par un gradient de chimiokines sécrétées par les CML et les leucocytes résidents pour arriver dans l'intima (**Figure 15**).

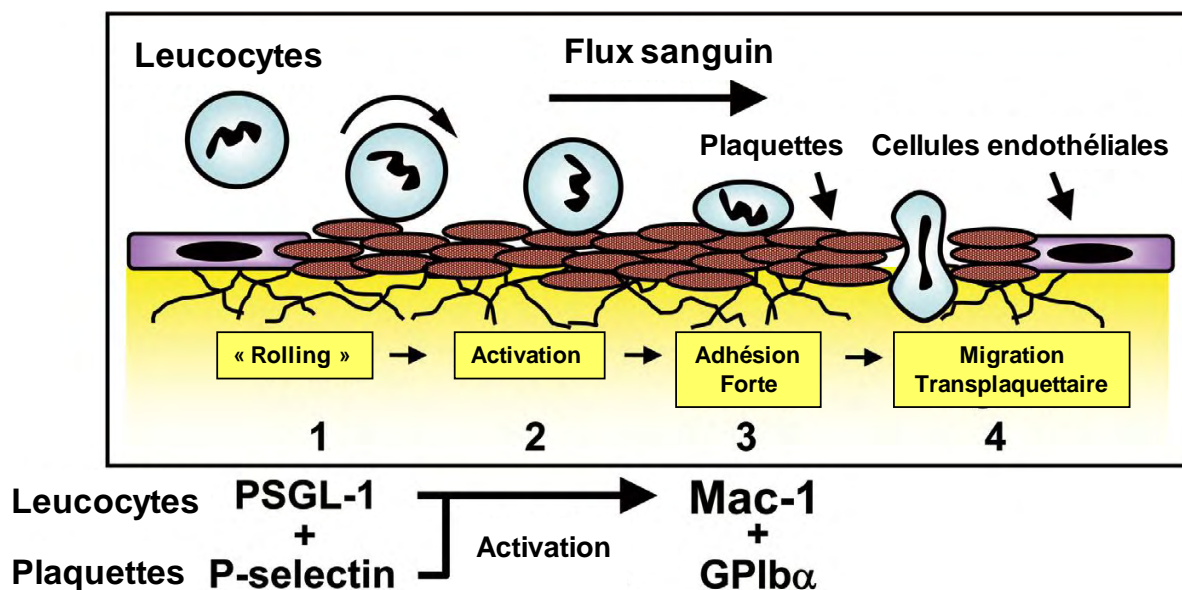


Figure 15 : Transmigration des leucocytes à travers la couche de plaquettes. A la surface de l'endothélium lésé, les plaquettes se déposent en couche. Le recrutement primaire et le « rolling » des leucocytes sont dépendants des sélectines puis Mac-1 stimule l'adhésion forte des leucocytes à la couche plaquettaire, permettant ensuite leur migration dans l'intima guidée par les chimiokines. (D'après Inoue, T., *Circulation Journal*, 2009) [128]

Les chimiokines, en particulier MCP-1, jouent un rôle central dans la formation de la néointima. MCP-1, sécrété par les plaquettes, stimule l'infiltration des leucocytes. L'expression de MCP-1, qui est faible dans la paroi artérielle saine, est augmentée de façon importante dans les cellules endothéliales et les CML après une angioplastie au ballonnet [157] et les taux plasmatiques de MCP-1 restent élevés chez les patients qui développent une resténose [158]. De même, suite à l'implantation d'un stent chez l'Homme, les taux de MCP-1 dans le plasma augmentent et sont retrouvés élevés après six mois chez les patients développant une resténose [159]. L'augmentation de l'expression de MCP-1 a également été observée par immunohistochimie sur des échantillons issus de patients présentant une resténose [160]. L'inhibition du récepteur de MCP-1 (CCR2) avec un anticorps conduit à une diminution de la formation de la néointima chez le singe [161]. De même, dans un modèle murin de lésion de l'artère fémorale, la déficience en CCR2 réduit l'hyperplasie intimale d'environ 60% [162]. Plusieurs travaux utilisant une forme tronquée de MCP-1 démontrent également le rôle majeur de cette chimiokine dans l'hyperplasie intimale dans différents modèles de lésions artérielles chez la souris, le lapin, le singe [163] [164]. De plus, la déficience en CCR2 réduit également la formation de la néointima en condition d'hyperlipidémie dans un modèle de lésion chez les souris ApoE^{-/-} [165]. Plus récemment,

l'inhibition locale de MCP-1 a montré son efficacité dans la resténose intra-stent chez le lapin et le singe *via* un stent recouvert d'un polymère contenant un plasmide portant une forme tronquée de MCP-1 [166]. De plus, nous le verrons dans la partie suivante (cf paragraphe III.3.3.), MCP-1 est également capable de moduler les fonctions des CML.

Le rôle des lymphocytes dans la formation de la néointima est peu documenté. Des travaux suggèrent néanmoins un rôle protecteur des lymphocytes. Suite à une lésion artérielle, les souris Rag1^{-/-} et Rag2^{-/-} déficientes en lymphocytes présentent une augmentation de la formation néointima qui peut être réduite par un transfert de cellules T ou de cellules B [167] [168] [169]. A l'inverse, Boehm *et al.* ont montré que les souris Rag^{-/-} présentent un ratio intima/media réduit par rapport aux souris Rag^{+/+} suite à une lésion artérielle [170].

Peu de données existent également concernant le rôle des neutrophiles dans le processus de resténose. Des études cliniques indiquent une association entre l'activation des neutrophiles et la resténose [171] [172]. Welt *et al.* montrent l'importance des neutrophiles dans la resténose post-angioplastie [173]. L'adhésion des neutrophiles aux plaquettes activées dépend de l'activation de l'intégrine β 2 Mac-1 et de GPI-80 (glycosyl-phosphatidyl-inositol-anchored protein), un modulateur de Mac-1 à la surface des neutrophiles, qui est impliqué dans la régulation de l'adhésion et de la transmigration des neutrophiles dépendantes de Mac-1. De plus, les neutrophiles *via* la myeloperoxydase sont responsables de la production de ROS. Inoue *et al.* montrent que chez l'homme, l'activation des neutrophiles dépendante de Mac-1 suite à l'implantation d'un stent joue un rôle majeur dans les processus inflammatoires en induisant la production de ROS impliqués dans la formation de la néointima [174]. La production de ROS par la NADPH oxydase joue en effet un rôle important dans l'hyperplasie intimale [175]. Chez l'Homme, les processus inflammatoires et notamment le nombre de neutrophiles sont plus importants après une implantation de stent que suite à une angioplastie au ballonnet seul [176]. Chez l'animal, il existe également des différences de réponse inflammatoire entre les deux types d'angioplastie. Suite à une angioplastie simple, les neutrophiles prédominent alors que l'infiltration des macrophages est majoritaire dans le processus de resténose intra-stent. Ceci peut s'expliquer par une différence dans l'expression des chimiokines spécifiques des monocytes (MCP-1) et neutrophiles (IL-8) entre les deux modèles [177]. Ainsi chez le singe, l'inhibition spécifique de l'infiltration des monocytes par l'inhibition de CCR2 diminue la resténose intra-stent alors que l'inhibition combinée des monocytes et des neutrophiles est nécessaire pour réduire l'hyperplasie intimale induite par une angioplastie simple [161].

Dans les modèles animaux, l'implantation d'un stent induit donc une réponse inflammatoire qui se caractérise au début par le recrutement et l'activation de nombreux monocytes et neutrophiles. Les macrophages s'accumulent dans la néointima dans les jours suivants. Les cellules inflammatoires produisent des ROS, des facteurs de croissance, des chimiokines et des protéases capables de dégrader la matrice et de stimuler la prolifération/migration des CML, l'ensemble de ces éléments participant à un épaississement intimal.

III-3.3. CML

Les CML sont les acteurs majeurs du processus de resténose intra-stent. Les cytokines, chimiokines et facteurs de croissances libérés par les plaquettes, les leucocytes et les CML elles-mêmes conduisent, comme dans l'athérosclérose, à la modulation phénotypique des CML qui migrent dans l'intima où elles prolifèrent et sécrètent de nombreux composants de la matrice aboutissant à l'hyperplasie intimale. L'hyperplasie intimale constitue le mécanisme majeur caractérisant la resténose.

Parmi les facteurs de croissance, le PDGF et le bFGF (basic fibroblast growth factor) jouent un rôle majeur sur les CML de la media, en stimulant non seulement la prolifération de ces cellules mais aussi leur migration. Ainsi, le PDGF et le bFGF sont par exemple capables de stimuler la migration de CML aortiques de singe [178]. Chez le rat, les lésions intimales développées suite à l'insertion d'un ballonnet dans l'artère carotide, sont inhibées par un anticorps polyclonal dirigé contre le PDGF [179]. En accord avec ses résultats, l'injection de PDGF recombinant augmente de façon importante l'épaississement néointimal [180]. Le PDGF ainsi que ses deux récepteurs (PDGFR- α et PDGFR- β) ont été identifiés dans les artères coronaires humaines après une angioplastie au ballonnet [181]. L'administration de bFGF stimule la prolifération de CML issues d'artères lésées et augmente la formation de la néointima mais n'a pas d'effet sur les CML d'artères intactes [182]. De plus, l'administration combinée d'anticorps anti-PDGF et anti-bFGF conduit à une inhibition d'environ 80% de l'épaississement intimal [183].

En plus de son rôle dans le recrutement des cellules inflammatoires, MCP-1 semble agir directement sur les CML. Spinetti *et al.* ont montré que l'expression de MCP-1 et de son récepteur CCR2 augmentent avec l'âge chez le rat [184]. Bien que des études antérieures aient montré un rôle négatif de MCP-1 dans la prolifération des CML [185], de nombreux travaux montrent que cette chimiokine est capable de stimuler la migration et la prolifération des CML aortiques de rat [184] [186] [187] [188]. Dans les CML humaines, MCP-1 stimule

également la prolifération *via* l'activation du facteur de transcription AP-1 (activator protein-1), mais également la production d'IL-6 par ces cellules en induisant l'activation de NF- κ B (nuclear factor- κ B) [189] [190]. Enfin, l'augmentation de l'expression de MCP-1 observée dans la paroi artérielle lésée (cf paragraphe précédent III-3.2.) peut être stimulée *in vitro* dans les CML par le PDGF [191]. Le PDGF induit une accumulation de MCP-1 en stimulant non seulement la transcription des ARNm de MCP-1 mais également en augmentant leur stabilité *via* l'activation d'un inhibiteur soluble de RNase [192] [193].

De nombreuses études indiquent donc un rôle direct de MCP-1 sur les CML. Cependant, l'expression de CCR2 dans ces cellules est controversée. Ainsi, certains travaux rapportent la présence de CCR2 dans les CML humaines vasculaires [194] [190]. En revanche, d'autres études indiquent que CCR2 n'est pas exprimé par les CML humaines et murines, suggérant un rôle de cette chimiokine indépendamment de CCR2 dans les CML [195, 196]. Ces différences de résultats obtenus *in vitro* peuvent s'expliquer par les différentes techniques utilisées pour isoler les CML aortiques. Ainsi, Viedt *et al.* utilisent la méthode d'explants [190] alors que Schechter *et al.* isolent les CML par digestion enzymatique de la média à la collagénase [195]. De plus, l'hétérogénéité des CML, qui présentent des phénotypes différenciés différents dans la paroi vasculaire, peut être à l'origine de ces différentes observations. Enfin, l'expression du CCR2 est certainement transitoire et finement régulée dans certaines conditions puisque elle augmente avec l'âge et peut augmenter en conditions pathologiques [184].

L'apoptose des CML de la media joue un rôle important dans la resténose. L'angioplastie conduit rapidement à une apoptose des CML dans différents modèles expérimentaux (rat, lapin, porc) qui est corrélée à l'intensité de la lésion et précède le pic de prolifération [197]. Dans un modèle d'angioplastie chez le lapin, l'inhibition de l'apoptose précoce des CML avec un inhibiteur de caspases réduit la formation de la néointima de 30% quatre semaines après la lésion [198]. L'apoptose des CML de la media constituerait un signal pour le recrutement des SPC *via* la chimiokine SDF-1 α et son récepteur CXCR4 [199].

Depuis quelques années, des études suggèrent un rôle des cellules progénitrices dans le processus de resténose. Ainsi, dans un modèle murin de dénudation mécanique endothéliale, Sata *et al.* montrent qu'environ 60% des CML de l'intima dérivent de cellules de la moelle osseuse [112]. La chimiokine SDF-1 α (ou CXCL12) est particulièrement impliquée dans la migration des cellules progénitrices. Suite à une lésion de la carotide, le traitement de souris ApoE^{-/-} avec un anticorps neutralisant anti-SDF-1 α pendant trois semaines réduit l'épaisseur de la néointima de 45% par rapport aux animaux contrôles *via* la régulation du contenu en

CML dans l'intima [200]. Zerneck *et al.* montrent que l'expression de SDF-1 α dans les CML est précédée de l'apoptose de ces cellules et que cette chimiokine stimule le recrutement des SPC participant à la néointima [201]. Après une lésion artérielle, l'expression de SDF-1 α dans le plasma ainsi que dans la media et à la surface des plaquettes est fortement augmentée, suggérant le recrutement suite à une lésion des SPC qui participent alors à la formation de la néointima [199]. Ainsi, alors que les SPC joueraient un rôle bénéfique dans l'athérosclérose en favorisant la stabilité de la plaque, il semble que ces cellules progénitrices participent à la formation de la néointima dans la resténose.

Le dépôt de matrice constitue, avec la prolifération/migration des CML, un élément essentiel du processus de resténose. Dans la néointima, la matrice est produite par les CML. Plusieurs études *in vitro* ont montré que différents facteurs, comme le PDGF, l'angiotensine II, le TGF β , stimulent la production de matrice par les CML [202]. Dans un modèle de lésion de la carotide de rat, l'inhibition du récepteur de type I de l'angiotensine II réduit la formation de la néointima *via* l'inhibition de la production de matrice [203]. Les MMP en dégradant la matrice favorisent la prolifération et la migration des CML. En particulier, l'expression de la MMP-2 et de la MMP-9 est augmentée dans différents modèles de lésion vasculaire. Le PDGF est également capable de stimuler la sécrétion de MMP-9 par les CML [204]. La déficience en MMP-9 chez la souris conduit à une accumulation de collagène mais aussi à une diminution de la migration des CML entraînant finalement une réduction dans la formation de la néointima [205]. Le rôle de la matrice dans la resténose est donc complexe puisque, d'une part le dépôt de matrice dans la néointima favorise l'épaississement intimal et d'autre part, sa dégradation par les MMP stimule la prolifération/migration des CML responsables de l'hyperplasie intimale.

III-3.4. Conclusion

Les mécanismes de la resténose présentent des différences et des similitudes avec la pathologie de l'athérosclérose. Ainsi, bien que les mécanismes moléculaires mis en jeu soient différents, les deux pathologies débutent par une dysfonction de l'endothélium qui engendre des processus inflammatoires participant à la prolifération/migration des CML. En particulier, l'inflammation et les chimiokines comme MCP-1 jouent, comme dans les lésions athéromateuses, un rôle central dans le processus de resténose. L'introduction en clinique de stents actifs a permis de réduire le phénomène de resténose en comparaison des stents « nus ». Cependant, le bénéfice à long terme n'est pas évident en termes de survie, dû à des

thromboses tardives observées chez les patients traités avec ce type de stent. Ainsi, il apparaît essentiel de continuer les recherches dans ce domaine. Les stratégies actuelles visent à diminuer l'hyperplasie intimale sans affecter la cicatrisation de l'endothélium.

III-4. Approches thérapeutiques pour le traitement de la resténose intra-stent

III-4.1. Les stents actifs de première génération

Dans le but de limiter la resténose intra-stent, des stents libérant progressivement et localement des substances anti-mitotiques visant à inhiber la prolifération des CML ont été développés. Les molécules anti-prolifératives ayant montré leur efficacité et actuellement utilisées sont la rapamycine (ou sirolimus) et le paclitaxel (ou taxol). La rapamycine se lie à un récepteur intracellulaire FKBP12 (FK506-binding protein 12). Le complexe ainsi formé se lie à la protéine mTOR (mammalian target of rapamycin) et inhibe son activité, empêchant ainsi la transition G1/S du cycle cellulaire (**Figure 16**) [127]. La protéine mTOR est une cible indirecte des PI3K (phosphoinositide 3-kinases) puisqu'elle est phosphorylée par la protéine Akt, dont l'activation est elle-même dépendante de la production de PIP₃ (phosphatidylinositol-3,4,5-*tris*phosphate) généré par les PI3K.

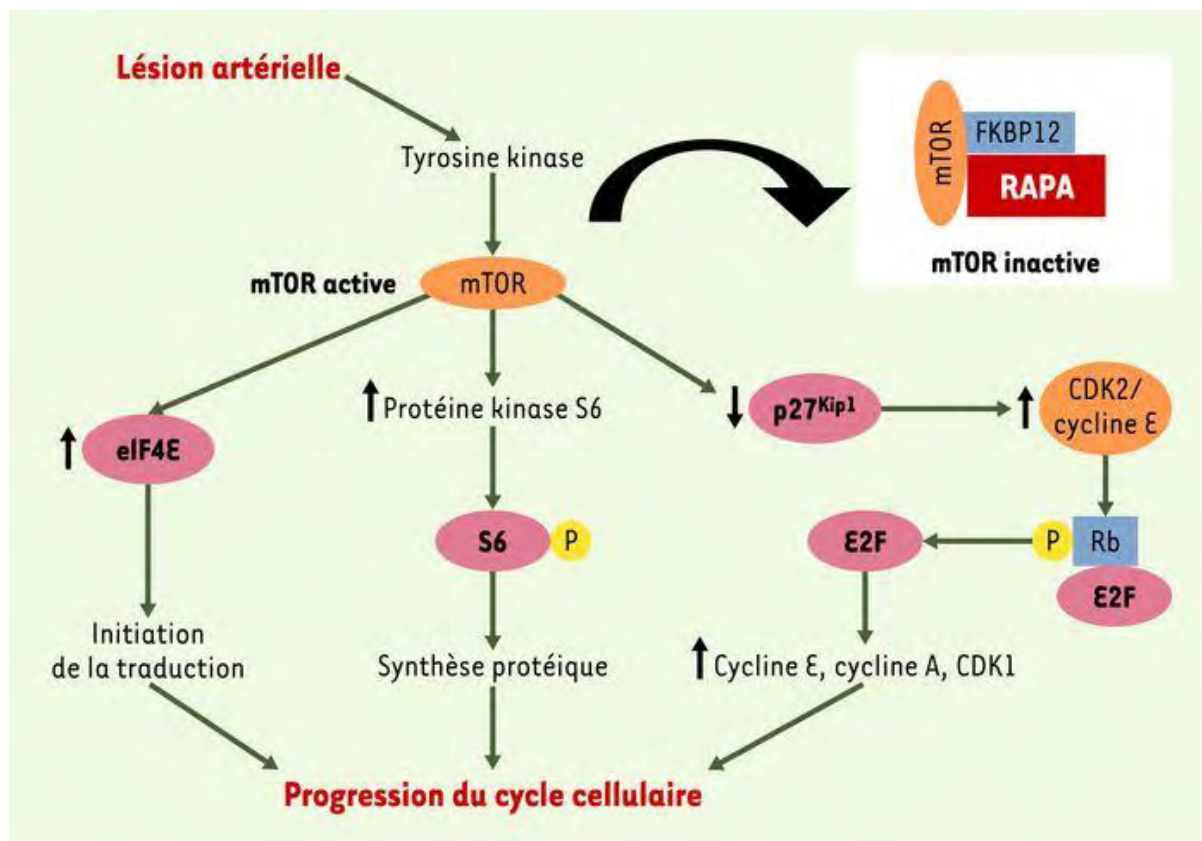


Figure 16 : Mécanisme d'action de la rapamycine. La protéine mTOR, cible de la rapamycine, est impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire. La protéine mTOR stimule l'activité de la protéine kinase S6 et du facteur d'initiation eucaryote 4E (eIF4E) impliqués dans l'initiation de la traduction et la synthèse protéique. La protéine mTOR induit également une inhibition de l'expression de la CKI p27^{Kip1} entraînant une augmentation de l'activité du complexe CDK2/cycline E et de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb) à l'origine de la libération du facteur de transcription E2F et de l'activation subséquente des gènes codant pour les cyclines. La rapamycine inhibe les activités dépendantes de mTOR et donc la transition G1/S du cycle cellulaire. (D'après Mazhigi M, 2004, Médecine et Sciences).

Le paclitaxel appartient à la famille des taxanes, agents antiprolifératifs utilisés dans le traitement du cancer. Le paclitaxel inhibe la prolifération cellulaire en inhibant le désassemblage des microtubules nécessaires à la transition G2/M du cycle cellulaire.

En comparaison des stents nus, les stents actifs, délivrant des substances antiprolifératives à partir de polymère de surface, réduisent efficacement l'hyperplasie néointimale [206]. Ainsi, l'introduction en clinique en 2002 des stents actifs a véritablement révolutionné la cardiologie interventionnelle. L'étude RAVEL publiée en 2002 montre qu'après 6 mois d'implantation, les stents libérant du sirolimus bloquent l'hyperplasie intimale et réduisent les événements cardiaques majeurs [207].

Cependant, le bénéfice des stents actifs en termes de mortalité n'est pas clairement établi et de nombreuses études sont en contradiction à ce sujet. Certaines données ne montrent

pas de différence entre les stents nus et les stents actifs en ce qui concerne la mortalité et l'infarctus du myocarde jusqu'à un suivi de quatre ans [208] [209]. Ainsi, bien qu'il soit nécessaire d'individualiser le rapport bénéfice/risque pour chaque patient, le profil de sécurité des stents actifs semble similaire à celui des stents nus. Toutefois, l'utilisation des stents actifs a été freinée par l'apparition de thrombose de stent très tardives, rare mais sévère après implantation du stent [210]. Les thromboses de stent précoces (< 1 mois) et tardives (1 mois à 1 an) surviennent avec la même fréquence après l'implantation d'un stent nu ou actif. Par contre, les thromboses de stent très tardives (> 1 an) surviennent plus fréquemment après la pose d'un stent actif (**Figure 17**).

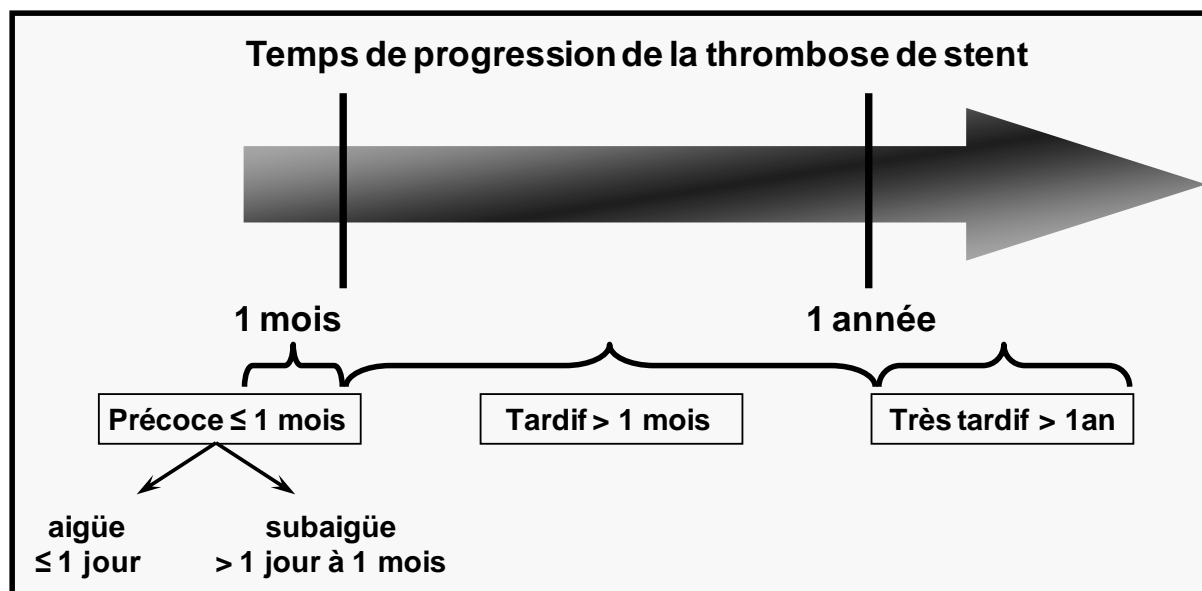


Figure 17 : Définition des thromboses de stent selon leur apparition temporelle à la suite de l'implantation, selon l'ARC. (D'après Windecker, S., *Circ*, 2007) [210]

Une méta-analyse regroupant 14 essais cliniques a mis en évidence une augmentation du risque de thromboses intra-stent chez des patients recevant un stent libérant du paclitaxel ou du sirolimus [211]. En plus des facteurs liés aux patients (diabète, âge...) et à la procédure chirurgicale qui augmentent le risque de thrombose intra-stent, les substances anti-prolifératives recouvrant les stents ont une action pro-thrombogène. En effet, ces molécules recouvrant les stents actifs bloquent la prolifération de l'ensemble des acteurs de la paroi artérielle. Ainsi, ces molécules inhibent non seulement la prolifération des CML mais également la cicatrisation de l'endothélium responsable d'une augmentation du risque de thrombose [212]. De plus, les substances pharmacologiques libérées par les stents induisent

l'expression et l'activation du facteur tissulaire par les cellules endothéliales, activateur de la cascade de coagulation. Enfin, les stents actifs peuvent également inhiber le recrutement, la mobilisation et la prolifération des EPC qui comme décrit précédemment (cf paragraphe III.3.1.) pourraient participer à la réendothélialisation [213] (**Figure 18**).

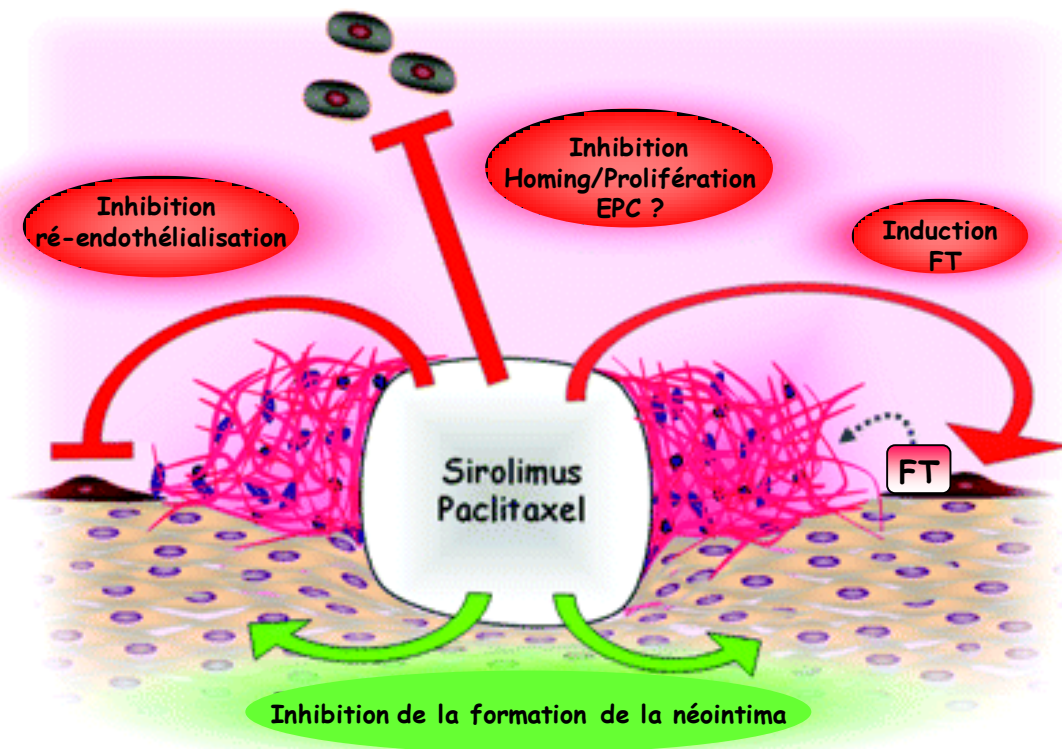


Figure 18 : Stents actifs et thrombose. Les molécules libérées localement par les stents actifs (sirolimus, paclitaxel) permettent de réduire la formation de la néointima en inhibant la prolifération/migration des CML. Cependant, ces molécules peuvent également inhiber la réendothélialisation, le recrutement et la prolifération des EPC, et induisent l'expression du facteur tissulaire (FT) augmentant ainsi la thrombogénicité du stent. (*D'après Luscher TF, Circ, 2007*) [213]

La recherche de nouveaux traitements dans ce domaine reste donc essentielle, le but actuel étant de diminuer la prolifération/migration des CML tout en préservant ou accélérant la réendothélialisation pour diminuer le risque de thrombose.

III-4.2. Les futurs stents

Les stents actuels sont en acier inoxydable composé de fer, de nickel et de chrome. Une des approches actuellement envisagées consiste à développer de nouveaux stents passifs, c'est-à-dire à augmenter la biocompatibilité des stents par des polymères de surface. Le revêtement idéal doit en effet constituer une barrière biologiquement inerte entre le stent, la paroi vasculaire et la circulation sanguine dans le but de limiter les réactions inflammatoires

et la thrombose. De plus, les polymères utilisés doivent pouvoir retenir la substance à la surface du stent puis permettre son élution progressive dans la paroi artérielle. Des études montrent que l'or, l'héparine, le carbone et le silicone ont des effets anti-thrombogènes mais ne montrent pas de bénéfice clinique en comparaison des stents existants. Des stents recouverts de phosphorylcholine, un composant majeur des membranes cellulaires, permettent de réduire l'activation plaquettaire, la formation de thrombus, le défaut de réendothélialisation et pourraient être utilisés pour délivrer des agents pharmacologiques ou des vecteurs de thérapie génique. Cependant, ces stents n'ont pas montré de réelle supériorité en comparaison des stents à élution de sirolimus. L'utilisation de polymères bioabsorbables, qui se dégraderaient lentement sans augmenter les processus inflammatoires, constitue actuellement une autre voie thérapeutique [214].

La limite majeure de l'utilisation des stents actifs actuels étant leur action inhibitrice sur les cellules endothéliales, des stents coatés avec des substances augmentant la réendothélialisation représentent une approche thérapeutique intéressante. Des études préliminaires avec un stent recouvert d'un anticorps (CD34⁺) qui capture les EPC ont montré des résultats positifs [215]. De même, un stent recouvert avec un peptide liant les intégrines accélère la réendothélialisation en augmentant le recrutement des EPC dans un modèle porcin [216]. Enfin, l'utilisation de stents totalement biodégradables ou bioabsorbables, qui resteraient dans la paroi artérielle uniquement le temps nécessaire pour éviter le retour élastique de l'artère et le remodelage constrictif, représente actuellement une stratégie prometteuse.

III-4.3.Approches anti-inflammatoires

Les corticostéroïdes sont des puissants agents anti-inflammatoires. Bien que la dexaméthasone n'ait pas montré d'efficacité en termes de survie, son administration après une pose de stent améliore la réponse inflammatoire. Dans un modèle porcin de resténose, l'utilisation de stents délivrant de la méthylprédnisolone a montré un effet bénéfique de la molécule en comparaison de l'hyperplasie intimale induite par des stents nus [217]. Chez l'homme, l'étude IMPRESS montre que le traitement oral avec la prednisone pendant 45 jours suivant l'implantation d'un stent conduit à une réduction de la resténose à six mois [218]. Le bénéfice des corticoïdes sur la resténose semble dépendre des caractéristiques des patients (diabétiques ou non, CRP élevées etc..) et ces molécules ne seraient par exemple pas indiquées chez des patients diabétiques [219] [220].

Comme décrit tout au long de ce chapitre, les mécanismes inflammatoires jouent un rôle majeur dans le processus de resténose intra-stent, suggérant qu'une approche anti-inflammatoire pourrait s'avérer efficace pour limiter l'hyperplasie intimale suite à l'implantation d'un stent. De plus, les molécules actuellement utilisées pour recouvrir les stents possèdent également des propriétés anti-inflammatoires. Le sirolimus est par exemple associé à une diminution de l'expression des cytokines MCP-1 et IL-6 dans un modèle de lésion artérielle chez le porc [221]. Chez l'homme, Kim *et al.* montrent que le taux plasmatique en CRP est plus faible chez les patients traités avec un stent actif en comparaison des stents nus, reflétant l'effet potentiellement anti-inflammatoire des stents actifs [222]. La réponse inflammatoire engendrée par l'implantation d'un stent est prolongée et riche en macrophages. Une thérapie de longue durée et incluant l'inhibition de l'activité des macrophages est donc envisageable.

IV- Conclusion

Comme décrit tout au long de chapitre, l'inflammation est un élément central de l'athérosclérose et de la resténose intra-stent. Les processus inflammatoires impliquent l'activation de nombreux récepteurs comme les récepteurs aux cytokines, aux chimiokines et aux facteurs de croissance présents à la surface cellulaire et pouvant conduire à l'activation de voies de signalisation intracellulaires communes. Parmi ces voies intracellulaires, la famille des PI3K a été décrite en aval de multiples récepteurs immuns et ces kinases sont essentielles pour réguler de nombreux effets biologiques, tels que la prolifération, la migration, la survie et le métabolisme, leur conférant un rôle dans de multiples pathologies dont les maladies inflammatoires et cardiovasculaires.

Chapitre 2 : Fonctions physiopathologiques de la phosphoinositide 3-kinase γ

Les phosphoinositide 3-kinases (PI3K) sont des lipides et protéines kinases constituant une famille d'enzyme très conservée au cours de l'évolution et pouvant être activées en aval d'activités tyrosine kinases et par des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). L'activité enzymatique des PI3K est essentielle dans les cellules eucaryotes pour réguler de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie, la migration, le trafic vésiculaire ou encore le métabolisme. Compte tenu de leurs rôles pléiotropiques, les PI3K sont également impliquées dans de nombreuses pathologies comme le cancer, les maladies inflammatoires et les maladies cardiovasculaires. Ainsi, le développement d'inhibiteurs de PI3K est actuellement d'un grand intérêt. Dans la recherche de nouvelles cibles pour le traitement des pathologies cardiovasculaires, l'isoforme γ des PI3K nous a plus particulièrement intéressée et a fait l'objet de ce travail de thèse. La PI3K γ a tout d'abord été découverte dans les cellules hématopoïétiques et joue de nombreux rôles dans le système immunitaire. Plus récemment, la PI3K γ a également été identifiée à de plus faibles taux dans le système cardiovasculaire. Son expression dans la paroi artérielle apparaît particulièrement intéressante dans les pathologies cardiovasculaires.

Dans ce premier chapitre, nous ferons tout d'abord une présentation générale des PI3K en décrivant leur structure, le mécanisme d'activation et d'action des PI3K de la classe I, classe qui nous a plus particulièrement intéressée. Nous résumerons les caractéristiques phénotypiques des souris invalidées pour chacune des isoformes et nous décrirons en particulier les diverses fonctions physiopathologiques de l'isoforme γ des PI3K, qui a fait l'objet de ce travail de thèse. Après avoir précisé les fonctions de la PI3K γ dans le cœur, nous détaillerons les nombreuses fonctions de cette kinase dans le système immunitaire. Enfin, les rôles de la PI3K γ dans les cellules composant la paroi artérielle (cellules endothéliales et CML) seront décrits et nous ferons le point sur les inhibiteurs développés par les compagnies pharmaceutiques pour cibler ces kinases.

I- La famille des PI3K

Les PI3K sont capables de produire des D3-phosphoinositides en phosphorylant le groupement hydroxyl des phosphoinositides sur la position 3 de leur noyau inositol (**Figure 19**).

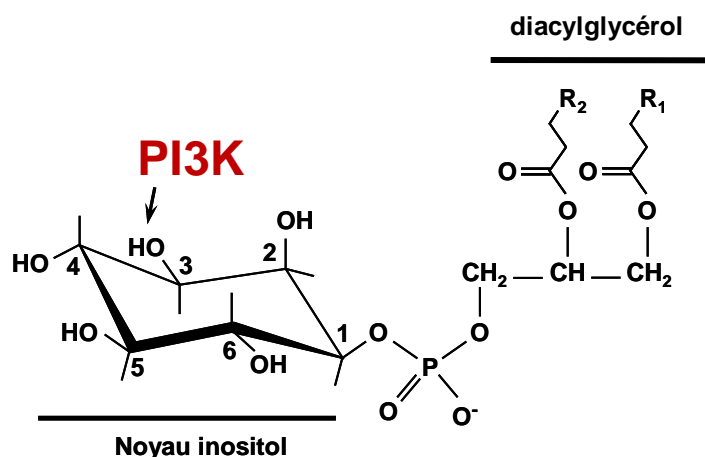


Figure 19 : Structure d'un phosphoinositide. Les phosphoinositides sont des glycérophospholipides anioniques constitués d'un squelette comprenant un sn-1,2-diacylglycérol associé par une liaison phosphodiester à l'hydroxyl D1 d'un *myo*inositol. Les phosphoinositides diffèrent par la position du groupement phosphate sur le *myo*inositol qui peut être phosphorylé en position D-3, D-4, D-5.

Les PI3K ont été identifiées il y a une vingtaine d'années dans des cellules fibroblastiques tout d'abord comme des lipides kinases associées à des oncogènes viraux [223] [224] [225]. Les PI3K ont ensuite été isolées à partir de nombreux eucaryotes. Chez les mammifères, la famille des PI3K est divisée en 3 classes (I, II, III) selon leur structure, leur mode d'activation et leur spécificité de substrats *in vitro* (**Figure 21**) [226] [227].

I-1. Structure et produits lipidiques des PI3K

I-1.1. PI3K de classe I

Les PI3K de la classe I sont capables *in vitro* de phosphoryler le phosphatidylinositol (PI), le PI 4-monophosphate (PI4P) et le PI 4,5 *bis*phosphate (PI(4,5)P₂) pour produire respectivement du phosphatidylinositol 3-monophosphate (PI3P), du PI 3,4-*bis*phosphate (PI(3,4)P₂), et du PI 3,4,5-*tris*phosphate (PI(3,4,5)P₃ ou PIP₃) [228]. Le PIP₃ est considéré comme un puissant second messager intracellulaire et ne peut être produit que par la classe I de PI3K (**Figure 20**).

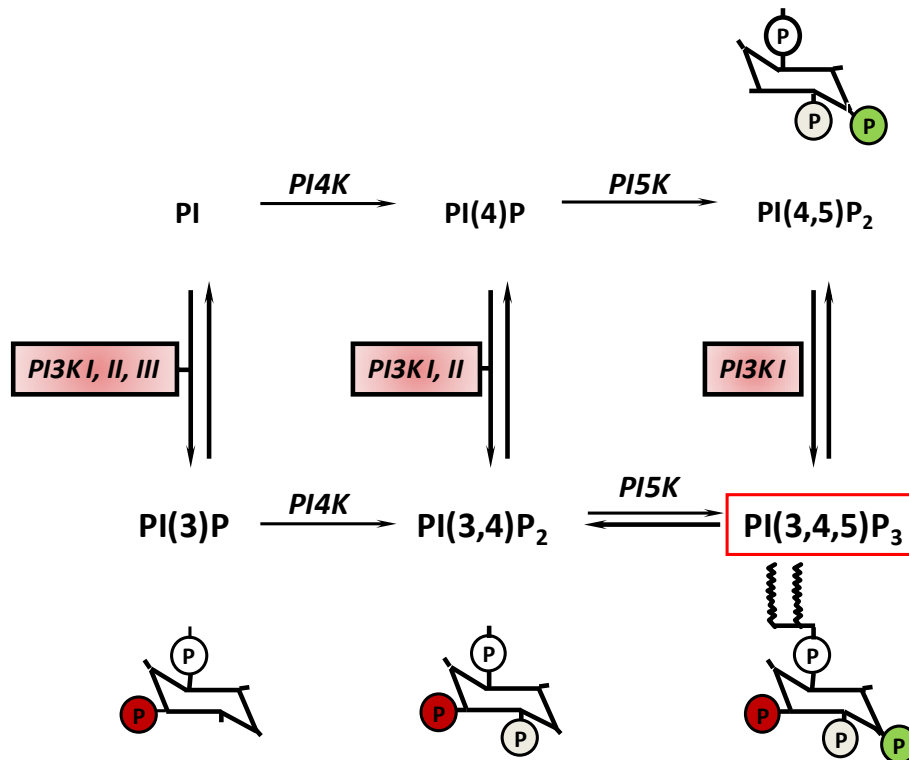


Figure 20: Métabolisme simplifié des 3-phosphoinositides. Les PI3K produisent des D3 phosphoinositides tels que le PI(3)P, le PI(3,4)P₂ et le PI(3,4,5)P₃.

Les PI3K de la classe I sont des hétérodimères composés d'une sous-unité catalytique p110 (110-120 kDa) et d'une sous-unité régulatrice ou adaptatrice (55-100 kDa). Toutes les sous-unités catalytiques p110 de la classe I comportent un domaine catalytique qui contient le site de liaison à l'ATP. Au niveau N-terminal se trouve le site de liaison à la sous-unité régulatrice, suivi d'un domaine de liaison à Ras, d'un domaine C2 nécessaire pour la stabilisation de l'enzyme lorsqu'elle est à la membrane, et d'un domaine en hélice (**Figure 21**).

En fonction de leur mode de régulation, les PI3K de classe I sont divisées en deux sous-classes : les PI3K de classe IA et les PI3K de classe IB.

Les PI3K de classe IA sont constitutivement associées avec une sous-unité régulatrice pour laquelle trois gènes ont été identifiés chez les mammifères : p85 α , p85 β et p55 γ . L'ARNm de p85 α peut subir un épissage alternatif pour donner la p55 α et la p50 α qui se caractérisent toutes les deux par l'absence des domaines SH3 (src homology 3) et BH (breakpoint-cluster-region homology) [229] [230]. Les sous-unités p85 sont constituées d'un domaine SH3, d'un domaine BH entouré de deux domaines riches en proline, et de deux domaines SH2 (src homology 2) séparés par un domaine inter-SH2 (iSH2). Le domaine iSH2

permet la liaison entre p85 et la sous-unité catalytique p110. Les trois sous-unités catalytiques p110 α , p110 β et p110 δ interagissent avec l'une des sous-unités régulatrices (**Figure 21**).

Les PI3K de classe IB comptent une seule sous-unité catalytique, p110 γ , qui peut être associée à une protéine adaptatrice p101 ou p84 (appelée aussi p87^{PIKAP}), capables de potentialiser l'activation de la PI3K γ [231] [232]. Les sous-unités p101 et p84/87 sont très peu caractérisées au niveau structurel et ne partagent pas de domaine d'homologie avec les autres protéines.

I-1.2.PI3K de classe II

Les PI3K de classe II sont des protéines de 170 kDa qui se caractérisent par un domaine C2 dans leur partie C-terminale, et un domaine PX (phox homology) (**Figure 21**). Le domaine PX leur permet de lier le PI(3)P qu'elles produisent et donc leur recrutement à la membrane plasmique. Aucun adaptateur de cette classe de PI3K n'a été identifié à ce jour. La classe II de PI3K compte trois membres chez les mammifères, codés par trois gènes différents : PI3K-C2 α , PI3K-C2 β et PI3K-C2 γ dont le mode d'action et les rôles physiologiques sont peu connus. Les PI3K-C2 sont capables de phosphoryler *in vitro* le PI et le PI(4)P, leur substrat préférentiel n'étant pas encore déterminé à ce jour. Une des particularités de cette classe réside dans le fait qu'elles sont peu sensibles aux inhibiteurs classiques de PI3K (sauf la PI3K-C2 β , sensible à la wortmannine). Les inhibiteurs classiques de PI3K sont ainsi souvent utilisés pour démontrer leur rôle mais les résultats sont aussi difficiles à interpréter. De nombreux stimuli peuvent activer les PI3K-C2, tels que des chimiokines, des cytokines, des facteurs de croissance, l'acide lysophosphatidique (LPA), l'insuline. Le mécanisme d'action de ces agonistes pour activer l'enzyme est inconnu mais suggère une relocalisation au niveau de la membrane plasmique de l'enzyme. La PI3K-C2 β semble jouer un rôle dans la migration cellulaire dépendante du LPA alors que la PI3K-C2 α a été montrée associée à la clathrine et semble jouer un rôle dans le trafic vésiculaire dépendant de la clathrine. De plus, la PI3K-C2 α a également été impliquée dans l'inhibition de la contraction des CML vasculaires induite par la noradrénaline [233].

I-1.3. PI3K de classe III

Le seul membre des PI3K de la classe III est un homologue de Vps34p (Vacuolar protein sorting 34) chez *Saccharomyces cerevisiae* [234]. Chez la levure, Vps34p forme un complexe avec une sérine/thréonine kinase Vps15p, nécessaire à son recrutement et à son activation. Chez les mammifères, Vps34p est associée avec l'homologue de Vps15p, p150. Le seul substrat de Vps34 est le PI. Cette kinase est principalement impliquée dans la régulation du trafic vésiculaire incluant l'autophagie, l'endocytose et la phagocytose [235].

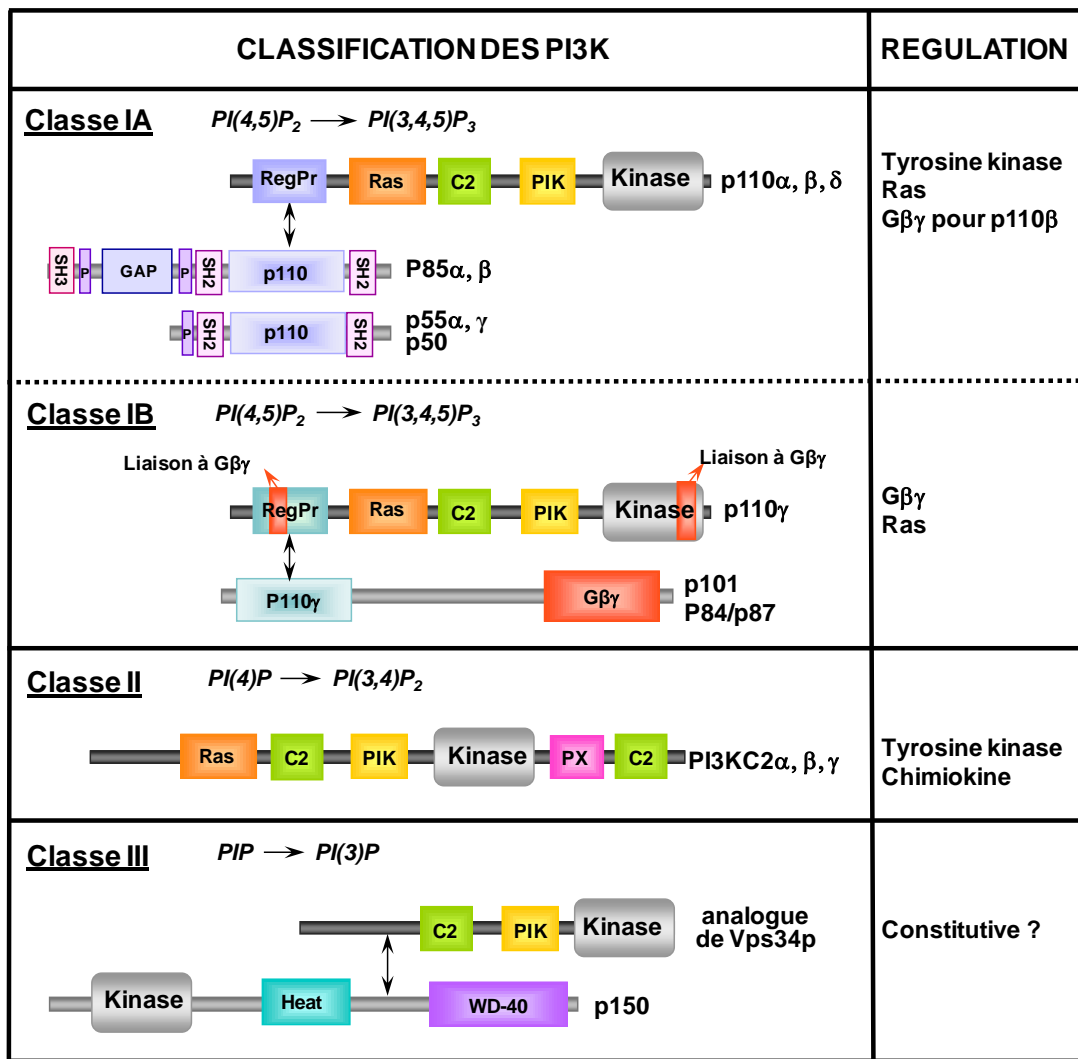


Figure 21 : Structures schématiques, spécificité de substrat *in vivo* et mécanismes d'activation des différentes classes de PI3K. Les PI3K sont divisées en 3 classes selon leur homologie de structure et leur spécificité de substrat. SH3 : Src homology 3 domain, PIK : PI3K accessory domain, RegPr : regulatory protein binding domain, GAP : GTPase-activating protein homology region, PX : phox homology domain, Heat : huntingtin, elongation factor 3, the PR65/A subunit of protein phosphatase 2A and the lipid kinase Tor. (D'après Fougerat A. et al., 2009, Clinical Science) [66]

I-2. Mécanismes d'activation des PI3K de classe I

Les PI3K de classe IA et IB présentent des mécanismes d'activation différents et peuvent être activées à la fois par des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) intrinsèque ou associée et par des RCPG, comme résumé dans la **figure 22**.

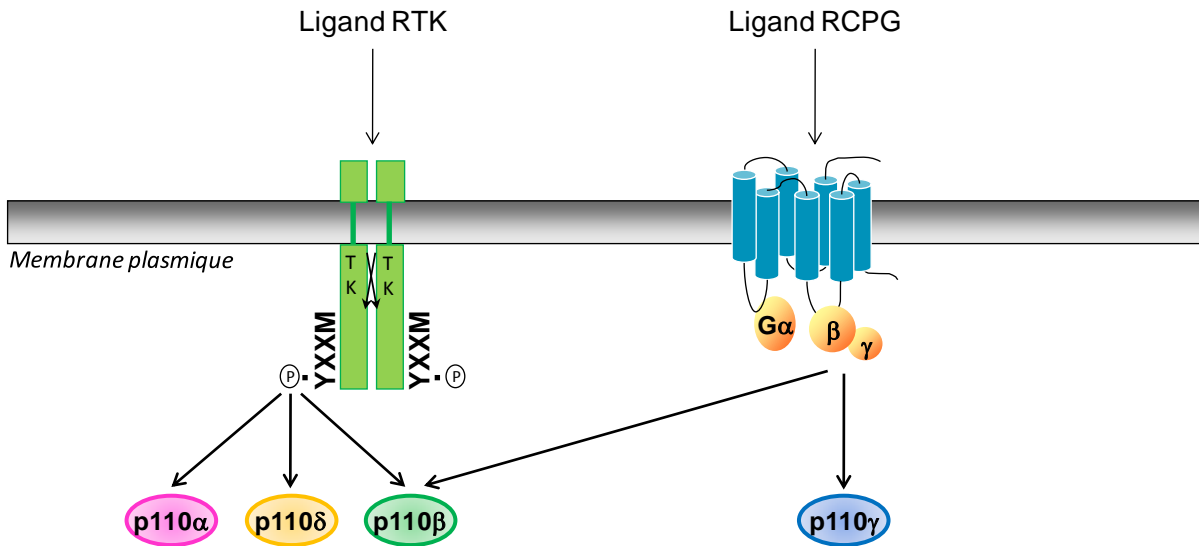


Figure 22 : Activation des PI3K de classe I. Les domaines SH2 des sous-unités régulatrices p85 peuvent se lier directement aux motifs YXXM des RTK ou des protéines adaptatrices conduisant à l'activation des PI3K p110 α , p110 δ ainsi que p110 β (gauche). L'interaction directe des PI3K avec les sous-unités G $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques couplées aux récepteurs à 7 segments transmembranaires conduit au recrutement des PI3K p110 β et p110 γ .

I-2.1. PI3K de classe IA

La sous-unité régulatrice/adaptatrice des PI3K de classe IA est responsable de l'activation de PI3K par les RTK. En effet, les domaines SH2 qu'elle contient lient des tyrosines phosphorylées au niveau de motifs YXXM retrouvés dans la partie intracytoplasmique des RTK ou sur des molécules adaptatrices. Cette interaction se fait donc soit directement, soit par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice telle que Shc, Grb2, Cbl, Gab1/2. Cette première étape permet d'une part de lever l'inhibition des domaines SH3 et BH de p85 sur la sous-unité p110 et d'autre part le recrutement à la membrane de la PI3K à proximité de ses substrats. Chacune des cinq sous-unités adaptatrices présentes chez les mammifères peut se lier à chaque sous-unité catalytique p110. Les sous-unités p110 possèdent le domaine d'activité catalytique des PI3K (**Figure 22**).

Ainsi, les PI3K de classe IA sont activées en aval des RTK [236] tels que l'EGFR (epidermal growth factor receptor) [237], le PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) [238], le FGFR [239], le GHR (growth hormone receptor) [240] [241], l'IGFR (insulin-like growth factor receptor) [242], le récepteur à l'insuline [243] et divers récepteurs aux interleukines [229]. Dans les cellules immunitaires, la PI3K IA est activée après activation du TCR (T-cell receptor), du BCR (B-cell receptor), des NKR (natural killer cell stimulatory receptors), des récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines ou encore des TLR (toll-like receptors) [244]. Le « cross-linking » de ces immuno-récepteurs conduit à l'activation de tyrosine kinases qui phosphorylent alors les motifs ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). Les tyrosines kinases à domaine SH2 recrutées par ces motifs vont créer un site de liaison pour les PI3K sur les récepteurs co-stimulateurs tels que CD28 (lymphocytes T) ou CD19 (lymphocytes B) ou sur des molécules adaptatrices comme Grb2 qui interagit avec la protéine LAT (linker for T cell activation) [245].

Parmi les PI3K de classe IA, la PI3K β a la particularité d'être recrutée à la fois après activation des RTK et des RCPG. Kurosu *et al.* montrent tout d'abord une coopération entre les RTK et les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines hétérotrimériques nécessaire à l'activation de la p110 β [246]. Bien que sa structure prévoie une activation par les RTK, des résultats récents montrent en effet une activation préférentielle de la PI3K β par les RCPG [247] [248] [249]. Ainsi, dans des macrophages et des fibroblastes issus de souris exprimant une forme tronquée du domaine catalytique de PI3K β , Guillermet-Guibert J. *et al.* montrent par exemple que la PI3K β est activée en aval des RCPG et n'est pas activée par des agonistes de RTK seuls [247]. Dans leur modèle, la p110 β et la p110 γ sont activées par les mêmes agonistes des RCPG et conduisent à la phosphorylation d'Akt. La PI3K β serait l'isoforme majoritaire en aval des RCPG dans les cellules non-hématopoïétiques (**Figure 22**).

Les RCPG peuvent également conduire à l'activation des autres isoformes de PI3K de classe IA de façon indirecte. En effet, dans certains types cellulaires et notamment dans les CML, comme nous le verrons dans la partie « résultats expérimentaux », les agonistes des RCPG provoquent une transactivation des RTK tels que l'EGFR [250], le PDGFR [251], l'IGFR [252] pouvant alors activer les PI3K de classe IA [253]. Le mécanisme est particulièrement décrit dans le cas de l'EGFR. L'activation d'un RCPG (par exemple par la thrombine, l'angiotensine II, la S1P, le LPA...) conduit à un signal intracellulaire qui induit l'activation d'une protéase MMP. Cette protéase peut alors cliver le pro-HB-EGF (pro-

heparin-binding-EGF) pour former du HB-EGF dans le milieu extracellulaire, ligand de l'EGFR [254] (**Figure 23**). La transactivation du PDGFR et de l'IGFR par l'angiotensine II et la thrombine respectivement serait dépendante de mécanismes intracellulaires impliquant la kinase Src [251] [252].

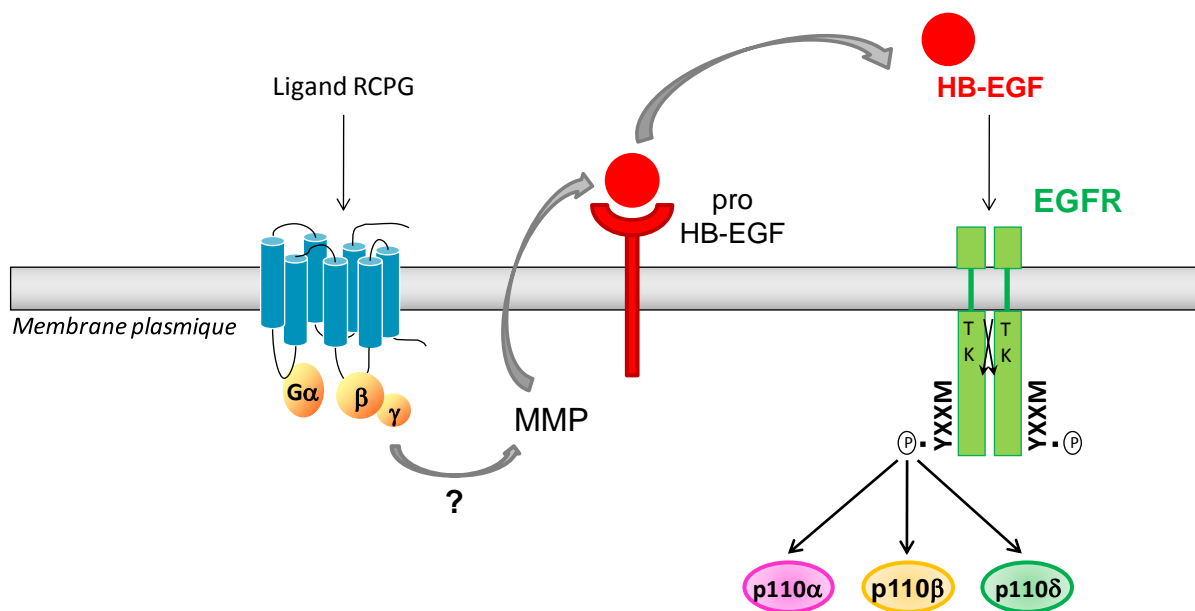


Figure 23 : Mécanisme de transactivation de l'EGFR par des agonistes de RCPG dans les CML.

I-2.2. PI3K de classe IB

La PI3K de classe IB, PI3K γ , est activée spécifiquement par les sous-unités G $\beta\gamma$ des protéines G hétérotrimériques [255] soit directement par liaison de ces sous-unités $\beta\gamma$ avec la sous-unité catalytique p110 γ , soit par l'intermédiaire d'une sous-unité régulatrice p101 ou p87. La contribution relative de ces deux sous-unités reste à préciser. Leur répartition tissulaire est différente et elles génèrent des pools distincts de PIP₃ [256]. La sous-unité p84/87 est fortement exprimée dans les mastocytes alors que p101 est la sous-unité majoritaire dans les neutrophiles et les lymphocytes [257]. Ainsi, la PI3K γ est activée en aval de RCPG tels que les récepteurs aux chimiokines (**Figure 22**).

Enfin, il a également été montré que Ras joue un rôle dans l'activation des PI3K p110 α et p110 γ . Concernant p110 γ , il semblerait que Ras soit surtout important pour le recrutement à la membrane du complexe p110 γ -p87 [258]. Ras est capable d'activer directement la PI3K γ

au niveau de la membrane plasmique en induisant un changement conformationnel de p110 γ comparable à celui induit par la liaison de l'ATP [259] [260]. Dans les neutrophiles, il a été montré que Ras est aussi important que p101 pour l'activation de p110 γ [257].

I-3. Mécanismes d'action des PI3K de classe I

I-3.1. Activité lipide kinase

Les PI3K de la classe I activées produisent dans la cellule essentiellement du PI(3,4)P₂ et du PIP₃. Les produits lipidiques des PI3K représentent des seconds messagers intracellulaires qui agissent en liant des domaines particuliers comme les domaines PX (phox homology), PH (pleckstrin homology), ENTH (epsin N-terminal homology) (pour revue, [261]) présents dans un grand nombre de protéines intracellulaires. Ces domaines, qui ont des affinités différentes pour les différents phosphoinositides, permettent ainsi le recrutement à la membrane de multiples protéines impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires (pour revue, [229], [262]). Parmi ces protéines, la sérine/thréonine kinase Akt a été l'une des premières cibles identifiées des produits de PI3K, constitue une cible majoritaire de la classe I et permet de rendre compte d'un grand nombre d'effets biologiques attribués aux PI3K [263]. De par ses propriétés strictement dépendantes du PI(3,4)P₂ et du PIP₃, la phosphorylation d'Akt peut être considérée comme un reflet de l'activation des PI3K de classe I et est largement utilisée pour évaluer l'activité de l'enzyme. En effet suite à son recrutement membranaire *via* la liaison de son domaine PH avec le PIP₃, Akt a besoin pour être pleinement activée d'être phosphorylée sur deux sites spécifiques, la sérine 473 et la thréonine 308, par les protéines PDK1 et PDK2 (phosphoinositide-dépendant kinases) elles-mêmes recrutées et activées par le PI(3,4)P₂ et le PIP₃. Akt régule à son tour par des phosphorylations activatrices ou inhibitrices un grand nombre de protéines qui sont impliquées dans des fonctions cellulaires telles que la progression du cycle cellulaire, la survie, l'apoptose, la migration cellulaire, le métabolisme... [264]. (**Figure 24**).

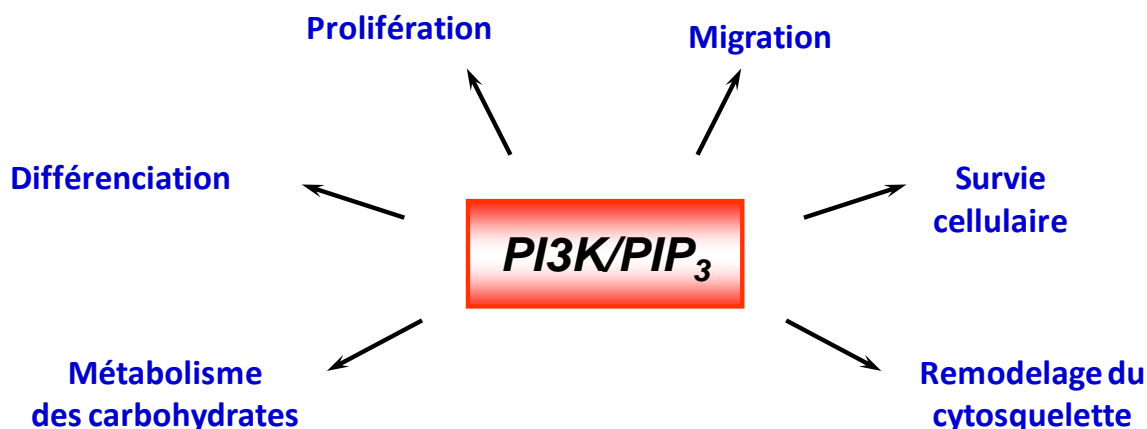


Figure 24 : Fonctions cellulaires principales des PI3K impliquant le PIP₃.

I-3.2. Activité indépendante des produits lipidiques

En plus de leur activité lipide kinase, les PI3K (classe I et III) possèdent aussi une activité sérine/thréonine kinase. L'activité protéine kinase de la PI3K γ a été mise en évidence à l'aide de mutants p110 γ dépourvus d'activité lipide kinase mais ayant conservé leur activité protéine kinase capable de phosphoryler les MAPK (mitogen activated protein kinase) [265]. La PI3K γ est également capable de phosphoryler et ainsi de moduler l'activité de la PKC α (protein kinase C), permettant ainsi de réguler la production de ROS dans les neutrophiles [266]. L'activité protéine kinase de PI3K joue également un rôle dans la régulation de l'endocytose des récepteurs β -adrénergiques en phosphorylant la tropomyosine [267].

Les PI3K peuvent également jouer un rôle de protéine adaptatrice, indépendamment de leur activité kinase, qui a été mis en évidence suite à la réalisation d'un modèle de souris exprimant une forme catalytiquement inactive de l'enzyme (KI, knock-in) qui a révélé un phénotype différent des souris dépourvues de l'expression totale de PI3K (KO, knock-out). Cette fonction de PI3K sera détaillée dans le paragraphe II-1.

I-4. Conséquences phénotypiques de l'invalidation de PI3K

La compréhension des fonctions physiologiques et physiopathologiques des isoformes de PI3K a été facilitée suite au développement de souris génétiquement modifiées pour chacune des isoformes de PI3K (pour revue, [268]) (**Tableau 7**). Les PI3K α et PI3K β étant exprimées de façon ubiquitaires, les souris déficientes en p110 α et p110 β présentent une létalité embryonnaire, indiquant que les isoformes α et β de PI3K sont indispensables au

développement embryonnaire et ont des fonctions non redondantes [269] [270]. Cependant, la réalisation de modèles plus spécifiques en particulier d'expression de forme catalytiquement inactive de ces enzymes a permis de mettre en évidence un rôle de la PI3K α dans la signalisation en aval de l'insuline et plus spécifiquement en aval d'IRS (insulin receptor substrate). Ainsi, les animaux hétérozygotes pour une mutation conduisant au blocage de l'activité catalytique de p110 α ont un défaut dans la réponse à diverses hormones telles que l'insuline, l'IGF-1 et la leptine, conduisant notamment à une diminution de la croissance, une hyperinsulinémie et une intolérance au glucose. Toutefois, les souris homozygotes pour la PI3K α -KI présentent une létalité embryonnaire [271]. Les souris exprimant une forme catalytiquement inactive de la p110 β (PI3K β -KI) présentent également un retard de croissance et développent une légère insulino-résistance avec l'âge [249]. L'activité catalytique de p110 β serait nécessaire à la signalisation en aval des RCPG ainsi qu'au maintien de la signalisation à l'insuline à long terme. La PI3K β possède donc certainement un rôle de protéine adaptatrice qui n'est actuellement pas décrit puisque les souris PI3K β -KO présentent une mortalité précoce.

Délétion d'une sous-unité catalytique PI3K de classe I	Viabilité	Phénotype général
p110 α	E9/E10	Mortalité précoce, défaut de prolifération
p110 β	\approx E3	Mortalité très précoce
p110 γ	Viable	Altération des fonctions immunitaires et cardiaques
p110 δ	Viable	Altération des fonctions immunitaires

Tableau 7 : Phénotype général des souris déficientes en sous-unité catalytique de PI3K.

Les souris déficientes en p110 γ [272] [273] [274] ou p110 δ [275] (**Tableau 8**), ou exprimant une forme catalytiquement inactive de ces isoformes [276] [275] sont viables, fertiles et ne présentent pas de phénotype particulier dans des conditions physiologiques. En revanche, en conditions pathologiques, les réponses du système immunitaire de ces souris sont fortement diminuées. Bien que présentes à de faible taux dans d'autres types cellulaires, ces deux isoformes sont fortement exprimées dans les cellules hématopoïétiques et représentent des cibles particulièrement attractives en pharmacologie (**Tableau 8**).

Modèle	Description	Phénotype
PI3K γ ^{-/-}	Déficiences en PI3K γ	Neutrophiles et macrophages - Diminution de la migration - Diminution de la production de ROS Mastocytes et éosinophiles - Diminution de la dégranulation et protection de l'anaphylaxie - Diminution du recrutement des éosinophiles Lymphocytes T - Défaut de maturation des thymocytes - Diminution de la prolifération et production de cytokine - Défaut d'organisation des synapses immunologiques
PI3K γ -KI	Expression d'une forme catalytiquement inactive de PI3K γ	Neutrophiles et macrophages - Diminution de la migration
PI3K δ ^{-/-}	Déficiences en PI3K δ	Lymphocytes B - Défaut de maturation - Diminution de la production d'anticorps
PI3K δ -KI	Expression d'une forme catalytiquement inactive de PI3K δ	Mastocytes et éosinophiles - Diminution de la dégranulation et protection de l'anaphylaxie Lymphocytes T - Diminution de l'expansion clonale et de la différenciation en cellules Th Lymphocytes B - Défaut de maturation - Diminution de la production d'anticorps - Augmentation de la production d'IgE
PI3K γ ^{-/-} /PI3K δ -KI	Déficiences en PI3K γ et expression d'une forme catalytiquement inactive de PI3K δ	Mastocytes et éosinophiles - Inflammation éosinophilique Lymphocytes T - Défaut de maturation des thymocytes
PI3K γ ^{-/-} /PI3K δ ^{-/-}	Déficiences en PI3K γ et en PI3K δ	Neutrophiles et macrophages - Défaut d'attachement des leucocytes à l'endothélium Lymphocytes T - Défaut dans le développement Lymphocytes B - Défaut de maturation

Tableau 8 : Altérations immunologiques des souris déficientes en PI3K γ ou PI3K δ , et exprimant une forme inactive de PI3K γ ou PI3K δ . (D'après Ghigo, A. et al., 2010, Bioessays) [277]

Les études utilisant ces différents modèles de souris ont permis de grandes avancées dans la compréhension des rôles *in vivo* de PI3K. Cependant, la létalité embryonnaire (pour PI3K α -KO et PI3K β -KO) et la complexité de la régulation de ces enzymes rend parfois difficile l'interprétation des résultats obtenus avec cette approche, en particulier les résultats différents entre les animaux KO et les animaux KI. Ainsi, la combinaison d'une stratégie génétique avec une stratégie pharmacologique semble nécessaire pour disséquer les fonctions précises et spécifiques de chacune des isoformes de PI3K. Une vue d'ensemble des différents inhibiteurs de PI3K actuels et en cours de validation sera réalisée à la fin de chapitre.

II- Fonctions physiopathologiques de la PI3K γ

La PI3K γ , qui a fait l'objet de mon travail de thèse, représente donc une cible thérapeutique particulièrement intéressante. La PI3K γ présente la spécificité d'être recrutée spécifiquement en aval des RCPG. Cette isoforme est fortement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et module de nombreux mécanismes immunitaires et inflammatoires qui seront détaillés dans cette partie. La PI3K γ est également exprimée dans le système cardiovasculaire, à de faibles taux mais dans lequel elle joue des rôles importants. Enfin, la présence de la PI3K γ dans les cellules composant la paroi vasculaire (cellules endothéliales et CML) renforce son intérêt dans les pathologies cardiovasculaires.

II-1. Fonctions cardiaques de PI3K γ

La réalisation du modèle de souris exprimant une forme catalytiquement inactive de la PI3K γ (PI3K γ -KI) a permis de mettre en évidence différents rôles majeurs de la PI3K γ dans le cœur, d'une part dépendants de son activité kinase et d'autre part indépendants de son activité kinase révélant son rôle de protéine adaptatrice dans les cardiomyocytes (pour revue, [278]).

Bien que la PI3K α représente l'isoforme majoritaire impliquée dans l'hypertrophie cardiaque, des travaux montrent également un rôle de la PI3K γ dans ce mécanisme. Ainsi, dans un modèle d'hypertrophie induite par l'isoprotérénol, les souris déficientes en PI3K γ présentent une hypertrophie diminuée qui est associée à une diminution de la fibrose [279]. Patrucco *et al.* montrent que l'activité kinase de la PI3K γ est nécessaire à l'activation des voies de signalisation Akt et MAPK respectivement impliquées dans l'hypertrophie et la fibrose conduisant à la régulation du remodelage cardiaque [276] (**Figure 25**).

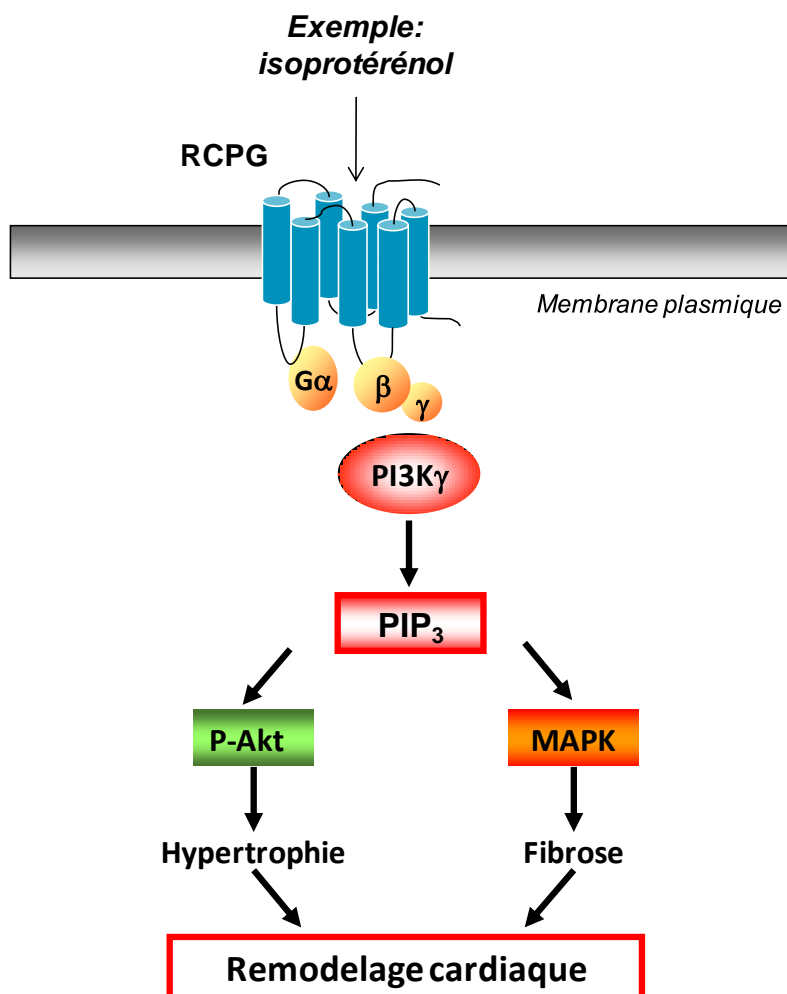


Figure 25 : Rôle kinase-dépendant de p110 γ dans le cœur. L'activation de p110 γ en aval de RCPG conduit, par l'intermédiaire du PIP₃, à l'activation d'Akt impliqué dans l'hypertrophie, et à l'activation des MAPK impliquées dans le processus de fibrose. Ainsi l'activité kinase de la PI3K γ joue un rôle central dans le remodelage cardiaque.

Plusieurs études mettent en évidence un rôle de la PI3K γ dans la contractilité cardiaque. Ainsi, la contractilité de cœurs issus de souris déficientes en PI3K γ est fortement augmentée et associée à une augmentation du taux d'AMPc [280]. Par contre, les souris exprimant une forme catalytiquement inactive de PI3K γ ont des taux normaux d'AMPc et ne présentent pas de défaut de contractilité cardiaque, indiquant que la PI3K γ régule le taux d'AMPc indépendamment de son activité kinase. En effet, en interagissant avec la PDE3B (phosphodiesterase), la PI3K γ contrôle son activité et régule alors négativement la contractilité cardiaque [276]. La PI3K γ serait également capable de réguler la PDE4 dans des compartiments cellulaires particuliers contenant SR Ca²⁺ ATPase (SR, reticulum sarcoplasmique), mais pas les récepteurs à la ryanodine ou les canaux calciques de type L

[281]. Ainsi, en formant des complexes avec différentes PDE, la PI3K γ participe à la compartimentalisation de l'AMPC dans les cardiomyocytes [282] (**Figure 26**).

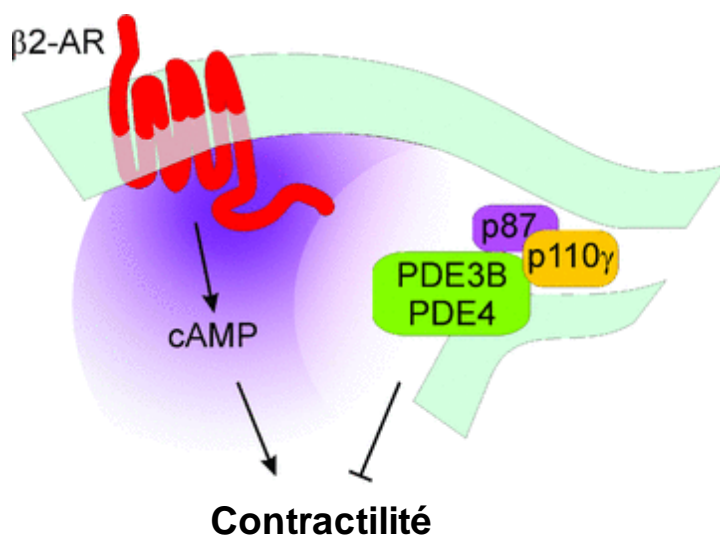


Figure 26 : Rôle de protéine adaptatrice de la PI3K γ dans la signalisation de l'AMPC. Dans les cardiomyocytes, la stimulation des récepteurs β -adrénergiques conduit à la production d'AMPC dans des microdomaines particuliers qui est contrôlée par les PDE. En plus de son activité lipide kinase, la PI3K γ contrôle l'activité des PDE dans le cœur, régulant ainsi négativement la contractilité cardiaque. La PI3K γ , en régulant différentes PDE dans différents domaines subcellulaires, contribue à la compartimentalisation de la signalisation de l'AMPC. (D'après Damilano, F., 2010, *Annals of the New York Academy of Science*) [283]

La PI3K γ peut également jouer un rôle dans la contractilité en régulant la densité des récepteurs β 2-adrénergiques à la surface des cardiomyocytes. En effet, l'activation de ces récepteurs conduit rapidement à leur désensibilisation par phosphorylation, puis à leur internalisation. Il a été montré que suite à l'activation de ces récepteurs, la PI3K γ interagit avec la kinase β -adrénergique 1 (β -ARK-1 ou GRK-2, G protein-coupled receptor kinase-2) ce qui permet son activation. Le complexe PI3K γ / β -ARK-1 ainsi formé est impliqué dans la désensibilisation et l'internalisation des récepteurs β 2-adrénergiques [284] 1) par la phosphorylation du récepteur par la β -ARK activée permettant le recrutement des arrestines nécessaires au découplage du récepteur à la protéine G hétérotrimérique, et 2) par l'activité PI3K γ nécessaire au processus d'endocytose. L'ensemble de ces mécanismes conduit à une diminution de la quantité de récepteurs β 2-adrénergiques présents à la surface des cardiomyocytes [285] [286] (**Figure 27**).

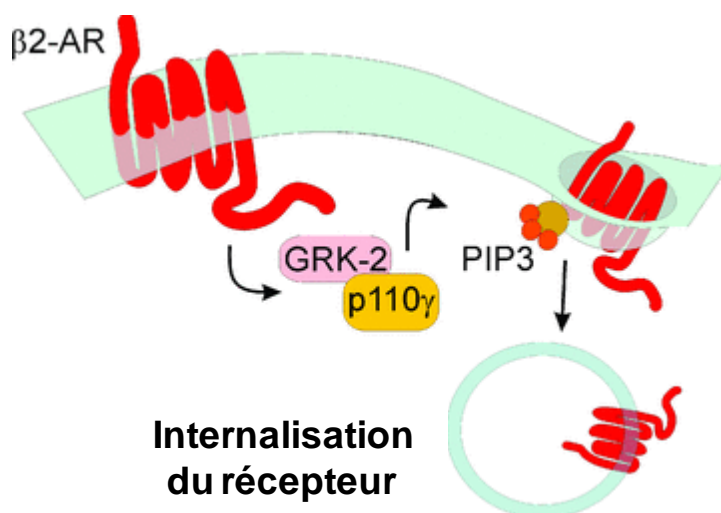


Figure 27 : Régulation des récepteurs β-adrénergiques par la PI3K γ . L'activation des récepteurs β-adrénergiques conduit dans un premier temps à leur désensibilisation, puis à leur internalisation. Ce dernier processus permet de réduire le nombre de récepteurs à la membrane plasmique. La PI3K γ forme des complexes avec GRK-2 impliqués dans la formation de vésicules et stimule l'internalisation des récepteurs β-adrénergiques. (D'après Damilano, F., 2010, *Annals of the New York Academy of Science*) [283]

Les données obtenues dans des modèles d'ischémie/reperfusion montrent des rôles contradictoires de la PI3K γ dans les fonctions cardiaques. Dans un modèle d'infarctus du myocarde, Doukas *et al.* montrent que l'inhibition combinée de PI3K γ et PI3K δ (avec le TG100-115) pendant la phase de reperfusion réduit de façon importante la taille de l'infarctus chez le rat et chez le porc probablement en bloquant les processus inflammatoires puisque le TG100-115 diminue l'infiltration des leucocytes induite par différents facteurs (PAF, VEGF, dextran) [287]. Au contraire Haubner *et al.*, dans un modèle d'ischémie/reperfusion du myocarde chez la souris, montrent récemment que l'absence de la PI3K γ conduit à une augmentation de la taille de l'infarctus sans modifier les processus inflammatoires. La taille de l'infarctus des souris exprimant une forme catalytiquement inactive de PI3K γ est comparable aux souris sauvages, indiquant un rôle cardioprotecteur de la PI3K γ indépendant de son activité kinase [288].

L'ensemble de ces données montre l'importance de la PI3K γ dans les fonctions cardiaques plaçant d'ores et déjà cette isoforme comme un bon candidat dans le développement de pathologies cardiovasculaires. L'inhibition pharmacologique de la PI3K γ apparaît prometteuse au niveau du cœur puisqu'elle permettrait une augmentation des performances

cardiaques en maintenant la densité des récepteurs β -adrénergiques à la surface cellulaire tout en préservant les fonctions sur la contractilité.

II-2. Fonctions de la PI3K γ dans l'inflammation

La PI3K γ est exprimée dans les différentes cellules participant aux processus inflammatoires et pouvant jouer un rôle dans les pathologies de la paroi vasculaire précédemment discutées telles que l'athérosclérose et ses complications. La génération des souris déficientes en PI3K γ ainsi que le développement d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques de cette isoforme ont permis de montrer son rôle majeur dans de nombreux processus inflammatoires.

II-2.1. PI3K γ et recrutement des cellules inflammatoires

➤ Neutrophiles et macrophages

Le recrutement des leucocytes au niveau des sites d'inflammation dépend de leur capacité à migrer selon un gradient de chimiokines et de cytokines *via* un processus appelé chimiotactisme. Bien que d'autres isoformes de PI3K semblent participer à ce mécanisme [289], la PI3K γ semble l'isoforme majoritaire nécessaire à la migration des leucocytes *in vivo*. Ainsi dans un modèle de péritonite, les souris déficientes en PI3K γ présentent un défaut d'infiltration des neutrophiles et des macrophages [272] [273] [274]. L'inhibition de PI3K γ avec un inhibiteur pharmacologique spécifique diminue le recrutement des neutrophiles dans un modèle de chimiotactisme péritonéale induite par RANTES [290].

Les PI3K et plus particulièrement l'isoforme γ joue donc un rôle essentiel dans les différentes étapes de la migration des neutrophiles et macrophages (**Figure 28**).

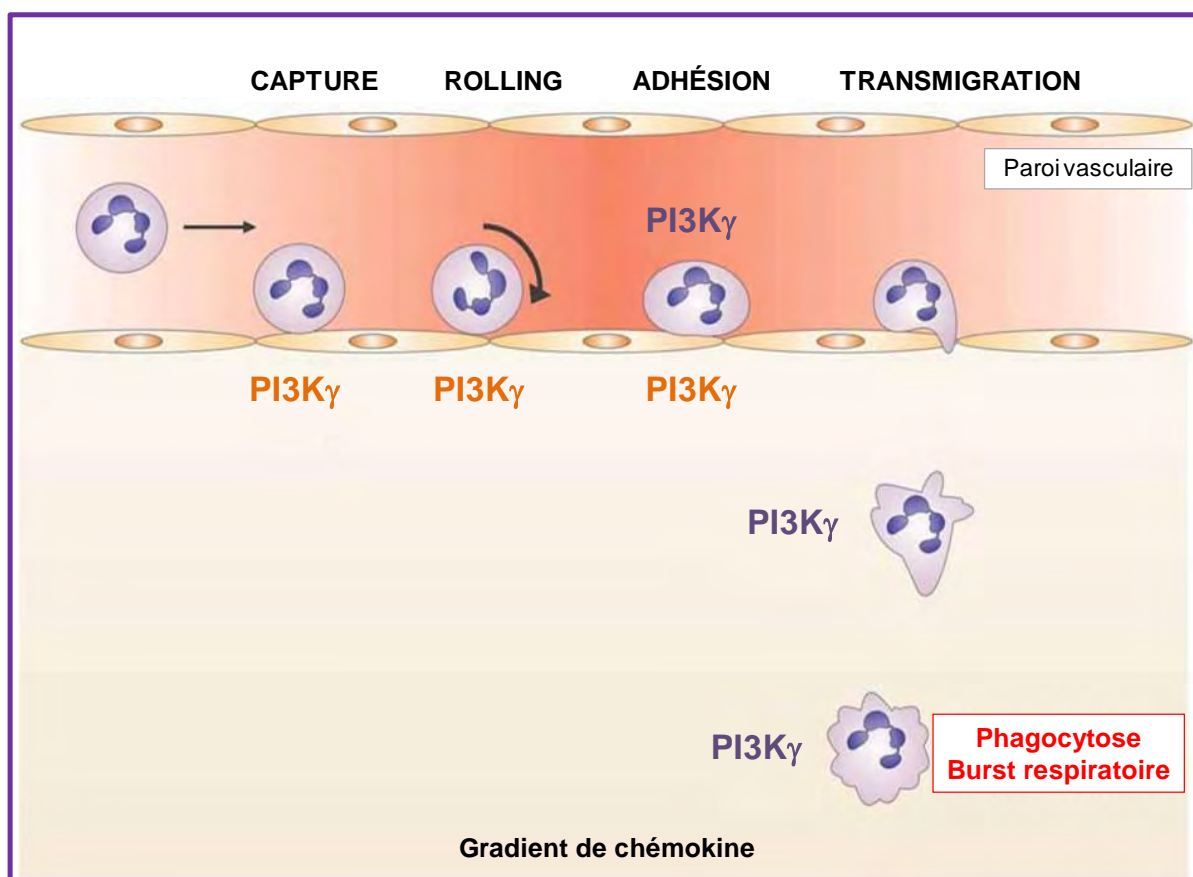


Figure 28 : Implication de la PI3K γ dans les différentes étapes du recrutement des neutrophiles et des macrophages dans la paroi vasculaire. L'isoforme γ de PI3K joue un rôle clé dans les premières phases de la migration : dans l'endothélium, la PI3K γ contrôle la capture et le « rolling » des leucocytes médiés par les sélectines. L'adhésion à l'endothélium dépend ensuite de l'activité PI3K γ endothéliale mais aussi leucocytaire. Enfin, la migration et le recrutement des cellules inflammatoires sont également contrôlée par la PI3K γ . (D'après Ghigo, A. et al., *Bioessays*, 2010) [277]

➤ Lymphocytes T

L'activité PI3K γ est aussi importante pour la migration des lymphocytes T. Néanmoins, l'isoforme de PI3K impliquée dans cette fonction est parfois controversée et certaines données indiquent un rôle de la PI3K δ . Des études *in vitro* montrent que la migration de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ chez des souris PI3K γ ^{-/-} est diminuée de 30 à 65% en réponse à diverses cytokines (CCL19, CXCL12, CCL21) alors que l'isoforme δ ne semble pas nécessaire [291] [292]. Des travaux plus récents montrent, à l'inverse, que la PI3K γ joue un rôle mineur dans la migration des lymphocytes T et serait plutôt impliquée dans l'angle de rotation de ces cellules [293]. *In vivo*, Barber et al. montrent que la PI3K IA, mais pas la PI3K γ , joue un rôle dans la migration des cellules T [294]. La PI3K γ ne serait pas impliquée dans la migration des cellules T naïves, ni dans leur activation et différenciation en cellules

effectrices, mais jouerait un rôle essentiel dans la migration des cellules T effectrices dans les sites d'inflammation [295] [296].

➤ Eosinophiles

La PI3K γ a également montré un rôle dans le recrutement des éosinophiles dans un modèle d'inflammation allergique [297] [298].

➤ Cellules NK (Natural Killer)

Récemment, les isoformes PI3K γ et PI3K δ ont été montrées toutes les deux essentielles à la migration des cellules NK en réponse à CXCL12 et CCL3, et *in vivo* pour la migration aux sites d'inflammation et dans l'utérus durant les premières étapes de la gestation. Par contre, seule la PI3K δ apparaît nécessaire à la migration des cellules NK induite par la S1P (sphingosine 1-phosphate) et CXCL10 suggérant l'implication de cette isoforme en aval de RCPG [299].

Ainsi, les isoformes PI3K γ et PI3K δ jouent un rôle central dans le recrutement des différents types cellulaires inflammatoires. *In vivo*, l'inhibition pharmacologique spécifiquement de la PI3K γ inhibe le recrutement des cellules au niveau des sites d'inflammation dans de nombreux modèles pathologiques murins tels que l'arthrite rhumatoïde [300], le lupus érythémateux [301], l'athérosclérose [302] ou encore la maladie d'Alzheimer [303].

II-2.2.PI3K γ et fonctions des lymphocytes

En plus de son rôle dans la migration des lymphocytes T, la PI3K γ joue un rôle dans le développement de ces cellules. Les souris déficientes en PI3K γ ont un nombre réduit de lymphocytes T périphériques dû à un défaut de maturation des thymocytes [273]. L'absence de PI3K γ augmente notamment le nombre de cellules double négatives CD4⁻CD8⁻ dans le thymus et bloque le développement des thymocytes. L'inactivation de PI3K δ n'a qu'un effet modeste sur le développement des thymocytes alors que l'absence des deux isoformes PI3K γ et PI3K δ conduit à une augmentation importante du ratio CD4⁻CD8⁻/CD4⁺CD8⁺ [304] [305].

Dans les cellules T naïves, la PI3K est activée après activation du TCR associée ou non à la molécule costimulatrice CD28 et régule ainsi la prolifération cellulaire. Cependant, l'isoforme impliquée dans ce processus n'est pas clairement identifiée. Alcazar *et al.* ont

démontré qu'après activation du TCR, la PI3K γ est nécessaire à l'assemblage des synapses immunologiques bien que le TCR ne soit pas un RCPG [306]. De plus, la prolifération et la sécrétion de cytokines en réponse à différents stimuli sont réduites en absence de PI3K γ dans les cellules T [273]. En revanche, Garçon *et al.* montrent que l'activité PI3K dépendante de l'antigène ne dépend pas de la PI3K γ et n'observent pas de défaut de prolifération et de sécrétion de cytokines dans les lymphocytes T CD4⁺ déficients en PI3K γ . La PI3K δ et la molécule costimulatrice CD28 agiraient en parallèle et de façon complémentaire pour activer les cellules T [307].

Des travaux montrent que la PI3K γ est impliquée dans la migration des cellules dendritiques, pouvant jouer indirectement un rôle majeur dans l'activation des cellules T [308].

Enfin, des travaux récents montrent que la PI3K γ serait impliquée dans la survie des leucocytes infiltrés et non dans le recrutement de ces cellules dans un modèle d'encéphalomyélite chez la souris [309].

II-2.3.PI3K γ et production de ROS

Au niveau des sites d'infection, les neutrophiles et les macrophages exercent une fonction antimicrobienne en produisant des ROS par activation de la NADPH oxydase. Ce processus résulte d'une activation séquentielle des isoformes γ et δ de PI3K. La phase initiale de production de PIP₃ nécessaire à la production de ROS dépendrait de la PI3K γ et serait nécessaire à l'amplification du signal par la PI3K δ [310]. Ainsi, la production de ROS stimulée par le fMLP (N-formylméthionyl-leucyl-phénylalanine) dans les neutrophiles est fortement diminuée en absence de PI3K γ [272] [273] [274]. A l'aide d'inhibiteurs spécifiques, Condliffe *et al.* confirment le rôle de l'isoforme γ dans la phase initiale de synthèse de PIP₃ et montrent que la seconde phase de production de PIP₃ stimulée par le fMLP, qui dépend entièrement de la première, est augmentée par le TNF α et dépend de la PI3K δ [310]. Récemment, des travaux montrent que le contrôle de la production de ROS par la PI3K γ pourrait être dû à son activité protéine kinase. L'interaction de la PI3K γ avec la PKC α conduit à une augmentation de l'activité de la PKC α qui est associée à une augmentation de la production de ROS stimulée par le fMLP [266].

II-2.4.PI3K γ et fonctions mastocytaires

Les réactions allergiques sont essentiellement dues à l'activation des mastocytes. Les mastocytes sont des cellules résidant dans les tissus, principalement les poumons, qui libèrent de l'histamine et de l'héparine contenues dans leurs granules et responsables des réactions allergiques inflammatoires telles que l'asthme. Ils expriment à leur surface le récepteur de haute affinité des IgE (Fc ϵ RI) dont l'agrégation par des complexes IgE-antigène induit l'activation des mastocytes et la phosphorylation par des tyrosines kinases de motifs ITAM dans la partie intracytoplasmique des récepteurs Fc ϵ RI. La cascade de tyrosine kinases activée conduit à la phosphorylation de nombreuses protéines, telles que la protéine adaptatrice Gab2 (Grb2-associated binder 2) [311], créant ainsi un site de fixation pour les PI3K de classe IA. La production de PIP₃ par la PI3K permet alors d'initier l'activation de Btk (Bruton's tyrosine kinase) et de la PLC γ (phospholipase C) qui conduit à l'activation des canaux calciques de la membrane plasmique et la dégranulation des mastocytes [312].

L'inhibition de l'activité PI3K γ réduit la dégranulation des mastocytes et les souris déficientes en PI3K γ sont résistantes au choc anaphylactique. Cette protection est due à un effet autocrine/paracrine d'agonistes de RCPG, tels que l'adénosine, permettant d'amplifier la libération d'histamine par les mastocytes [313]. De plus, Bohnacker *et al.* montrent l'importance de l'hétérodimère p110 γ /p84 (par rapport à p101) dans ce processus. Le PIP₃ produit par le complexe p110 γ /p101 est rapidement internalisé alors que le PIP₃ produit par p110 γ /p84 est maintenu à la membrane plasmique et permet la dégranulation, suggérant que ces deux mécanismes ont lieu dans des compartiments membranaires différents [256].

D'autres travaux ont rapporté l'implication de la PI3K δ dans l'allergie. Les souris exprimant une forme inactive de PI3K δ sont ainsi également protégées contre l'allergie anaphylactique [314] [315]. De plus, en utilisant des inhibiteurs spécifiquement dirigés contre les PI3K γ et δ ainsi que les souris déficientes pour la PI3K γ ou pour la PI3K δ , Ali *et al.* ont montré que seule l'isoforme δ des PI3K (et pas la PI3K γ) serait impliquée dans la réponse allergique dépendante de l'antigène *in vivo* [316]. Les différences de résultats obtenus entre Ali *et al.* et Laffargue *et al.* peuvent s'expliquer par l'utilisation de méthodes différentes. Ainsi, Ali *et al.* réalisent une injection intradermique d'IgE alors que Laffargue *et al.* injectent l'IgE en intraveineux. De plus, les quantités d'IgE et d'antigènes correspondants utilisées sont différentes dans les deux protocoles.

L'ensemble de ces données montrent donc l'importance des PI3K γ et PI3K δ dans l'activation des mastocytes et les phénomènes allergiques. Un modèle propose que les deux isoformes fonctionnent en cascade : la PI3K δ activée après stimulation des mastocytes serait nécessaire à une première vague de dégranulation. Puis, la sécrétion d'agonistes des RCPG contenus dans les granules permettrait l'activation de la PI3K γ responsable d'une deuxième vague de dégranulation et permettant une activation maximale des mastocytes (**Figure 29**).

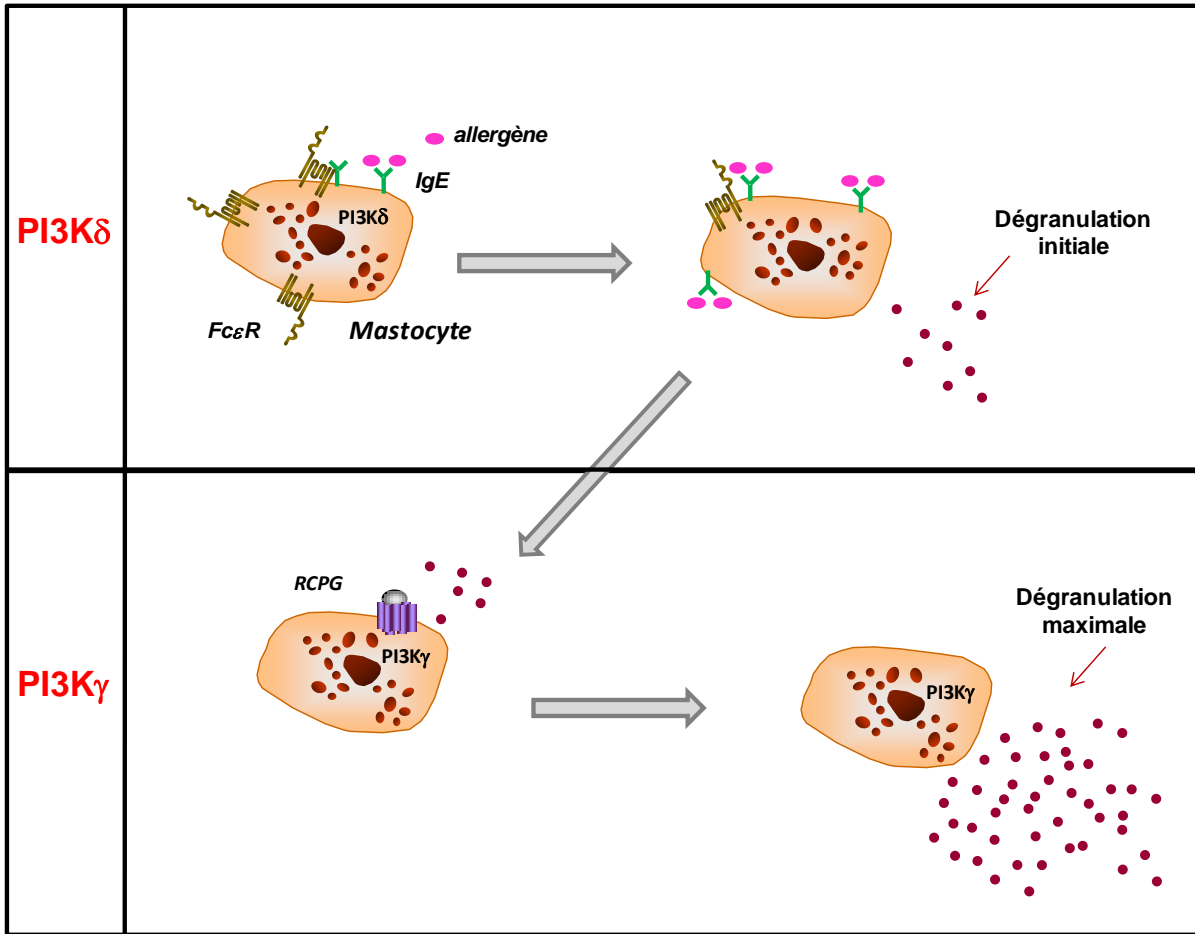


Figure 29 : Modèle proposé des rôles distincts de PI3K γ et δ dans l'activation des mastocytes. Les complexes IgE/allergène permettent le « clustering » des récepteurs de haute affinité aux IgE (Fc ϵ RI) et entraînent l'activation de PI3K δ . Cet événement est essentiel pour générer une réponse cellulaire qui initie le processus de dégranulation. La sécrétion d'agonistes de RCPG, contenus dans les granules, stimule l'activation de PI3K γ nécessaire à la dégranulation complète. Ainsi, si l'une ou l'autre des isoformes est absente, l'activation des mastocytes est diminuée. (D'après Hirsch E, *Thromb, Haemost*, 2006) [317]

II-2.5. PI3K γ et thrombose

Les plaquettes jouent un rôle central dans les phénomènes de thrombose en adhérant et s'agréant sur les sites de lésion vasculaire. Ces deux mécanismes sont contrôlés par des

voies de signalisation impliquant les PI3K. Bien que toutes les isoformes de PI3K soient exprimées dans les plaquettes, la PI3K β et la PI3K γ apparaissent essentielles dans l'activation plaquettaire. Les souris déficientes en sous-unité régulatrice p85, qui ont également une expression des sous-unités catalytiques p110 α , p110 β et p110 δ fortement diminuée, ne montrent pas de défaut d'agrégation plaquettaire en réponse à divers agonistes solubles pro-thrombotique (ADP, thromboxane A2, thrombine, facteur von Willebrand), suggérant une compensation par la PI3K γ . Cependant, l'agrégation plaquettaire en réponse au collagène est modifiée indiquant également l'implication de PI3K de classe IA [318]. A l'aide d'un inhibiteur spécifique de p110 β , Jackson *et al.* montrent que l'activité de la PI3K β est nécessaire au maintien de l'activation des intégrines α Ib β 3 et de l'agrégation induite par l'ADP ou par de faibles concentrations de différents agonistes solubles. De plus, l'inhibition de PI3K β empêche la formation de contacts stables dépendants des intégrines, conduisant ainsi à un défaut dans la formation du thrombus [319]. La PI3K β a été identifiée comme l'isoforme majeure responsable de l'activation des intégrines α Ib β 3 après stimulation par l'ADP [320]. Cependant, la PI3K γ serait également impliquée dans l'activation des intégrines α Ib β 3 en aval de P2Y12, coopérant ainsi avec la PI3K β . *In vivo*, la formation du thrombus est réduite chez les souris déficientes en PI3K γ et complètement abolie avec un inhibiteur de PI3K β [321]. Récemment la délétion de p110 β spécifiquement dans les plaquettes a confirmé le rôle central de cette isoforme dans la formation du thrombus [322]. De plus, les souris déficientes en PI3K γ présentent un défaut d'agrégation plaquettaire en réponse à l'ADP [323]. L'étude des mécanismes moléculaires montre une diminution de la phosphorylation d'Akt et de l'activation de α Ib β 3 en absence de PI3K γ . Les souris PI3K γ ^{-/-} sont protégées de l'occlusion vasculaire induite par l'injection d'ADP, du fait de la faible agrégation plaquettaire dans ce génotype sans toutefois présenter de modification du temps de saignement.

II-2.6. Conclusion

La PI3K γ joue un rôle essentiel dans les fonctions des différents types cellulaires du système immunitaire et fait l'objet d'un intérêt croissant ces dernières années dans les maladies inflammatoires et autoimmunes (**Figure 30**). Des premières études ont en effet montré les propriétés immunomodulatrices d'inhibiteurs spécifiques de cette isoforme dans diverses pathologies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux, l'athérosclérose (cf paragraphe III). Le rôle de la PI3K γ dans les différentes cellules pouvant

jouer un rôle dans les processus inflammatoires est d'un intérêt particulier dans les pathologies cardiovasculaires. En effet, comme décrit dans le chapitre précédent, l'inflammation joue un rôle central dans le développement de l'athérosclérose et de la resténose.

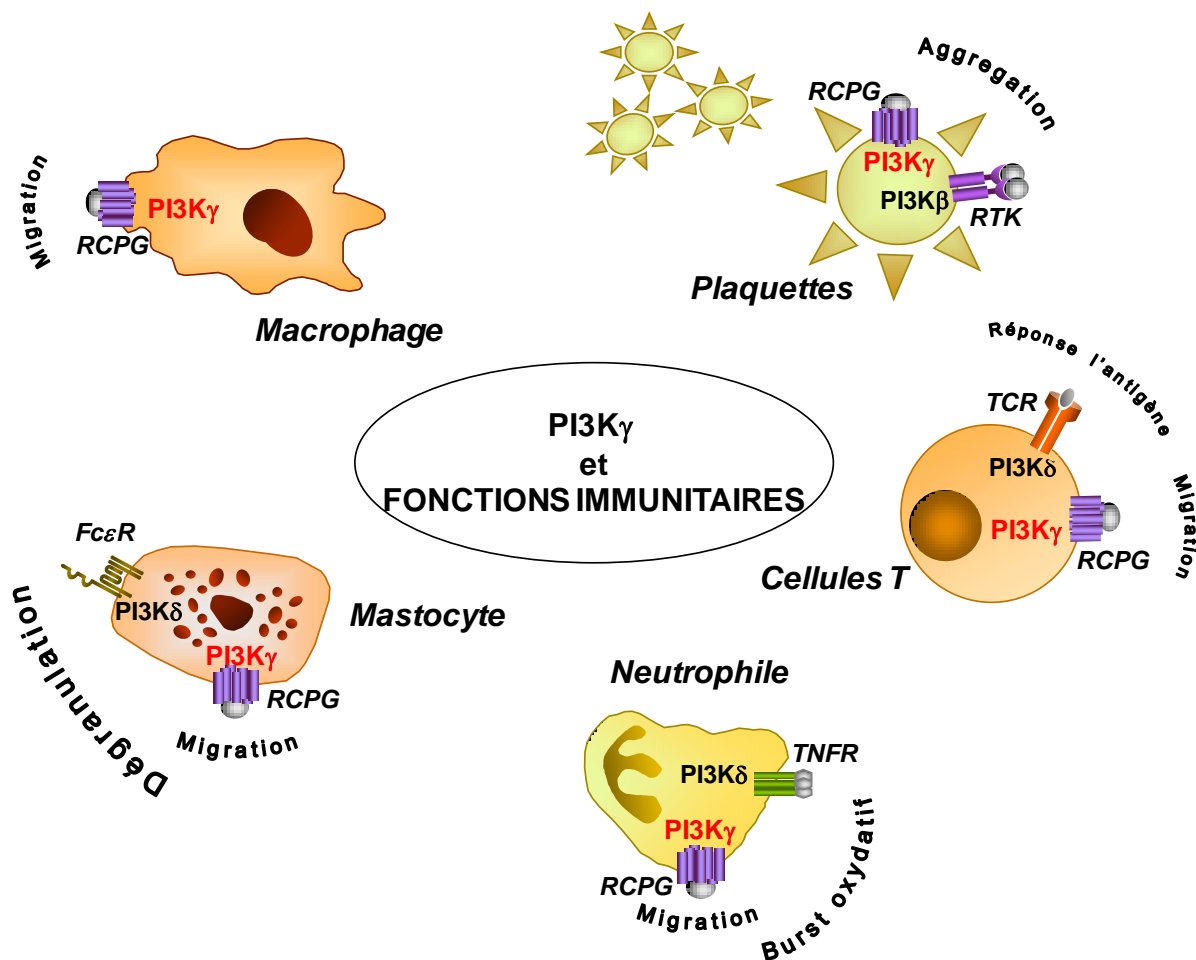


Figure 30 : Fonctions majeurs de la PI3K γ dans l'inflammation. La PI3K γ est exprimée dans les différents types de cellules immunitaires dans lesquels elle joue de nombreux rôles essentiels : recrutement des cellules inflammatoires, dégranulation des mastocytes, agrégation plaquettaire, « burst » des neutrophiles, fonctions des lymphocytes T. L'isoforme δ des PI3K est impliquée dans les mastocytes, les cellules T et les neutrophiles. La PI3K β est l'isoforme majeure impliquée dans l'agrégation des plaquettes. (D'après Fougerat A, 2008, *Clinical Science*) [66]

II-3. Fonctions de PI3K γ dans la paroi vasculaire

II-3.1. Fonctions de PI3K γ dans l'endothélium

La plupart des études concernant le rôle de la PI3K γ dans l'endothélium semblent indiquer que le blocage de son activité peut avoir des effets protecteurs dans le contexte de l'athérosclérose. En effet la PI3K γ , en modulant la signalisation induite par les sélectines, modifie l'interaction des leucocytes avec l'endothélium diminuant ainsi les processus inflammatoires. Les auteurs utilisent des souris PI3K $\gamma^{-/-}$ chimères dont les cellules du système immunitaire sont PI3K $\gamma^{+/+}$ afin de démontrer le rôle de la PI3K γ endothéliale dans l'infiltration des neutrophiles dans un modèle de lésion du poumon réalisé par inhalation de LPS [324]. Serban *et al.* montrent *in vitro* que la PI3K γ est impliquée dans la régulation de la perméabilité endothéliale induite par le VEGF et en aval de H-Ras [325]. Le rôle de la PI3K γ dans la perméabilité endothéliale a également été décrit dans un modèle *in vivo* de lésion oculaire induite par le laser. Dans ce modèle, l'inhibition pharmacologique de la PI3K γ conduit à une diminution de l'infiltration des macrophages, de la formation d'œdème et de la perméabilité endothéliale permettant de réduire les dommages rétinien, de la même manière que l'inhibition du VEGFR. Les auteurs montrent *in vitro* que dans les cellules endothéliales, la PI3K γ joue un rôle en aval de l'IL-8 *via* la voie de signalisation Akt/Rac1/PAK conduisant à la phosphorylation des VE-cadhérines, à la déstabilisation des jonctions intercellulaires et finalement à une augmentation de la perméabilité endothéliale [326].

La PI3K γ est également capable de réguler l'interaction des leucocytes avec l'endothélium dans un modèle d'ischémie reperfusion caractérisé par un stress oxydatif important, l'adhésion des neutrophiles et la migration trans-endothéliale des leucocytes. Dans ce contexte, Doukas *et al.* ont démontré qu'une inhibition sélective des PI3K γ et δ avec le TG100-115 administré pendant la phase de reperfusion pouvait réduire de façon importante la taille de l'infarctus chez le porc. Dans cette étude, les auteurs ont également examiné l'impact du TG100-115 sur la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogénèse induite par le VEGF, éliminant ainsi un effet négatif de cette molécule sur la réparation de l'endothélium [287]. La PI3K γ peut également jouer un rôle dans la néovascularisation, élément qui nous l'avons vu dans le chapitre 1 peut jouer un rôle protecteur de la paroi vasculaire ou déstabilisant de la plaque d'athérome. Toutefois les résultats concernant le rôle de l'activité PI3K γ dans ce mécanisme sont controversés. Ainsi, en utilisant des progéniteurs endothéliaux

déficients en PI3K γ , Chavakis *et al.* ont montré que la PI3K γ de ces cellules progénitrices pouvait participer à la néovascularisation dans un modèle d'ischémie de la patte [327]. Parallèlement, Maddedu *et al.* ont démontré que la néovascularisation réparatrice du muscle ischémique n'était pas modifiée chez les souris exprimant une forme catalytiquement inactive de la PI3K γ indiquant que les effets observés pouvaient être attribués à la protéine et non à son activité [328].

Une seule étude récente montre un effet aggravant de l'inhibition de la PI3K γ sur la cicatrisation dans un modèle *in vivo* d'infarctus du myocarde chez la souris. Dans ce modèle, l'inhibition spécifique de la PI3K γ avec l'AS-605240 réduit l'inflammation, mais d'autre part augmente l'apoptose des cardiomyocytes, et empêche la survie et la prolifération des cellules endothéliales dans la zone péri-infarct. L'ensemble de ces mécanismes conduit à un défaut de néovascularisation réparatrice ayant pour conséquence une augmentation de la taille de l'infarctus et une diminution des fonctions ventriculaires gauches [329]. Ces résultats sont en contradiction avec ceux décrits par Maddedu *et al.* puisque la néovascularisation dans ce modèle semble impliquer l'activité de la PI3K γ et non son rôle de protéine adaptatrice [328]. Toutefois ces données ont été obtenues dans deux contextes physiopathologiques différents pouvant expliquer ces différences : ischémie du muscle [328] *versus* infarctus du myocarde [329].

Enfin, la PI3K γ dans les cellules endothéliales pourrait jouer un rôle dans la production de NO, élément protecteur de la paroi vasculaire. Après activation par différents facteurs tels que l'IGF-1 [330], l'insuline [331] [332], la S1P [333] ou le VEGF [334], la voie PI3K/Akt stimule la NOS endothéliale ou eNOS qui produit du NO par oxydation de la L-arginine dépendante du NADPH. Cieslik *et al.* identifient la PI3K γ comme un acteur essentiel de la voie de signalisation conduisant à l'activation de la eNOS dans des cellules endothéliales stimulées par la lysophosphatidylcholine [335].

Ainsi, les résultats de l'ensemble de ces travaux sont parfois contradictoires et dépendent du modèle utilisé. Des études supplémentaires apparaissent donc nécessaires pour déterminer l'implication de la PI3K γ dans ces processus et mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans le « homing » des EPC dans les tissus ischémiques. De plus, bien que les différents travaux suggèrent un rôle de la PI3K γ dans l'angiogénèse, l'implication de son

activité kinase ou de son rôle de protéine adaptatrice reste à déterminer. Finalement, aucune étude ne reporte le rôle de la PI3K γ sur la cicatrisation artérielle.

II-3.2. Fonctions de PI3K γ dans les cellules musculaires lisses vasculaires

Les CML régulent l'élasticité et assurent le maintien du tonus vasculaire de la paroi artérielle normale. La prolifération et la migration des CML sont impliquées dans le développement et la progression de l'athérosclérose ainsi que dans le phénomène de resténose (cf chapitre 1). De nombreux travaux ont démontré l'importance d'une activité PI3K dans la prolifération des CML mais peu de données renseignent sur l'isoforme impliquée. La PI3K γ est quant à elle plus particulièrement impliquée dans la contraction de ces cellules.

➤ Contraction

La voie PI3K/Akt joue un rôle essentiel dans l'augmentation du calcium intracellulaire indispensable à la contraction des CML [336]. En effet la PI3K, par l'intermédiaire d'Akt, phosphoryle les canaux calciques de type L permettant ainsi leur translocation à la membrane et une entrée de calcium dans la cellule [337]. L'angiotensine II est un puissant vasoconstricteur capable d'activer la voie PI3K/Akt et les courants calciques de type L dans les CML [338] [339]. Des travaux effectués *in vitro* ont montré l'implication de l'isoforme γ de PI3K dans ce phénomène [340]. De plus, la contractilité induite par l'angiotensine II de vaisseaux isolés à partir de souris déficientes en PI3K γ est réduite, de même que la production de ROS et la mobilisation du calcium intracellulaire. Cette étude montre également que les souris déficientes en p110 γ sont protégées de l'hypertension induite par l'angiotensine II [341].

➤ Prolifération et migration

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédent (chapitre I, paragraphes II-3.3. et III-3.3.), la prolifération et la migration des CML jouent un rôle fondamental dans le développement de l'athérosclérose et de la resténose intra-stent. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a rapporté l'implication de la PI3K γ dans ces processus. En revanche, il est clairement admis que la voie PI3K/Akt joue un rôle dans la prolifération/migration des CML bien que l'implication de l'une ou l'autre des isoformes de PI3K reste à définir.

La progression du cycle cellulaire dans les CML est associée à une activation de facteurs de transcription qui dépend de la voie mTOR/p70S6K. L'utilisation d'un inhibiteur de mTOR,

la rapamycine, permet ainsi d'inhiber la prolifération des CML [342]. De plus, il est maintenant clairement admis que PI3K/Akt est un activateur de mTOR dans les CML. Ainsi, l'inhibition pharmacologique de PI3K diminue la prolifération des CML de la même façon que la rapamycine [343]. La rapamycine, utilisée pour recouvrir les stents, a montré son efficacité dans la prévention de la resténose intra-stent en bloquant l'hyperplasie intimale [344]. Des travaux antérieurs du laboratoire ont également montré l'importance d'une activité PI3K dans la transition G1/S du cycle cellulaire des CML [345]. D'autres études montrent l'implication des PI3K dans la prolifération et la migration de CML pulmonaires humaines [346]. Récemment, des travaux ont montré que l'absence d'Akt1 dans les CML conduit à une diminution de la prolifération et de la migration de ces cellules ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose suggérant que Akt1 est l'isoforme majeure impliquée dans ces processus cellulaires. De plus, les auteurs montrent que l'absence d'Akt chez des souris susceptibles à l'athérosclérose (ApoE^{-/-}/Akt1^{-/-}) induit une déstabilisation de la plaque par rapport aux souris contrôles (ApoE^{-/-}/Akt1^{+/+}), caractérisée par une augmentation des cores nécrotiques, une diminution de la chape fibreuse et du contenu en collagène [347].

Des travaux effectués au laboratoire ont permis d'identifier la PI3K γ dans le noyau et le cytoplasme des CML [348]. Cependant, le rôle de cette isoforme ainsi que l'importance de sa localisation nucléaire n'ont pas été déterminés. Nos travaux, qui seront présentés et discutés dans la partie « résultats expérimentaux » ont permis de montrer que la PI3K γ joue un rôle crucial dans la migration des CML en réponse à MCP-1 et indirectement en aval du PDGF.

III- Inhibiteurs pharmacologiques de PI3K

L'utilisation de modèles de souris génétiquement modifiée a permis de valider partiellement certaines isoformes de PI3K comme cible thérapeutique. La wortmannine et le LY294002, deux inhibiteurs « classiques » de PI3K utilisés largement *in vitro*, ont également contribué à la compréhension des rôles de PI3K dans diverses pathologies (**Figure 31**).

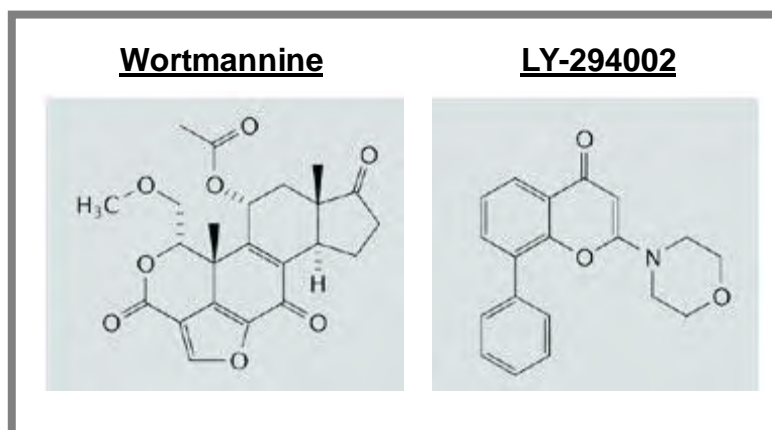


Figure 31 : Inhibiteurs « classiques » de toutes les isoformes de PI3K : Wortmannine et LY294002. (D'après Rückle, T., 2006, *Nature Reviews*) [349]

La wortmannine est un métabolite d'origine fongique, isolé à partir de *Penicillium wortmanni*, qui inhibe toutes les classes de PI3K à des concentrations de l'ordre du nanomolaire [350]. Le LY294002 est quant à lui un composé synthétique, actif à des concentrations de l'ordre du micromolaire et beaucoup plus stable que la wortmannine [351]. Ces deux molécules sont des inhibiteurs compétitifs du site de liaison à l'ATP. Ces composés présentent une toxicité cellulaire importante et entraînent de nombreux effets secondaires dus au fait qu'ils ciblent toutes les isoformes de PI3K ainsi que de nombreuses enzymes apparentées aux PI3K (TOR, DNA-PK, ATM, ATR, PI4K).

La deuxième génération d'inhibiteurs [352] comprend des composés moins toxiques et plus stables mais qui ciblent toujours plusieurs PI3K (**Tableau 9**). Parmi ces composés, le PI-103, beaucoup plus stable que le LY294002, cible de façon efficace les PI3K de classe I et mTOR. Le PI-103 a montré une activité anti-tumorale dans de nombreux modèles de xéno greffe et est actuellement en essai clinique pour le cancer [353]. Par exemple, la molécule BEZ235 (Novartis), qui inhibent toutes les PI3K ainsi que mTOR, a passé toutes les études de toxicité précliniques et est entré en phase clinique pour les tumeurs solides [354]. De même les composés XL147 et XL765 (Exelixis) inhibent PI3K et mTOR et ont montré leur efficacité seul ou en combinaison avec la chimiothérapie dans des modèles de xéno greffe. Ils sont en étude clinique (phase I) pour le traitement des tumeurs solides et XL147 est également en phase II dans le cancer de l'endomètre. Bien que non spécifique d'une isoforme en particulier de PI3K, cette seconde génération d'inhibiteurs apparaît prometteuse [262].

Les compagnies pharmaceutiques se concentrent néanmoins à présent au développement de nouvelles molécules dirigées spécifiquement contre une isoforme de PI3K (**Tableau 9**).

Les premiers inhibiteurs spécifiques ont été développés par « ICOS Corporation » et ciblent la PI3K δ (PIK-23, PIK-39, IC87114). En particulier, l'IC87114 inhibe spécifiquement la p110 δ et a notamment permis de démontrer le rôle de la PI3K δ dans la leucémie myéloïde aigue [355] [356], dans l'arthrite rhumatoïde [357] et dans l'asthme [315]. Une autre molécule qui inhibe spécifiquement la PI3K δ , XL499 (Exelixis), est également en étude préclinique pour le cancer et l'inflammation.

Le TGX-221 est un composé perméable, analogue du LY294002 qui inhibe spécifiquement la PI3K β (1000 fois plus que PI3K α) à des concentrations de l'ordre du nanomolaire. *In vivo*, le TGX-221 prévient la formation du thrombus, plaçant la PI3K β comme cible préférentielle dans la recherche de traitements anti-thrombotiques [319].

Les laboratoires Merck-Serono ont développé une série de composés, dérivés des thiazolidinediones, qui inhibent spécifiquement la PI3K γ (AS-252424, AS-605240, AS-604850). Différentes études ont permis de montrer que ces inhibiteurs possèdent des propriétés immuno-modulatrices, suggérant que la PI3K γ représente une cible intéressante dans le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques. Dans un modèle murin d'arthrite rhumatoïde, l'administration par voie orale de l'AS-605240 induit une diminution de la migration des neutrophiles conduisant à une diminution de l'accumulation des neutrophiles et à la protection de la maladie [300]. Plus récemment, la PI3K γ a également montré un rôle dans cette pathologie dans les dommages du cartilage *via* la régulation de l'expression de MMP dans les fibroblastes et les chondrocytes [358]. L'injection intrapéritonéale de l'AS-605240 dans un modèle de lupus érythémateux chez la souris réduit la glomérulonéphrite en diminuant le nombre de lymphocytes T CD4+ mémoires [301]. Dans un modèle de fibrose pulmonaire chez le rat, l'administration orale de l'AS-605240 réduit le dépôt de collagène ainsi que l'inflammation des poumons en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires et l'infiltration des leucocytes [359]. L'inhibition pharmacologique de la PI3K γ conduit à une diminution du recrutement et du maintien de l'inflammation dépendante des éosinophiles dans un modèle d'inflammation allergique chez la souris [360]. Récemment, l'AS-605240 a permis de montrer l'implication de la PI3K γ dans la neuro-inflammation. Ainsi, dans un modèle de la maladie d'Alzheimer induite chez la souris, l'inhibition pharmacologique de la PI3K γ induit une diminution de l'activation des astrocytes et du recrutement des macrophages [303]. De plus, nous avons récemment utilisé ce composé pour démontrer le rôle spécifique de la PI3K γ dans le développement de

l'athérosclérose. L'inhibition de PI3K γ chez la souris conduit à une diminution de l'infiltration des macrophages et des lymphocytes dans les lésions athéromateuses [302].

Targegen a développé également le TG100-115, un inhibiteur sélectif des PI3K γ et δ , qui bloque la formation d'œdème et l'inflammation dans un modèle d'infarctus du myocarde [287]. Ce composé a également montré son efficacité dans les maladies respiratoires telles que l'asthme [361]. Le TG100-115 est le premier inhibiteur spécifique d'isoformes de PI3K qui est entré en phase clinique ; il est actuellement en phase II pour l'infarctus du myocarde [362].

Cible	Composé	Compagnie
Pan-PI3K	PI-103	Yamanouchi
p110 α /p110 γ	PIK-90	Bayer
p110 β /p110 δ	PIK-108	Thrombogenix
	TGX-115	Kinacia
p110 α	PIK-75	Yamanouchi
p110 β	TGX-221	Kinacia
p110 δ	IC-87114	ICOS
	PIK-39	
	XL-499	Exelixis
p110 γ	AS-252424	Serono
	AS-605240	
	AS-604850	
p110 γ /p110 δ	TG110-115	Targegen

Tableau 9 : Nouvelle génération d'inhibiteurs de PI3K. (D'après Hirsch, E., 2008, *Pharmacology and Therapeutics*) [363]

Le développement pharmaceutique des inhibiteurs de PI3K a connu un grand essor ces cinq dernières années. Plusieurs composés sont en essais cliniques pour les thérapies anti-cancéreuses, l'inflammation et l'infarctus du myocarde (**Figure 32**).



Inflammation				Cancer			
Cible	Composé	Processus inhibé	Applications thérapeutiques	Cible	Composé	Processus inhibé	Applications thérapeutiques
Pan-PI3K	Wortmannine	Dégranulation éosinophiles	Allergie asthme	Pan-PI3K	Wortmannine LY294002	Prolifération et survie cellulaire	Cancer
Pan-PI3K	LY-294002	Infiltration éosinophiles	Allergie asthme				
p110 δ	IC87114	Dégranulation mastocytes	Allergie asthme	Pan-PI3K	PI-103	Invasion tumorale Vascularisation	Cancer
p110 γ	AS-605240	Recrutement neutrophiles	Arthrite Rhumatoïde Lupus érythémateux	p110 β ?	TGX-115	Prolifération cellulaire	Cancer
		Recrutement macrophages	Maladie d'Alzheimer	p110 α	PIK-90	Prolifération cellulaire	Cancer
		Infiltration macrophages/LT	Athérosclérose				
p110 γ	AS-604850	Recrutement neutrophiles	Arthrite Rhumatoïde				
p110 γ /p110 δ	TG100-115	Recrutement neutrophiles	Infarctus du myocarde				

Figure 32 : Potentiel thérapeutique de l'inhibition des PI3K de classe I. L'altération d'une ou plusieurs isoformes de PI3K est très souvent associée à diverses pathologies. L'inhibition des enzymes de classe I ou d'une isoforme particulière de PI3K représente une stratégie de choix dans le traitement de nombreuses pathologies, notamment le cancer et les maladies inflammatoires chroniques. Les inhibiteurs de ces kinases développés récemment ainsi que leurs applications thérapeutiques sont résumés dans cette figure. (D'après Hirsche, E., 2008, *Pharmacology and Therapeutics*) [363]

IV- Conclusion

L'ensemble de ces données met en évidence les nombreux rôles de la PI3K γ dans les différents types cellulaires composant la paroi vasculaire. La PI3K γ apparaît particulièrement intéressante dans un contexte thérapeutique et fait déjà l'objet d'un intérêt croissant dans le traitement des pathologies inflammatoires (**Figure 33**). De plus, bien que son rôle dans les cellules endothéliales reste à préciser, son implication dans la contraction des CML et dans la fibrose cardiaque font de cette kinase une cible potentielle en thérapie cardiovasculaire. Mon travail de thèse a permis d'apporter des données supplémentaires quant au rôle de la PI3K γ dans les pathologies de la paroi artérielle comme l'athérosclérose et la resténose. Ces résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

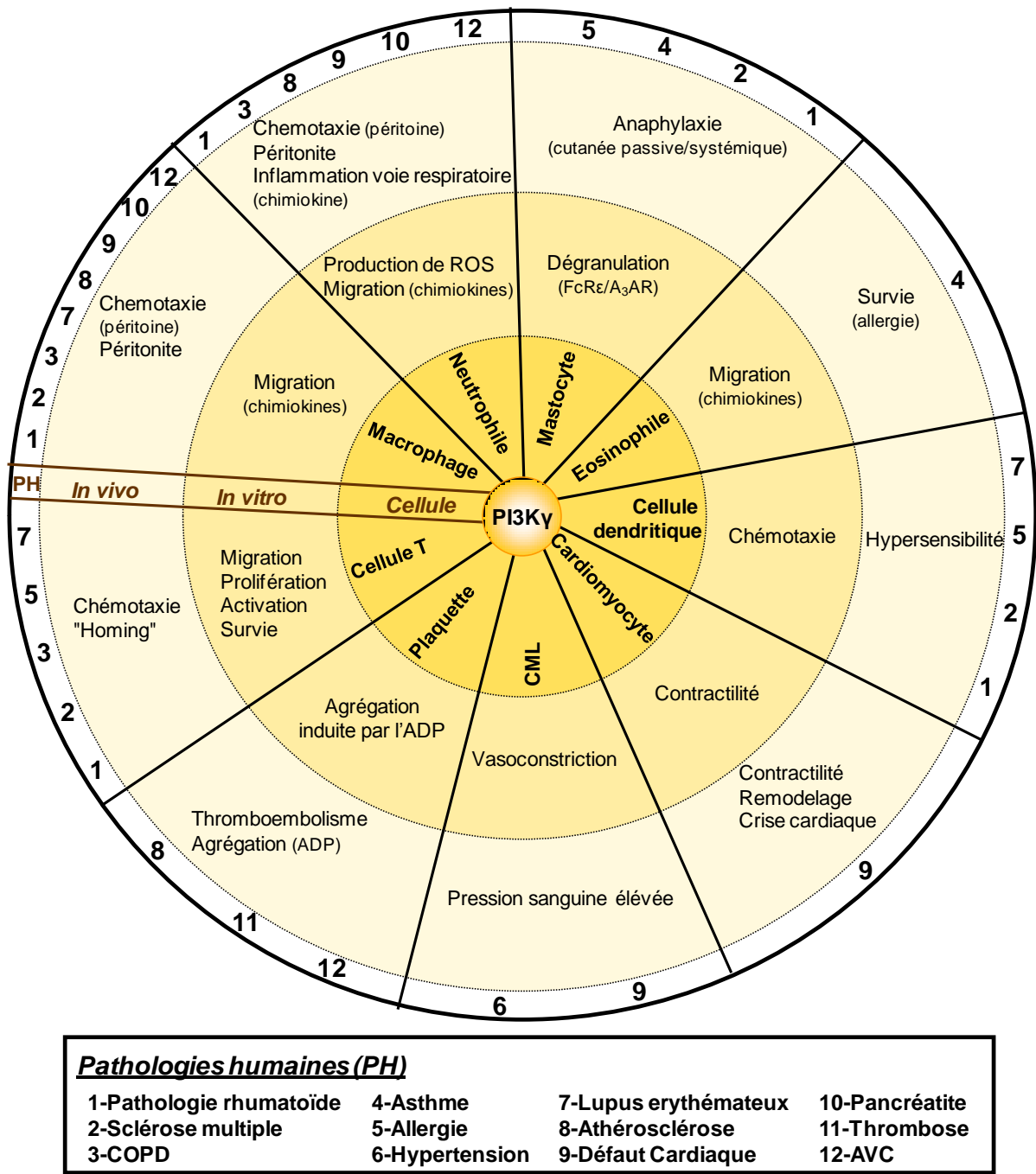


Figure 33 : Inhibition de PI3K γ et pathologies humaines. Cette figure compile les processus qui dépendent de l'activité PI3K γ avec du centre à la périphérie du cercle : le type cellulaire considéré, les fonctions cellulaires *in vitro* associées et les modèles animaux testés. Le dernier cercle correspond à la combinaison de plusieurs processus, dans lesquels la PI3K γ est impliquée, et pouvant être extrapolés à une pathologie humaine multifactorielle. (D'après Rückle, T., 2006, Nature Reviews) [349]

PARTIE II : Résultats expérimentaux

Article 1 : rôle de la PI3K γ dans les processus inflammatoires contrôlant l'athérosclérose

I- Introduction

Comme nous l'avons largement décrit lors de l'introduction bibliographique, l'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique de la paroi artérielle dans laquelle le système immunitaire intervient à plusieurs niveaux et joue un rôle prépondérant dans l'initiation de la maladie. En effet, les cellules inflammatoires et les médiateurs immuns (cytokines et chimiokines) sont impliqués dans la formation de la strie lipidique et participent également à la modulation phénotypique des CML qui vont acquérir un phénotype migratoire et prolifératif aboutissant à l'hyperplasie intimale et formant la chape fibreuse. Par ailleurs, la génération de souris déficiente en PI3K γ a permis de montrer que les voies de signalisation impliquant cette kinase, qui agit *via* les RCPG, modulent de nombreuses fonctions immunitaires telles que le recrutement des cellules inflammatoires, la dégranulation des mastocytes, l'agrégation plaquettaire ainsi que les fonctions des cellules T [66]. Lorsque nous avons débuté ce travail, des études pharmacologiques avaient démontré les propriétés immuno-modulatrices d'un inhibiteur spécifique de la PI3K γ , plaçant cette isoforme comme un bon candidat dans la recherche de nouvelles thérapies pour le traitement des pathologies auto-immunes. Ainsi, dans un modèle murin d'arthrite rhumatoïde, l'administration orale d'un inhibiteur de la PI3K γ prévient de la maladie et est associée à un défaut de migration des neutrophiles [300]. De même, l'injection intrapéritonéale de l'inhibiteur de la PI3K γ dans un modèle de lupus érythémateux induit chez la souris conduit à une diminution des lymphocytes T CD4⁺ corrélée à une diminution de la sévérité de la maladie [301]. La PI3K γ est majoritairement exprimée dans les cellules hématopoïétiques mais des études récentes ont mis à jour un profil d'expression plus complexe de cette isoforme en montrant en particulier de faibles taux d'expression dans le système cardiovasculaire. L'activité PI3K γ joue un rôle

important dans les mécanismes de remodelage cardiaque et il a également été identifié dans les cardiomyocytes son rôle de protéine adaptatrice dans la contractilité cardiaque [276]. De plus, son expression dans les cellules composant la paroi artérielle (cellules endothéliales et CML) présente un intérêt particulier puisque les souris déficientes en PI3K γ présentent une modification de l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium *via* l'expression des sélectines [324] et sont protégées de l'hypertension induite par une exposition chronique à l'angiotensine II [341].

L'ensemble de ces données, exposé en détail dans les chapitres précédents, nous ont conduit à émettre l'hypothèse que l'inhibition de l'activité PI3K γ pouvait réduire le développement de la plaque d'athérome. Aucune donnée n'existait concernant le rôle de cette enzyme dans le contrôle des processus athéromateux. Afin de démontrer le rôle possible de la PI3K γ dans le développement de la plaque d'athérome, nous avons utilisé deux approches : une approche pharmacologique utilisant un inhibiteur spécifique de la PI3K γ , l'AS-605240 (en collaboration avec les laboratoires Merck-Serono) et une approche génétique avec des souris invalidées pour la PI3K γ disponibles à mon arrivée au laboratoire. Deux modèles de souris athéromateuses ont été utilisés : des souris ApoE^{-/-} et des souris déficientes LDLR^{-/-}. Nous avons également réalisé un modèle de souris chimères, athéromateuses et dépourvues de la PI3K γ dans le système immunitaire par injection rétro-orbitale de moelle osseuse de souris PI3K γ ^{-/-} sur des souris LDLR^{-/-} préalablement irradiées afin d'étudier le rôle spécifique de la PI3K γ au sein du système immunitaire dans le développement de la pathologie. Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 1.

II- Résultats

Genetic and pharmacological targeting of phosphoinositide 3-kinase- γ reduces atherosclerosis and favors plaque stability by modulating inflammatory processes.

Anne Fougerat, MSc; Stéphanie Gayral, PhD; Pierre Gourdy, MD, PhD; Alexia Schambourg, MSc; Thomas Rückle, PhD; Matthias K. Schwarz, PhD; Christian Rommel, PhD; Emilio Hirsch, PhD; Jean-François Arnal, MD, PhD; Jean-Pierre Salles, MD, PhD; Bertrand Perret, MD, PhD; Monique Breton-Douillon, PhD; Matthias P. Wymann, PhD; Muriel Laffargue, PhD.

Circulation. 2008 ; 117 :1310-1317.

Genetic and Pharmacological Targeting of Phosphoinositide 3-Kinase- γ Reduces Atherosclerosis and Favors Plaque Stability by Modulating Inflammatory Processes

Anne Fougerat, MSc*; Stéphanie Gayral, PhD*; Pierre Gourdy, MD, PhD; Alexia Schambourg, MSc; Thomas Rückle, PhD; Matthias K. Schwarz, PhD; Christian Rommel, PhD; Emilio Hirsch, PhD; Jean-François Amal, MD, PhD; Jean-Pierre Salles, MD, PhD; Bertrand Perret, MD, PhD; Monique Breton-Douillon, PhD; Matthias P. Wymann, PhD; Muriel Laffargue, PhD

Background—The role of inflammation at all stages of the atherosclerotic process has become an active area of investigation, and there is a notable quest for novel and innovative drugs for the treatment of atherosclerosis. The lipid kinase phosphoinositide 3-kinase- γ (PI3K γ) is thought to be a key player in various inflammatory, autoimmune, and allergic processes. These properties and the expression of PI3K γ in the cardiovascular system suggest that PI3K γ plays a role in atherosclerosis.

Methods and Results—Here, we demonstrate that a specific PI3K γ inhibitor (AS605240) is effective in murine models of established atherosclerosis. Intraperitoneal administration of AS605240 (10 mg/kg daily) significantly decreased early atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice and attenuated advanced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. Furthermore, PI3K γ levels were elevated in both human and murine atherosclerotic lesions. Comparison of low-density lipoprotein receptor-deficient mice transplanted with wild-type or PI3K γ -deficient bone marrow demonstrated that functional PI3K γ in the hematopoietic lineage is required for atherosclerotic progression. Alleviation of atherosclerosis by targeting of PI3K γ activity was accompanied by decreased macrophage and T-cell infiltration, as well as increased plaque stabilization.

Conclusions—These data identify PI3K γ as a new target in atherosclerosis with the potential to modulate multiple stages of atherosclerotic lesion formation, such as fatty streak constitution, cellular composition, and final fibrous cap establishment. (*Circulation*. 2008;117:1310-1317.)

Key Words: phosphoinositide 3-kinase- γ ■ atherosclerosis ■ inflammation ■ leukocytes ■ fibrous cap

Atherosclerosis is a chronic disease of large arteries and is the primary cause of myocardial infarction and stroke. Atherosclerosis is the underlying cause of \approx 50% of all deaths in most occidental countries and is increasing dramatically in

Clinical Perspective p 1317

developing countries. The disease starts with the formation of fatty streaks and culminates with plaque disruption, thrombosis, and cardiac infarction.¹ The role of inflammation at all stages of the atherosclerotic process has become an active area of investigation, and there is a growing quest for novel and innovative drugs for the treatment of atherosclerosis.²

Vascular cells release chemokines, which recruit immune cells by their action on the G-protein-coupled receptor family.¹ Via phosphoinositide 3-kinase γ (PI3K γ), G-protein-coupled receptors regulate several inflammatory and immune functions, eg, recruitment of macrophages, neutrophils, and lymphocytes,³⁻⁵ mast cell reactivity,⁶ platelet aggregation,⁷ and T-cell function,⁵ as demonstrated in mice lacking functional PI3K γ .⁸ The γ -isoform belongs to the class I PI3K family, which includes 2 subclasses: class IA (α , β , and δ), activated via the tyrosine kinase receptor, and class IB (γ), mainly activated by G-protein-coupled receptors.⁸ Initial studies proposed that PI3K γ -selective inhibitors possess im-

Received June 8, 2007; accepted December 27, 2007.

From INSERM U563, Département Lipoprotéines et Médiateurs Lipidiques, Toulouse, France (A.F., S.G., J.-P.S., B.P., M.B.-D., M.L.); Université Paul Sabatier-Toulouse III, Toulouse, F-31000 France (A.F., S.G., P.G., A.S., J.-F.A., J.-P.S., B.P., M.B.-D., M.L.); CHU Toulouse, Hôpital des Enfants, Unité d'Endocrinologie, Toulouse, F31000 France (J.-P.S.); INSERM U858, Institut de Médecine Moléculaire de Rangueil, Toulouse, France (P.G., A.S., J.-F.A.); CHU Toulouse, Hôpital de Rangueil, Département Explorations fonctionnelles physiologiques, Toulouse, F-31000 France (J.-F.A.); CHU Toulouse, Hôpital de Rangueil, Service Diabétologie-Maladies Métaboliques-Nutrition, Toulouse, F-31000 France (P.G.); CHU Toulouse, Hôpital Purpan, Institut Fédératif de Biologie, Laboratoire de Biochimie, Toulouse, F-31000 France (B.P.); Merck Serono Geneva Research Center, Geneva, Switzerland (T.R., M.K.S., C.R.); University of Turin, Department of Genetics, Biology and Biochemistry, Turin, Italy (E.H.); and Institut of Biochemistry and Genetics, University of Basel, Department of Biomedicine, Basel, Switzerland (M.P.W.).

*The first 2 authors contributed equally to this work.

Correspondence to Muriel Laffargue, INSERM U563, Département Lipoprotéines et Médiateurs Lipidiques, Toulouse-Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France. E-mail muriel.laffargue@toulouse.inserm.fr

© 2008 American Heart Association, Inc.

Circulation is available at <http://circ.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.720466

munomodulatory potential, pinpointing PI3K γ as a good candidate for drug development in chronic inflammation and autoimmune diseases.⁹ In murine models of rheumatoid arthritis, oral administration of selective PI3K γ inhibitors successfully prevented progression of joint inflammation and neutrophil accumulation.¹⁰ Moreover, it has been demonstrated that intraperitoneal administration of PI3K γ inhibitor in a murine model of systemic lupus erythematosus led to a reduction in pathogenic CD4⁺ memory cells, which resulted in a blockade of glomerulonephritis and an extended lifespan.¹¹ PI3K γ expression is high in hematopoietic cells, but recent studies have demonstrated low levels of PI3K γ in endothelial cells,¹² cardiomyocytes,¹³ and smooth muscle cells.¹⁴ PI3K γ expression in arterial cells is of particular interest because mice that lack PI3K γ showed modified E-selectin-dependent adhesion of neutrophils to endothelial cells¹² and were protected against the hypertensive damage of chronic angiotensin II exposure.¹⁴ Here, we demonstrate that inhibition of PI3K γ alleviates atherosclerotic plaque development in 2 murine models of atherosclerosis. Furthermore, we provide evidence that loss of PI3K γ function in the hematopoietic lineage is sufficient to explain the observed antiatherosclerotic effect.

Methods

Biological Materials

Human carotid artery sections were obtained from surgical pieces of endarterectomy procedures performed in patients with carotid stenosis in the Department of Vascular Surgery, Toulouse University Hospital. PI3K γ -deficient mice generated previously on a 129sv inbred genetic background⁵ were backcrossed for 10 generations onto the C57Bl/6 background. The resulting heterozygotes for PI3K γ were intercrossed to obtain PI3K $\gamma^{+/+}$ and PI3K $\gamma^{-/-}$ littermates. As models of in vivo atherosclerosis, C57Bl/6 ApoE^{-/-} mice and C57Bl/6 low-density lipoprotein receptor-deficient (LDLR^{-/-}) mice were obtained from Charles River Laboratories, (Wilmington, Mass). To inhibit PI3K γ , we used AS605240 from Merck Serono (Geneva, Switzerland).¹⁰ AS605240 was used as described previously.¹¹ Experiments were performed in accordance with institutional guidelines and national legislation.

Bone Marrow Transplantation

Eight-week-old C57Bl/6 LDLR^{-/-} mice were subjected to medullary aplasia by 9-Gy lethal total-body irradiation. We repopulated mice with intravenous injection of bone marrow cells isolated from femurs and tibias of donor PI3K $\gamma^{+/+}$ and PI3K $\gamma^{-/-}$ littermates. After 6 weeks of recovery, mice were fed a proatherogenic diet (15% fat, 1.25% cholesterol, 0% cholate) for an additional 10 weeks. Mice were euthanized at 24 weeks of age. Blood and tissues were collected as described below.

Tissue Preparation and Characterization of Atherosclerotic Lesions

Hearts were removed and aortic root sections prepared as described previously.¹⁵ Surface lesion area was measured after oil red O staining by computer-assisted image quantification with Leica QWin software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Images were captured with a Sony (Tokyo, Japan) 3CCD video camera. Collagen fibers were stained with Sirius red. At least 5 sections per mouse were examined for each staining.

Immunohistochemistry

Frozen sections from the aortic root were fixed in acetone/methanol, air-dried, and incubated with 10% of relevant serum for 30 minutes.

For mouse primary antibodies on murine tissues, a mouse Ig-blocking reagent was used (Vector mouse-on-mouse [M.O.M.] immunodetection kit, Vector Laboratories, Burlingame, Calif). The following specific primary antibodies were used: clone MOMA-2 (Serotec, Oxford, United Kingdom) for macrophage staining; anti-CD3 (clone M-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif); anti-PI3K γ ,¹⁴ anti-P-PKB Ser¹⁷³ (immunohistochemistry specific), and anti-PKB (pan; Cell Signaling, Danvers, Mass); and anti- β -actin (clone 1A4, Sigma, St Louis, Mo). Then, sections were incubated with the corresponding secondary biotinylated antibodies (Vector Laboratories) and visualized with an avidin-biotin-horse-radish peroxidase complex (Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) and DAB peroxidase substrate kit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Counterstaining was performed with Mayer's hematoxylin. Irrelevant IgGs were used as negative controls.

Analysis of Plasma Lipids and Lipoproteins

Cholesterol, triglyceride, and HDL levels were measured with commercial kits (CHOD-PAP for cholesterol and GPO-PAP for triglycerides; Randox Laboratories, Crumlin, County Antrim, Ireland). LDL/VLDL level was obtained by determining the difference between total cholesterol and HDL cholesterol.

Statistical Analysis

Comparisons between the different groups were performed with a Student *t* test for unpaired data. Statistical differences were considered significant for probability values <0.05. Data are shown as mean \pm SEM.

The authors had full access to the data and take full responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written.

Results

Inhibitor of PI3K γ Reduces Early Atherosclerotic Lesions in ApoE^{-/-} Mice

To investigate the potential role of PI3K γ activity in processes that lead to atherosclerosis, we treated mice with a selective inhibitor of PI3K γ , AS605240, which was injected intraperitoneally at 10 mg/kg daily. Apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice develop spontaneous atherosclerotic lesions that are well characterized as a model for the early stage of atherosclerosis. Monocyte adhesion and migration occur between weeks 7 and 10, whereas foam cell lesions form during week 9.¹⁶ Eight-week-old ApoE^{-/-} mice were injected with PI3K γ inhibitor or vehicle for 5 weeks. To control AS605240 specificity, we investigated PKB phosphorylation, the main downstream target of PI3K, in monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)- and granulocyte and macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)-stimulated leukocytes from AS605240- or vehicle-treated mice. We observed that PKB phosphorylation by MCP-1, known to directly recruit PI3K γ , was dramatically reduced in leukocytes from AS605240-treated mice (93.2 \pm 8.7%; Figure 1A). In contrast, stimulation by GM-CSF, an activator of class IA PI3K, did not result in any significant variation of PKB phosphorylation in leukocytes from AS605240-treated mice compared with vehicle-treated mice (Figure 1A). Analysis of lipid deposition in aortic root sections of control mice revealed formation of early lesions characterized by their small size (Figure 1B) and low collagen content (Figure 1C). Treatment with AS605240 dramatically reduced lesion formation without significantly affect-

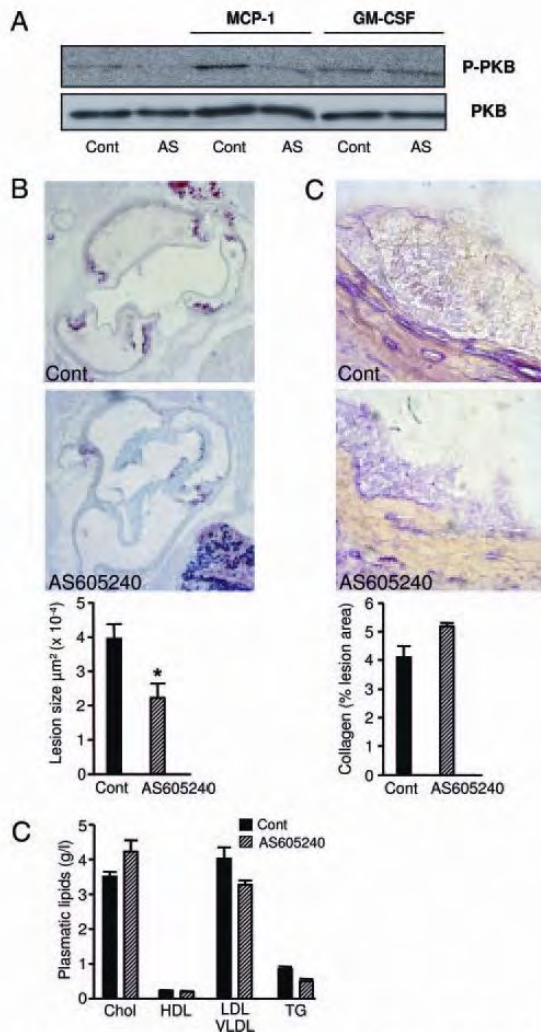


Figure 1. Pharmacological inhibition of PI3K γ activity reduces the development of early atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice. Eight-week-old ApoE^{-/-} mice were injected every 12 hours with AS605240 (AS; 10 mg/kg, n=5) or vehicle (Cont, n=5) for 5 weeks to study spontaneous early atherosclerosis. **A**, Western blot analysis of leukocytes from AS605240- or vehicle-treated mice. Leukocytes from blood samples were stimulated with MCP-1 (50 nmol/L) or GM-CSF (100 ng/mL), and lysates were analyzed by Western blot with anti-P-PKB or PKB antibody. **B**, Representative photomicrographs of oil red O-stained fatty streaks (original magnification $\times 5$) and quantitative analysis of atherosclerotic lesion size in the aortic root of indicated mice. **C**, Representative photomicrographs (original magnification $\times 40$) and quantitative analysis of lesion collagen content stained with Sirius red. **D**, Plasma total cholesterol (Chol), HDL, VLDL/LDL, and triglyceride (TG) levels were measured. Data represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

ing collagen levels. At the same time, plasma lipid levels were not changed, which suggests that the decreased lesion size observed was not accounted for by changes in plasma cholesterol levels or in the distribution of lipoprotein particles (Figure 1D).

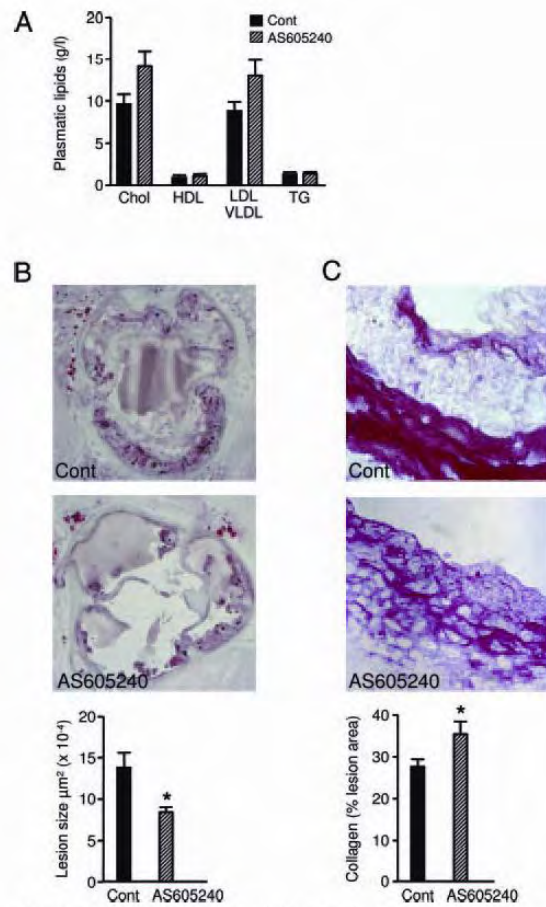


Figure 2. Pharmacological inhibition of PI3K γ activity reduces the development of more advanced atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice. Atherosclerotic plaques were studied in 8-week-old LDLR^{-/-} mice put on an atherogenic diet for 3 weeks and injected every 12 hours with AS605240 (10 mg/kg, n=5) or vehicle (Cont, n=5) for 5 supplementary weeks. **A**, Plasma total cholesterol (Chol), HDL, VLDL/LDL, and triglyceride (TG) levels were measured. **B**, Representative photomicrographs of oil red O-stained fatty streaks (original magnification $\times 5$) and quantitative analysis of atherosclerotic lesion size in the aortic root of indicated mice. **C**, Representative photomicrographs (original magnification $\times 40$) and quantitative analysis of lesion collagen content stained with Sirius red. Data represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

Advanced Atherosclerotic Lesions in LDLR^{-/-} Mice Respond to PI3K γ Inhibition

LDLR^{-/-} mice were fed an atherogenic diet high in fat and cholesterol for 8 weeks to trigger the development of an aggressive form of atherosclerosis that resembles progressive familial hypercholesterolemia. LDLR^{-/-} mice treated with PI3K γ inhibitor during the last 5 weeks did not show any variation in plasma lipid levels compared with vehicle-treated controls (Figure 2A); however, AS605240 induced a significant decrease in advanced lesion size (84 900 \pm 6500 versus 138 000 \pm 17 900 μm^2 ; Figure 2B). In these conditions, LDLR^{-/-} mice developed more advanced plaques than in

ApoE^{-/-} experiments, as demonstrated by their collagen content (27% versus 5% of total lesion area; Figure 2C). Moreover, a significant increase in collagen was observed in AS605240-treated LDLR^{-/-} mice compared with vehicle-treated mice (Figure 2C).

Thus, all pharmacological experiments performed in both mice models suggested that downmodulation of PI3K γ activity was able to reduce the size of both early and advanced atherosclerotic lesions in mice. In addition, the increase in collagen observed in AS605240-treated LDLR^{-/-} mice suggests that PI3K γ from immune cells could participate in atherosclerosis development, because inhibition of the inflammatory process is responsible in part for an increased collagen content.¹⁷

PI3K γ Is Highly Expressed and Active in Human and Murine Atherosclerotic Lesions

PI3K γ was originally identified in hematopoietic cells, where it is highly expressed⁸; however, recent studies have demonstrated low levels of PI3K γ expression in other cells, especially in the cardiovascular system. We therefore performed immunohistochemical analyses of PI3K γ in atherosclerotic lesions. Expression of PI3K γ within healthy segments of human carotids was low, whereas high levels of PI3K γ were detected within atherosclerotic lesions (Figure 3A, left). High expression of PI3K γ was also observed in aortic sinus lesions from both ApoE^{-/-} and LDLR^{-/-} mice (Figure 3A, right). To precisely localize PI3K γ within the plaque, we then performed immunochemical staining of macrophages (MOMA-2) and T lymphocytes (CD3) in sections adjacent to those stained with anti-PI3K γ antibody (Figure 3B). Staining of PI3K γ , MOMA-2, and CD3 was perfectly superimposed, which suggests that most PI3K γ in the lesions was in immune cells. To assess PI3K γ activity in atherosclerotic lesions, we measured PKB phosphorylation in LDLR^{-/-} aortic root sections treated or not treated with AS605240. Results showed an important phosphorylation of PKB (26.8 \pm 4.1% of the lesion area) that was largely inhibited by AS605240 treatment (3.22 \pm 2.5%) without a change in PKB expression (Figure 3C). These results further suggest that immune PI3K γ could be the main target of a pharmacological atheroprotective intervention.

Loss of PI3K γ in Immune Cells Is Sufficient to Reduce Atherosclerosis

To evaluate the importance of hematopoietic PI3K γ in the development of atherosclerosis, we generated a mouse model of atherosclerosis that lacked PI3K γ exclusively in immune cells by bone marrow transplants from PI3K γ ^{-/-} mice to irradiated \rightarrow LDLR^{-/-} recipient mice (PI3K γ ^{-/-} \rightarrow LDLR^{-/-}). Analysis of atherosclerotic plaques revealed an important decrease in the size of lesions in PI3K γ ^{-/-} \rightarrow LDLR^{-/-} compared with PI3K γ ^{+/+} littermate transplanted mice (PI3K γ ^{+/+} \rightarrow LDLR^{-/-}; 55 689 \pm 5185 μ m² vs 106 429 \pm 10 055 μ m², respectively; Figure 4A). We did not observe any difference in plasma lipid levels either in PI3K^{-/-} donor mice compared with wild-type donor mice (Figure 4B) or in PI3K γ ^{-/-} \rightarrow LDLR^{-/-} compared with PI3K γ ^{+/+} \rightarrow LDLR^{-/-} mice (Figure 4C) after hypercholesterolemic diet. These

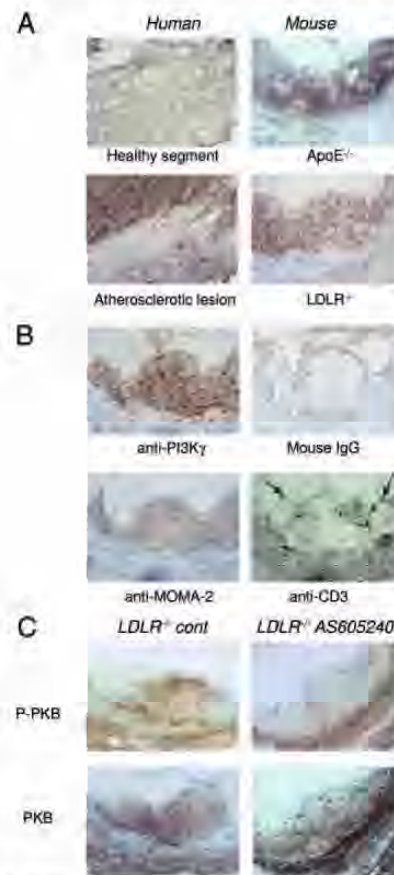


Figure 3. PI3K γ is expressed and active on macrophages and T lymphocytes within human and murine atherosclerotic plaques. **A**, Representative longitudinal cryosections (original magnification \times 40) showing PI3K γ expression in healthy (n=4) and atherosclerotic segments from human carotid arteries (n=4; left) and in aortic root atherosclerotic lesions from ApoE^{-/-} (n=5) and LDLR^{-/-} mice (n=5; right). **B**, Adjacent sections of aortic root atherosclerotic lesion from LDLR^{-/-} mice (n=5) were stained with anti-PI3K γ , anti-MOMA-2 (macrophage), and anti-CD3 (T lymphocyte) antibodies or with isotype-matched non-immune IgG. **C**, Adjacent sections of aortic root atherosclerotic lesion from AS605240-treated (10 mg/kg; n=4) or vehicle-treated (n=4) LDLR^{-/-} mice stained with P-Ser⁴⁷³ PKB (P-PKB) or PKB antibodies.

results illustrate that the expression of PI3K γ in immune cells is sufficient to drive formation of atherosclerotic lesions in mice.

Loss of PI3K γ in Macrophages and T Cells Impairs Infiltration Within Atherosclerotic Lesions

Cellular composition of atherosclerotic lesions is of crucial importance in both atherogenesis and plaque rupture. We next performed immunohistochemical studies of atherosclerotic constituents to further delineate the effects of immune PI3K γ on lesion formation. Analyses were performed on transplanted mice fed an atherogenic diet for 10 weeks and were normalized to lesion area in the 2 groups. As shown with the

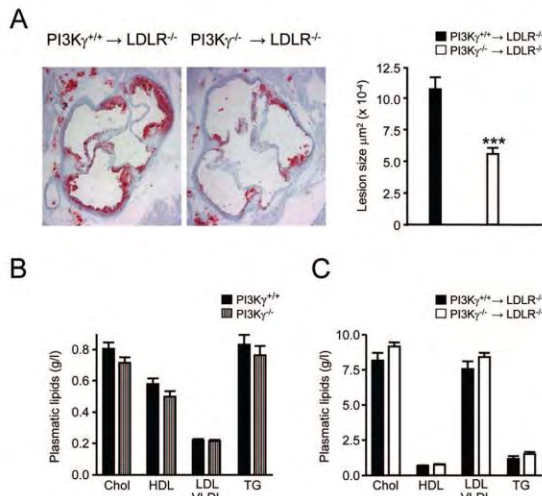


Figure 4. Reduced atherosclerotic lesion size in LDLR $^{-/-}$ mice transplanted with PI3K $\gamma^{-/-}$ bone marrow. A–C, Eight-week-old irradiated LDLR $^{-/-}$ mice were transplanted with PI3K $\gamma^{-/-}$ bone marrow (PI3K $\gamma^{-/-}$ → LDLR $^{-/-}$, n=14) or with wild-type littermate bone marrow (PI3K $\gamma^{+/+}$ → LDLR $^{-/-}$, n=11). Six weeks later, mice were put on an atherogenic diet for 10 weeks. A, Representative photomicrographs of oil red O–stained fatty streaks (original magnification $\times 5$) and quantitative analysis of atherosclerotic lesion size in the aortic root of indicated mice. B, Plasma lipid levels in PI3K $\gamma^{+/+}$ (n=14) and PI3K $\gamma^{-/-}$ (n=14) donor mice. C, Plasma lipid levels in PI3K $\gamma^{-/-}$ → LDLR $^{-/-}$ or in PI3K $\gamma^{+/+}$ → LDLR $^{-/-}$ after 10 weeks of hypercholesterolemic diet. Data represent mean \pm SEM. *** $P < 0.0005$. Chol indicates cholesterol.

anti-MOMA-2 antibody, there was a marked decrease in macrophage infiltration in atherosclerotic plaque in the PI3K $\gamma^{-/-}$ → LDLR $^{-/-}$ mice compared with PI3K $\gamma^{+/+}$ → LDLR $^{-/-}$ control mice (30% reduction, $P = 0.019$; Figure 5A). In addition to the observed effect on macrophage accumulation, anti-CD3 staining revealed an important reduction in T-cell infiltration in the absence of PI3K γ in the hematopoietic system (39% reduction, $P = 0.019$; Figure 5B).

Loss of Immune PI3K γ Favors Plaque Stabilization

In addition to reduction of lesion size, the constitution of a thick fibrous cap is an important feature of plaque stabilization that can prevent physical plaque disruption and subsequent thrombus formation. Indeed, in fatal myocardial infarction, the plaque has a large lipid core, an abundance of inflammatory cells, a relative paucity of smooth muscle cells, and a thin collagen fibrous cap.¹⁷ This type of plaque is called “vulnerable,” and its stabilization has become a new therapeutic goal.^{18,19} To evaluate the potential benefit of the absence of immune PI3K γ on the biology of the plaque, we analyzed plaque collagen content and smooth muscle cell content in PI3K $\gamma^{-/-}$ bone marrow–transplanted LDLR $^{-/-}$ mice. A dramatic increase in collagen content (Figure 6A) accompanied by an increase in smooth muscle cell content (Figure 6B) in atherosclerotic lesions from PI3K $\gamma^{-/-}$ → LDLR $^{-/-}$ mice emphasizes the fact that inactivation of PI3K γ in immune cells could have an additional beneficial effect on the stability of atherosclerotic plaque.

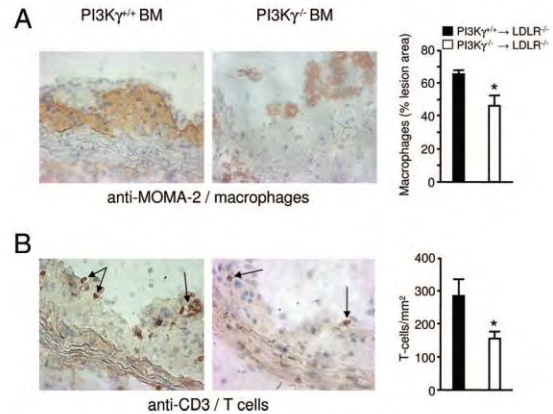


Figure 5. Loss of PI3K γ expression in the immune system reduces inflammatory cell infiltration within atherosclerotic lesions. A and B, Eight-week-old irradiated LDLR $^{-/-}$ mice were transplanted with PI3K $\gamma^{-/-}$ bone marrow (PI3K $\gamma^{-/-}$ → LDLR $^{-/-}$, n=14) or with wild-type littermate bone marrow (PI3K $\gamma^{+/+}$ → LDLR $^{-/-}$, n=11). Six weeks later, mice were put on an atherogenic diet for 10 weeks. A, Representative photomicrographs (original magnification $\times 40$) and quantitative analysis of lesion macrophage content after MOMA-2 staining. B, Representative photomicrographs (original magnification $\times 40$) and quantitative analysis of lesion T-cell infiltration (number of CD3 $^{+}$ cells/mm 2). Data represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$.

Discussion

PI3K γ has been shown to possess immunomodulatory potential and is expressed in the cardiovascular system, which provides a rationale for pharmacological targeting of PI3K γ in atherogenesis *in vivo*. In agreement with the results of a

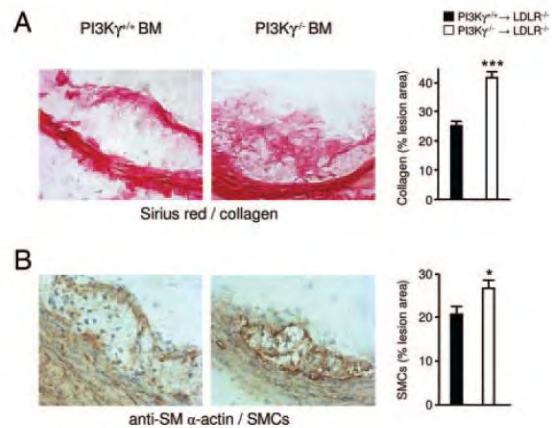


Figure 6. Loss of PI3K γ expression in the immune system increases collagen and smooth muscle cell (SMC) content within atherosclerotic lesions. Eight-week-old irradiated LDLR $^{-/-}$ mice were transplanted with PI3K $\gamma^{-/-}$ bone marrow (PI3K $\gamma^{-/-}$ → LDLR $^{-/-}$, n=14) or with wild-type littermate bone marrow (PI3K $\gamma^{+/+}$ → LDLR $^{-/-}$, n=11). Six weeks later, mice were put on a hypercholesterolemic diet for 10 weeks. A, Representative photomicrographs (original magnification $\times 40$) and quantitative analysis of lesion collagen content stained with Sirius red. B, Representative photomicrographs (original magnification $\times 40$) and quantitative analysis of lesion smooth muscle cell content stained with anti-SM α -actin antibody. Data represent mean \pm SEM. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0005$.

study by Chang et al²⁰ reporting reduced plaque size in PI3K $\gamma^{-/-}$ /ApoE $^{-/-}$ double-knockout mice compared with PI3K $\gamma^{+/+}$ /ApoE $^{-/-}$ mice, we found that PI3K γ was essential to the development of atherosclerosis. Here, we provide new insights into the role of PI3K γ in inflammatory cells in the development of atherosclerotic lesions. To test a PI3K γ -based therapy, mice susceptible to atherosclerosis were treated with AS605240, a specific PI3K γ inhibitor. PI3K γ dependence was observed in early atherosclerotic lesions in ApoE $^{-/-}$ mice and in advanced lesions created in LDLR $^{-/-}$ mice on an atherogenic diet without any toxic effect at a dose of 10 mg/kg daily. Pharmacological studies with an AS605240 inhibitor have been described in mouse models of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. In both models, PI3K γ -inhibitor administration blocked the progression of the pathology by modulating immune responses without inducing adverse effects.^{10,11} AS605240 went through standard regulatory toxicity studies with increasing oral dosing up to 300 mg/kg. Toxicological examination showed that AS605240 had no adverse secondary effects after the 5-day treatment period, with a cumulative dose of 500 mg/kg (data not shown). Whereas in rheumatoid arthritis, a PI3K γ inhibitor prevented joint inflammation and tissue damage via defective neutrophil migration,¹⁰ in lupus erythematosus, PI3K γ inhibition reduced levels of pathogenic CD4 $^{+}$ memory cells, thus blocking glomerulonephritis.¹¹ Interestingly, successful treatment of these autoimmune diseases was obtained at elevated doses of PI3K γ inhibitor (30 mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$). Here, we demonstrate that an important reduction of atherosclerotic lesions was already observed at a lower dose (10 mg \cdot kg $^{-1}$ \cdot d $^{-1}$). In addition to its function in the immune system, PI3K γ has also been found at lower levels in endothelial and smooth muscle cells. Endothelial PI3K γ activity has been demonstrated as essential for interaction of neutrophils with the inflamed vessel walls that result from a perturbation in selectin-mediated adhesion of neutrophils to vessel wall.¹² In smooth muscle cells, PI3K γ was involved in angiotensin II-mediated contraction, and mice deficient in PI3K γ were protected against the hypertensive damage of chronic angiotensin II exposure.¹⁴ Consistent with these data, we found weak PI3K γ expression in healthy segments of human coronary arteries. Nevertheless, a high signal was observed in macrophage and T-lymphocyte-rich regions of atherosclerotic lesions in humans and mice, which suggests that immune PI3K γ could be responsible for the pharmacological effects observed. According to the present transplantation experiments, inhibition of lesion formation in the absence of PI3K γ from immune cells attenuates atherosclerosis as effectively as a systemic inhibition of PI3K γ by pharmacological means with AS605240; however, we cannot completely exclude that a small portion of the observed effects can also be attributed to endothelial PI3K γ activity.

The present study focused on aortic root atherosclerotic lesions; however, it was demonstrated that immune cells could differentially regulate atherosclerosis development, depending on the lesion site considered.²¹ In the present model, en face aorta analysis showed only a few lesions apart from the aortic roots (data not shown). Nevertheless, aortic arch lesions were

only observed in aortas from PI3K $\gamma^{+/+}$ →LDLR $^{-/-}$ mice (2% of aortic arch area) and not in PI3K $\gamma^{-/-}$ →LDLR $^{-/-}$ mice.

Genetic data have provided evidence for the importance of chemokine receptors in the early steps of atherosclerosis, because they recruit monocytes²² and T cells,^{23–25} which have been identified recently as key regulators of atherosclerosis. Several reports show that T-helper type 1–driven responses promote plaque formation,^{26–28} whereas natural regulatory T cells are able to attenuate these responses and decrease the progression of atherosclerotic lesions.²⁹ PI3K γ plays a major role in recruiting inflammatory cells, acting downstream of chemokine receptors, because attraction of macrophages to inflamed tissue was highly reduced in PI3K γ -null mice.^{3–5} The analyses of cell content in atherosclerotic lesion from PI3K $\gamma^{-/-}$ →LDLR $^{-/-}$ mice compared with PI3K $\gamma^{+/+}$ →LDLR $^{-/-}$ mice demonstrated a decrease in macrophage and T-cell infiltration, which provides further evidence that interference with PI3K γ signaling modifies the inflammatory processes responsible for the development of atherosclerosis. These results could be explained by the important role of PI3K γ downstream of chemokine receptors for macrophage recruitment at the lesion site,^{3–5} but its involvement in T-cell migration is controversial. Indeed, *in vitro* studies demonstrated that migration of PI3K γ -deficient CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cells to CCL19, CXCL12, and low doses of CCL21 was reduced by 30% to 65%.^{30,31} In contrast, recent observations with multiphoton intravital microscopy revealed that lack of PI3K γ had negligible effects on migration velocities but resulted in increased turning angles of T cells.³² Moreover, systemic lupus erythematosus induced by an enhanced activation of class IA PI3K in T cells was ameliorated by PI3K γ deficiency without effects on T-cell invasion, which suggests that PI3K γ was not involved in T-cell migration *in vivo*.³³ Nevertheless, recent data indicating that PI3K γ is responsible for a modification of the CD4/CD8 differentiation ratio³⁴ are particularly relevant in the pathology of atherosclerosis. It would be of great interest to discriminate the importance of PI3K γ activity in macrophages from its effects in T-cell differentiation during atherosclerosis development.

An important finding of the present study is that immune deletion of PI3K γ not only reduces plaque size formation but also promotes plaque stabilization. Although plaque rupture is rarely observed in mice, whereas it is fairly common in humans,¹⁶ collagen content and smooth muscle cells are good indicators of plaque stability. The observed increase in collagen and smooth muscle cells in plaques from PI3K γ -null mice may thus be clinically relevant, because stable plaque could keep atherosclerosis nonsymptomatic, prevent thrombus formation, and prevent subsequent myocardial infarction and stroke.

It has also been reported that PI3K γ plays an important role in platelet aggregation downstream of the ADP receptor P2Y₁₂. The absence of PI3K γ did not affect bleeding time but protected mice from death caused by ADP-induced thromboembolic vascular occlusion.⁷ Currently, P2Y₁₂ receptor inhibitors such as ticlopidine and clopidogrel are used as antithrombotic therapy.³⁵ The present results led us to speculate that pharmacological inhibition of PI3K γ could also have beneficial effects on thrombi formation when

1316 *Circulation* March 11, 2008

plaque is disrupted without inducing critical adverse effects, especially the bleeding and thrombocytopenic purpura observed in patients treated with clopidogrel.³⁶

In summary, the results of the present study identify PI3K γ as a new target in atherosclerosis with the potential to modulate multiple stages of atherosclerotic lesion formation, such as fatty streak constitution, cellular composition, and final fibrous cap establishment. Current treatments for atherosclerosis are mainly based on drugs that lower plasma cholesterol concentration and blood pressure. Statins, which target 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, have well-documented advantageous effects on atherosclerosis. In addition to their cholesterol-lowering effect, recent reports suggest that statins also possess antiinflammatory and immunomodulatory actions.^{37,38} Nevertheless, several adverse events have been reported, such as renal toxicity and rhabdomyolysis, in patients treated with statins.^{39,40} Although the precise reason for these effects is not fully understood, it appears that they are in part the result of mitochondrial toxicity and selenoprotein deficiency.^{41,42} The identification and development of promising new antiinflammatory therapy is therefore of great medical interest. In light of the immunomodulatory properties of PI3K γ inhibitors and the known function of PI3K γ in controlling vascular smooth muscle tone and cardiac cell contractility,⁴³ our present finding is the last major step needed to promote the development of PI3K γ inhibitors for cardioprotective therapy.

Acknowledgments

We are grateful to J.C. Thiers for providing surgical samples from human endarterectomy procedures and M.J. Fouque for technical assistance.

Sources of Funding

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and the Fondation de France (grant 2004004845). A. Fougerat was supported by the Nouvelle Société Française d'Athérosclérose. Dr Wymann was supported by the Swiss National Science Foundation and an FP7 project MAIN LSHG-CT-2003-502935.

Disclosures

None.

References

- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;7:508–519.
- Opar A. Where now for new drugs for atherosclerosis? *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6:334–335.
- Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*. 2000;287:1049–1053.
- Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*. 2000;287:1046–1049.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Russell GJ, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM. Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*. 2000;287:1040–1046.
- Laffargue M, Calvez R, Finan P, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E, Wymann MP. Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity*. 2002;16:441–451.
- Hirsch E, Bosco O, Tropel P, Laffargue M, Calvez R, Altruda F, Wymann MP, Montrucchio G. Resistance to thromboembolism in PI3Kgamma-deficient mice. *FASEB J*. 2001;15:2019–2021.
- Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signalling— which way to target? *Trends Pharmacol Sci*. 2003;24:366–376.
- Rückle T, Schwarz MK, Rommel C. PI3Kgamma inhibition: towards an “aspirin of the 21st century”? *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:903–918.
- Camps M, Rückle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, Ferrandi C, Chabert C, Gillieron C, Françon B, Martin T, Gretener D, Perrin D, Leroy D, Vitte PA, Hirsch E, Wymann MP, Cirillo R, Schwarz MK, Rommel C. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med*. 2005;9:936–943.
- Barber DF, Bartolomé A, Hernandez C, Flores JM, Redondo C, Fernandez-Arias C, Camps M, Ruckle T, Schwarz MK, Rodriguez S, Martinez-A C, Balomenos D, Rommel C, Carrera A. PI3Kgamma inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat Med*. 2005;9:933–935.
- Puri KD, Doggett TA, Huang CY, Douangpanya J, Hayflick JS, Turner M, Penninger J, Diacovo TG. The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood*. 2005;106:150–157.
- Hirsch E, Lembo G, Montrucchio G, Rommel C, Costa C, Barberis L. Signaling through PI3Kgamma: a common platform for leukocyte, platelet and cardiovascular stress sensing. *Thromb Haemost*. 2006;95:29–35.
- Vecchione C, Patrucco E, Marino G, Barberis L, Poulet R, Aretini A, Maffei A, Gentile MT, Storto M, Azzolino O, Brancaccio M, Colussi GL, Bettarini U, Altruda F, Silengo L, Tarone G, Wymann MP, Hirsch E, Lembo G. Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3Kgamma. *J Exp Med*. 2005;201:1217–1228.
- Elhage R, Gourdy P, Brouchet L, Jawien J, Fouque MJ, Fiévet C, Huc X, Barreira Y, Coulourniers JC, Arnal JF, Bayard F. Deleting TCR $\alpha\beta^+$ or CD4 $^+$ T lymphocytes leads to opposite effects on site-specific atherosclerosis in female apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol*. 2004;165:2013–2018.
- Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. 2004;55:503–517.
- Libby P, Sasiela W. Plaque stabilization: can we turn theory into evidence? *Am J Cardiol*. 2006;98:26P–33P.
- Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Juhani Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demitrovic J, Navab M, Puri SG, Reikhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Müller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part I. *Circulation*. 2003;108:1664–1672.
- Naghavi M, Libby P, Falk E, Casscells SW, Litovsky S, Rumberger J, Badimon JJ, Stefanadis C, Moreno P, Pasterkamp G, Fayad Z, Stone PH, Waxman S, Raggi P, Madjid M, Zarrabi A, Burke A, Yuan C, Fitzgerald PJ, Siscovick DS, de Korte CL, Aikawa M, Airaksinen KE, Assmann G, Becker CR, Chesebro JH, Farb A, Galis ZS, Jackson C, Jang IK, Koenig W, Lodder RA, March K, Demitrovic J, Navab M, Puri SG, Reikhter MD, Bahr R, Grundy SM, Mehran R, Colombo A, Boerwinkle E, Ballantyne C, Insull W Jr, Schwartz RS, Vogel R, Serruys PW, Hansson GK, Faxon DP, Kaul S, Drexler H, Greenland P, Muller JE, Virmani R, Ridker PM, Zipes DP, Shah PK, Willerson JT. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part II. *Circulation*. 2003;108:1772–1778.
- Chang JD, Sukhova GK, Libby P, Schwartz E, Lichtenstein AH, Field SJ, Kennedy C, Madhavarapu S, Luo J, Wu D, Cantley LC. Deletion of the phosphoinositide 3-kinase p110gamma gene attenuates murine atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:8077–8082.
- Reardon CA, Blachowicz L, White T, Cabana V, Wang Y, Lukens J, Bluestone J, Getz GS. Effect of immune deficiency on lipoproteins and atherosclerosis in male apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1011–1016.
- Boring L, Gosling J, Clearly M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2 $^{-/-}$ mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. 1998;27:894–897.

23. Brauner-Reuther V, Zernecke A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Burger F, Pelli G, Luckow B, Mach F, Weber C. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:373–379.
24. Damás JK, Smith C, Øie E, Fevang B, Halvorsen B, Wahren T, Boullier A, Breland U, Yndestad A, Ovchinnikova O, Robertson AK, Sandberg WJ, Kjekshus J, Taskén K, Frøland SS, Gullestad L, Hansson GK, Quehenberger O, Aukrust P. Enhanced expression of the homeostatic chemokines CCL19 and CCL21 in clinical and experimental atherosclerosis: possible pathogenic role in plaque destabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:614–620.
25. Heller EA, Liu E, Tager AM, Yuan Q, Lin AY, Ahluwalia N, Jones K, Koehn SL, Lok VM, Aikawa E, Moore KJ, Luster AD, Gerszten RE. Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells. *Circulation.* 2006;113:2301–2312.
26. Song L, Leung C, Schindler C. Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J Clin Invest.* 2001;108:251–259.
27. Moeller F, Nielsen LB. Aortic recruitment of blood lymphocytes is most pronounced in early stages of lesion formation in apolipoprotein-E-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2003;168:49–56.
28. Benaglio M, Azzurri A, Ciervo A, Amedei A, Tamburini C, Ferrari M, Telford JL, Baldari CT, Romagnani S, Cassone A, D'Elia MM, Del Prete G. T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:6658–6663.
29. Ait-Onfella H, Salomon BL, Potteaux S, Robertson AK, Gourdy P, Zoll J, Merval R, Esposito B, Cohen JL, Fisson S, Flavell RA, Hansson GK, Klatzmann D, Tedgui A, Mallat Z. Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat Med.* 2006;12:178–180.
30. Nombela-Arrieta C, Lacalle RA, Montoya MC, Kunitaki Y, Megias D, Marques M, Carrera AC, Manes S, Fukui Y, Martinez AC, Stein JV. Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase gamma during T and B lymphocyte homing. *Immunity.* 2004;21:429–441.
31. Reif K, Okkenhaug K, Sasaki T, Penninger JM, Vanhaesebroeck B, Cyster JG. Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol.* 2004;173:2236–2240.
32. Nombela-Arrieta C, Mempel TR, Soriano SF, Mazo I, Wymann MP, Hirsch E, Martinez AC, Fukui Y, von Andrian UH, Stein JV. A central role for DOCK2 during interstitial lymphocyte motility and sphingosine-1 phosphate mediated egress. *J Exp Med.* 2007;204:497–510.
33. Barber DF, Bartolome A, Hernandez C, Flores JM, Fernandez-Arias C, Rodriguez-Borlado L, Hirsch E, Wymann MP, Balomenos D, Carrera AC. Class IB-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) deficiency ameliorates IA-PI3K-induced systemic lupus but not T cell invasion. *J Immunol.* 2006;176:589–593.
34. Rodriguez-Borlado L, Barber DF, Hernandez C, Rodriguez-Marcos MA, Sanchez A, Hirsch E, Wymann MP, Martinez-A C, Carrera AC. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the CD4/CD8 T cell differentiation ratio. *J Immunol.* 2003;170:4475–4482.
35. Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation.* 1999;100:1667–1672.
36. Bennett CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR, McCarthy LJ, Sarode R, Hatfield AJ, Feldman MD, Davidson CJ, Tsai HM. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Engl J Med.* 2000;342:1773–1777.
37. Mach F. Statins as immunomodulatory agents. *Circulation.* 2004;109(suppl II):II-15–II-17.
38. Schramm R, Menger MD, Harder Y, Schmitt R, Adam O, Weitz-Schmidt G, Schäfers HJ. Statins inhibit lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *Immunology.* 2007;120:315–324.
39. Wolfe SM. Dangers of rosuvastatin identified before and after FDA approval. *Lancet.* 2004;363:2189–2190.
40. Kastelein JJ. Should rosuvastatin be withdrawn from the market? *Lancet.* 2004;364:1577–1578.
41. Moosmann B, Behl C. Selenoprotein synthesis and side-effects of statins. *Lancet.* 2004;363:892–894.
42. Rutishauser J. The role of statins in clinical medicine: LDL-cholesterol lowering and beyond. *Swiss Med Wkly.* 2006;136:41–49.
43. Patruccio E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E. PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell.* 2004;118:375–387.

CLINICAL PERSPECTIVE

The role of inflammation in all stages of atherosclerotic cardiovascular disease has become an active area of investigation. Various inflammatory cells and immune mediators participate in processes that begin with fatty streak development and culminate in cardiac infarctions when the plaque is disrupted. The generation of mice that lack phosphoinositide-3 kinase- γ (PI3K γ) showed an involvement of this kinase in a wide variety of signaling pathways triggered by the G-protein-coupled receptor. Interestingly, most PI3K γ functions are related to reactions to inflammation, because a major role of PI3K γ is to recruit inflammatory cells by acting downstream of the chemokine receptor. Specific PI3K γ inhibitors have been developed and have shown immunomodulatory properties, which makes PI3K γ a good candidate for drug design for use in autoimmune diseases. Using this pharmacological PI3K γ inhibitor and a hematopoietic PI3K γ -deficient mouse model of atherosclerosis, we demonstrated that PI3K γ inhibition could alleviate the development of atherosclerotic lesions by modulating inflammatory process. Our results identify PI3K γ as a new target in atherosclerosis with the potential to modulate multiple stages of atherosclerotic lesion formation, such as fatty streak constitution, cellular composition, and final fibrous cap establishment. Our results, as well as other data concerning the involvement of PI3K γ in cardiac pathologies, provide convincing arguments to advocate the development of PI3K γ inhibitor in cardioprotective therapy.

III- Conclusion

Ces deux études (pharmacologique et génétique), réalisées dans des modèles de souris athéromateuses, ont démontré un rôle clé de la PI3K γ dans les phénomènes inflammatoires conduisant au développement de la plaque d'athérome. L'inhibition de la PI3K γ des cellules immunitaires permet non seulement d'inhiber les processus athéromateux mais également de stabiliser la plaque. L'activité PI3K γ a donc été identifiée comme une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'athérosclérose avec le potentiel de moduler des étapes multiples de la formation des lésions athéromateuses telles que la constitution de la strie lipidique mais également la composition cellulaire et la stabilité de la plaque. Ces travaux nous ont conduit à écrire une revue sur invitation, sur les PI3K et l'inflammation dans le contexte de l'athérosclérose (cf annexe).

Phosphoinositide 3-kinases and their role in inflammation: potential clinical targets in atherosclerosis?

Anne FOUGERAT, Stéphanie GAYRAL, Nicole MALET, Fabienne BRIAND-MESANGE, Monique BRETON-DOUILLON and Muriel LAFFARGUE
Clinical Science. 2009 ; 116:791-804.

Lorsque nous avons soumis ces résultats pour publication, une étude a en parallèle et en utilisant une approche expérimentale différente, confirmé nos observations. Chang *et al.* ont en effet démontré que des souris double déficientes ApoE^{-/-}/PI3K γ ^{-/-} hypercholestérolémiques présentent une taille de lésions réduite en comparaison des souris ApoE^{-/-}/PI3K γ ^{+/+} contrôles à 36, 53 et 60 semaines. Alors que notre modèle de souris chimères a permis de démontrer le rôle majeur de la PI3K γ du système immunitaire dans l'athérosclérose, Chang *et al.* utilisent un modèle dans lequel la PI3K γ est absente de façon ubiquitaire, ce qui ne leur permet pas de démontrer le rôle prépondérant de la PI3K γ dans les processus inflammatoires. Notre étude permet aussi de valider l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique dans cette pathologie. D'autre part, les auteurs utilisent un modèle (souris doubles KO ApoE^{-/-}/PI3K γ ^{-/-} sous régime) permettant d'étudier le rôle de la PI3K γ dans le développement des plaques d'athérome tardives mais n'apportent cependant pas de données concernant la stabilité des lésions. Par contre, Chang *et al.* ajoutent des résultats sur la signalisation *in situ* qui montrent que la délétion de p110 γ chez les souris ApoE^{-/-} conduit à une inhibition de la phosphorylation de nombreuses molécules effectrices de la voie PI3K/Akt comme la GSK-3 (glycogen synthase kinase-3), la PKC θ , la protéine ribosomale S6, la p70S6 kinase et les facteurs de transcription

de la famille FOXO (forkhead box class O), AFX-1 (ou FOXO4) et FKHR (forkhead homolog in human rhabdosarcoma ou FOXO1) [364]. Cette étude montre également l'implication de la PI3K γ dans la phosphorylation d'Akt en réponse aux LDL oxydés dans les macrophages suggérant un rôle possible de la PI3K γ en aval des récepteurs scavengers dans la captation du cholestérol par les macrophages, mécanisme qui participe à la formation des cellules spumeuses. Il serait donc intéressant de réaliser des expériences de captation de cholestérol sur des macrophages en culture issus de souris sauvages ou déficientes en PI3K γ .

Article 2 : rôle de la PI3K γ dans la migration des cellules musculaires lisses aortiques

I- Introduction

Parallèlement au rôle de la PI3K γ dans le système immunitaire, des travaux de l'équipe avaient permis lors de mon arrivée au laboratoire d'identifier cette kinase dans le noyau et le cytoplasme des CML [348]. Toutefois, le rôle de cette isoforme dans ces cellules n'a pas été déterminé. D'autre part, de nombreuses études ont montré l'implication du PIP₃, produit des PI3K, dans la prolifération et la migration des CML [345] mais l'isoforme de PI3K impliquée dans ces processus demeure inconnue. Aux vues de l'ensemble de ces données, il nous a paru intéressant d'évaluer le rôle de la PI3K γ dans les fonctions des CML, en particulier dans la migration de ces cellules.

La migration des CML vasculaires est impliquée dans le développement de l'athérosclérose et constitue le mécanisme majeur de la resténose intra-stent. Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, les chimiokines, et en particulier MCP-1, jouent un rôle central dans la formation de la néointima en stimulant les processus inflammatoires mais également en agissant directement sur les fonctions des CML. En effet, l'inhibition de la signalisation induite par MCP-1 ou de son récepteur CCR2 réduit la formation de l'hyperplasie intimale dans différents modèles animaux en diminuant l'infiltration des leucocytes mais également en inhibant la prolifération et/ou la migration des CML. L'expression de MCP-1, qui est faible dans la paroi artérielle saine, est augmentée de façon importante après une angioplastie au ballonnet dans différents modèles animaux et les taux plasmatiques chez l'homme sont élevés chez les patients développant une resténose après implantation d'un stent [157] [158]. Le récepteur de MCP-1, CCR2, est un RCPG et pourrait donc conduire au recrutement de la PI3K γ dans les CML.

L'implication de la PI3K γ dans les processus inflammatoires de la paroi artérielle que nous avons démontré et qui sont également observés lors de la resténose [302], associée à un rôle potentiel de cette kinase dans les fonctions des CML suggèrent que l'inhibition de la PI3K γ pourrait constituer une stratégie thérapeutique dans la prévention de la resténose intrastent en bloquant les processus inflammatoires de la paroi artérielle mais également en agissant directement sur les CML pour inhiber l'hyperplasie intimale. Dans ce travail, nous nous sommes donc intéressés au rôle de la PI3K γ dans les fonctions des CML, en particulier dans la migration de ces cellules stimulée par la chimiokine MCP-1. Pour cela, nous avons utilisé différentes approches *in vitro* : un inhibiteur pharmacologique spécifique de la PI3K γ utilisé dans nos travaux précédents, un adénovirus codant pour un dominant négatif de la PI3K γ , et des CML aortiques issues de souris sauvages ou déficientes en PI3K γ . Les résultats de cette étude sont présentés dans l'article 2.

II- Résultats

Essential role of PI3K γ in MCP-1–stimulated aortic smooth muscle cells: an amplifier of PDGF-induced smooth muscle cell migration.

Fougerat A, Smirnova N, Gayral S, Malet N, Hirsch E, Martinez L, Douillon M and Laffargue M.

En préparation

**Essential rôle of PI3K γ in MCP-1–stimulated aortic smooth muscle cells: an amplifier
of PDGF-induced cell migration.**

Fougerat A^{1,2}, Smirnova N^{1,2}, Gayral S^{1,2}, Malet N^{1,2}, Hirsch E³, Perret B^{1,2}, Martinez LO^{1,2},
Douillon M^{1,2} and Laffargue M^{1,2} *

¹INSERM, U563, Toulouse, F-31300 France;

²Université Toulouse III Paul-Sabatier, Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan,
Toulouse, F-31300 France;

³Department of Genetics, Biology and Biochemistry, University of Turin, 10060 Turin, Italy.

*Corresponding author. Tél: +33 562 748 668, Fax: (+33) 562 748 666, Email:
muriel.laffargue@inserm.fr.

Keywords: phosphoinositide 3-kinase gamma, aortic smooth muscle cells, migration,
Monocyte Chemotactic Protein-1, Platelet Derived Growth Factor.

1. Introduction

Vascular smooth muscle cells (SMC) play important functions in normal and pathologic vessels. In normal adult artery, SMC display a contractile phenotype to maintain vascular tone whereas in response to vascular injury, they switch to a synthetic phenotype characterized by increased proliferation and migration, two major steps in atherosclerosis progression and neointimal thickening after angioplasty [1, 2]. Among cytokines and growth factors released by injured vessel and inflammatory cells, the monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) plays a critical role in pathological vascular remodelling. MCP-1 levels are especially increased in experimental mice model during atherogenesis and after carotid wire injury. Studies in transgenic mice knock out for MCP-1 or its receptor CCR2, a receptor belonging to the G protein coupled receptor family, demonstrate that MCP-1 is involved in monocyte recruitment and that impaired MCP-1/CCR2 signal transduction decreases atherosclerotic lesions and prevents restenosis [3, 4]. According to these data, anti MCP-1/CCR2 therapeutical approaches using antibodies against MCP-1 or CCR2 or a N-terminal truncated form of MCP-1 have been successfully tested to prevent development of intimal hyperplasia in mice, rabbits and primates, suggesting that these therapies might represent an effective approach to prevent arterial restenosis in humans [5-8]. The biological effects mediated by MCP-1 and its receptor CCR2 are not restricted to the regulation of inflammatory processes but can also modify SMC functions. CCR2 mRNA has been detected in human vascular SMC [9] and CCR2 has been shown to be involved in the functional switch of SMC to the synthetic phenotype [10] and to induce migration of aortic SMC in rabbit and rat [11, 12]. Moreover in rat, aortic MCP-1 and CCR2 increase with age, together with increased invasion capacity of aortic SMC, suggesting that MCP-1/CCR2 signalling might play a role in age-associated vascular remodelling [13]. While MCP-1/CCR2 signalling pathways leading to cell migration are extensively studied in monocytes, molecular mechanisms involved in MCP-1-induced SMC migration are poorly understood.

Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) family of lipid kinases is an important regulator of cell survival and growth, as well as migration through direct binding of proteins to their lipid

product. Based on their structural characteristic and substrate specificity, PI3K are divided in three classes referred to as class I, II and III [14, 15]. Class IA and class IB of PI3K comprise a highly homologous 110kDa catalytic subunit (α , β and δ for class IA; γ for class IB) and an associated regulatory subunit, both utilizing phosphoinositol (4,5) bisphosphate (PI4,5P₂) as *in vivo* substrate to produce phosphoinositol (3,4,5) trisphosphate (PIP₃). Whereas class IA PI3Ks are classically recruited downstream tyrosine kinase receptors, class IB is specifically activated by $\beta\gamma$ subunits of heterotrimeric G proteins conferring to PI3K γ specific functions downstream G protein coupled receptor activation [15, 16]. A growing body of information suggests that PI3Ks are involved in SMC migration [17-20]. Here, we identified in aortic SMC that PI3K γ is the major PI3K involved in Akt phosphorylation and migration downstream CCR2 activation by MCP-1. Furthermore, we reported that PI3K γ could also amplify PDGF-induced migration process by an autocrine/paracrine loop involving MCP-1/CCR2 signalling. This study provides new insight into molecular mechanisms and signalling involved in aortic SMC migration process.

2. Methods

2.1 Materials

Cell culture reagents were purchased from Invitrogen. Human recombinant EGF was from Peprotech, human recombinant PDGF-BB and mouse MCP-1 was from R&D Systems and swine recombinant MCP-1 was from Kingfisher Biotechnologies.

The following inhibitors were used: AS-252424 (Merck-Serono), wortmannin, RS-10296, AG1478, AG1296 and DAPI (Sigma-Aldrich).

The following antibodies were used: rabbit monoclonal antibody against phosphorylated Akt (serine 473) and polyclonal antibody against Akt (Cell Signaling Technologies), anti-myc clone 9E10 (BD biosciences), cyanin-2 conjugated secondary antibody (Jackson immunoresearch laboratories), anti-p110 α , anti-p110 β and anti-p110 δ (Santa-Cruz), anti-p110 γ was a gift from Pr. M. Wymann (University of Basel, Switzerland).

Enhanced chemiluminescence (ECL) system was from Amersham Biosciences.

2.2 Animals

The heterozygotes PI3K $\gamma^{+/+}$ mice generated previously on a C57Bl/6 background [16] were intercrossed to obtain PI3K $\gamma^{+/+}$ and PI3K $\gamma^{-/-}$ littermates. All animal procedures were in accordance with the guidelines of the Committee on Animals of the Midi-Pyrénées Ethics Committee on Animal Experimentation and with the French Ministry of Agriculture license.

2.3 Adenoviral production and infection

Briefly, PI3K γ KR construct was PCR modified to insert myc-tag and inserted into the multiple cloning sites (MCS) of the pShuttle-CMV. Then, PI3K γ KR-myc adenoviruses were generated by homologous recombination through pAdEasy system as previously described [21]. ADNC PI3K γ KR was kindly provided by Pr. M. Wymann (University of Basel, Switzerland).

For adenoviral infection, cell suspension was incubated with 150 infectious particles per cell in serum-free medium. After 1 hour, cells were incubated in normal culture medium for 72h,

before seeding cells in a 96-well plate or serum deprivation and stimulation for western blot analysis.

2.4 Cell culture

Aortic SMC were prepared from 6-week-old pig thoracic aorta using an explant technique and cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics. For experiments, SMC at 80% confluence from passages 3 to 6 were used. All animal care and procedures were in accordance with institutional guidelines. Before stimulation, cells were incubated 48 hours in serum-free medium.

Mouse aortic VSMC were isolated from 8-weeks-old wild type and PI3K γ^{Δ} mice. Aortae were dissected out from their origin at the left ventricle to the iliac bifurcation. After flushing with sterile PBS, aortae were placed in DMEM supplemented with 10% FCS and 1 μ g/ml Fungizone. Adventicia was then totally removed from the aorta under a dissecting microscope. The aorta was removed into DMEM supplemented with 10% FCS and cut into small pieces of 1-2 mm. Pieces were then digested in DMEM supplemented with 10% FCS containing 1,38 mg/ml collagenase type II (LS004174, Worthington Biochemical Corporation) for 4 hours in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cells were centrifuged and resuspended in DMEM, 10% FCS in a single well of a 24-well plate. After 5 days, the medium was replaced systematically until confluence was reached. For experiments mouse SMC were used at the 5th-10th passages.

2.5 Western blot analysis

Proteins from whole cells were solubilized in Laemmli buffer, boiled, separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred onto PVDF membrane. Immunodetection was achieved using the relevant primary antibody, anti-p110 α (1:500), anti-p110 β (1:500), anti-p110 δ (1:500), anti-p110 γ (1:1000), anti-cmyc (1:10000), anti-phosphorylated Akt (1:2000), anti-Akt (1:1000) overnight at 4°C. Horseradish peroxidase-conjugated secondary

antibody (anti-rabbit 1:5000 and anti-mouse 1:10000) was incubated for 1 hour at room temperature, and immunoreactive proteins were visualized with ECL reagents according to the manufacturer's instructions.

2.6 Wound-healing cell migration assay

Wound healing assay was performed using the Oris cell migration kit (Oris™ Cell Migration Assay-Fibronectin Coated, Platypus Technologies, Tebu Bio, France) according to manufacturer's instructions. Formatted for a 96-well plate, this assay uses silicone stoppers which restrict cell seeding to the outer annular regions of the well. When stoppers are removed, cells are allowed to migrate in a 2 mm diameter region in center of the well. Briefly, SMC were seeded at a density of 3.5×10^4 cells (pig SMC) or 5×10^4 cells (mouse SMC) per well. After attachment, cells were treated with PDGF-BB (10 ng/ml) or MCP-1 (10 ng/ml) or together with AS-252424, RS-102895. Cells were allowed to migrate for 48 hours at 37°C then stained with DAPI and counted under a fluorescence microscope. The number of fluorescent nuclei in each well was counted using Image J Software. The results were expressed as a percent of control.

2.7 Real time quantitative PCR

SMC were treated with PDGF-BB (10 ng/ml) for various times (30 min to 24h). Total RNA was extracted with trizol reagent (Invitrogen), phase separation was performed with chloroform and RNA precipitation with isopropanol. RNA concentrations were determined using a spectrophotometer. One μ g of total RNA was used for cDNA synthesis with hexameres. cDNA was amplified by quantitative real time-PCR with SYBR Green (Roche). Primers to amplify MCP-1 RNA were designed using the Primer Express software with the following sequences: GCT GTG ATC TTC AAG ACC ATT GTG (forward) and GAA TCC TGA ACC CAC TTC TGC TT (reverse). All real-time PCR reactions were performed on a LC480 (Roche), with the following thermal cycling parameters: annealing at 60°C for 40 s, amplification at 95°C for 10 s and dissociation at 95°C for 10 s. The PCR program was

followed by a melting curve and values were normalized to the relative amounts of HPRT. CT values of HPRT were constant in all samples.

2.8 Quantification of MCP-1 by ELISA

SMC were stimulated by PDGF-BB (10 ng/ml) for different times (2-48h). Cell culture supernatants were used to determine the concentrations of MCP-1 by specific MCP-1 ELISA Development Kit (Peprotech) according to manufacturer's instructions.

2.9 Immunofluorescence

Mouse aortic SMC were fixed with ice-cold methanol, washed in PBS and incubated with anti-smooth-muscle- α -actin primary antibody (1:1000, clone 1A4, Sigma, France) for 1h. After washing three times with PBS, cells were let in presence of a secondary cyanin-2 conjugated anti-mouse antibody (Jackson Immunoresearch Laboratories, Europe) and DAPI (1 μ g/mL, Sigma, France). Pictures were acquired using a fluorescence microscope (TE2000-E, Eclipse, NIKON).

3. Results

3.1 MCP-1-induced Akt phosphorylation does not require tyrosine kinase receptor transactivation

To investigate the involvement of PI3K/Akt pathway in MCP-1 signalling pathways in aortic SMC, we first analysed the phosphorylation of Akt after MCP-1 stimulation in primary pig aortic SMC. Because most of signalling pathway activated by GPCR agonists in SMC require tyrosine kinase receptor activation such as EGFR (epidermal growth factor receptor) or PDGFR (platelet derived growth factor) [22-24], we first analysed the effect of MCP-1 on Akt phosphorylation in presence of EGFR and PDGFR inhibitors, AG1478 and AG1296 respectively. We observed that AG1478 and AG1296 inhibitors did not modified MCP-1-induced Akt phosphorylation (*Figure 1A*) whereas they efficiently inhibit EGF and PDGF signalling pathways respectively (*Figure 1B*), which indicates that PI3K activation by MCP-1 does not require tyrosine kinase receptor transactivation. Same results were obtained in human aortic SMC (ATCC CRL-1999) stimulated by MCP-1 (data not shown). Altogether these results suggest that class IA PI3K were not involved in MCP-1 signalling in vascular SMC.

3.2 PI3K γ mediates MCP-1-induced Akt phosphorylation

To investigate the potential role of PI3K γ activity in Akt phosphorylation induced by MCP-1, aortic SMC were treated with a selective inhibitor of PI3K γ (AS252424) [25]. Akt phosphorylation induced by MCP-1 was decreased about 85% by selective PI3K γ inhibitor and totally by wortmannin, a pan PI3K inhibitor (*Figure 2A*), indicating that PI3K activity is required and that PI3K γ is the major isoform involved in this process. To control AS252424 specificity, we investigated Akt phosphorylation under cell treatment by EGF and PDGF, which are known to recruit class IA PI3K. We did not observe any modification of Akt phosphorylation by both treatments (*Figure 2B*), demonstrating the selectivity of the inhibitor against class IB PI3K. Similarly, infection of aortic SMC with an adenovirus coding an

induced by MCP-1 (*Figure 2C*) confirming the involvement of PI3K γ in MCP-1-induced Akt phosphorylation in aortic SMC.

3.3 MCP-1/CCR2 signalling induces aortic SMC migration via a PI3K γ -dependant pathway

Akt, and especially Akt1 has been demonstrated to be a key event in SMC migration [26]. Because MCP-1 is a chemoattractant factor of several cell types including SMC, we then evaluated the possible involvement of PI3K γ in MCP-1 induced aortic SMC migration. Using a wound-healing cell migration assay, we showed that MCP-1 induced aortic SMC migration at the dose of 5 ng/ml with a maximum efficiency at 10ng/ml (*Figure 3A*). As seen in *Figure 3B*, this effect was totally abolished by an inhibitor of the chemokine receptor CCR2 (RS-102895), indicating that the effect of MCP-1 on aortic SMC migration is mediated by CCR2. We then investigated the involvement of PI3K γ in this process. Cells were pre-treated with the PI3K γ inhibitor AS252424 or infected by an adenovirus coding an inactive form of PI3K γ (PI3K γ KR). Both treatments decrease MCP-1-induced cell migration to a similar level than CCR2 inhibitor treatment (*Figure 3C and 3D*). These results indicate that PI3K γ activation downstream MCP-1/CCR2 signalling plays a crucial role in aortic SMC migration.

3.4 PI3K γ could amplify PDGF-induced aortic SMC migration via an MCP-1/CCR2 pathway

MCP-1 mRNA are rapidly induced in the arterial media after arterial injury and could be responsible for monocyte recruitment but also SMC migration process [27, 28]. While the mechanism regulating CCR2 expression in SMC is not completely understood, induction of MCP-1 is well characterized. PDGF has been shown to induce JE/MCP-1 accumulation by activation of a specific region in the JE promoter [29, 30] but also by increasing MCP-1 mRNA stability [31]. We therefore hypothesized that PI3K γ could not only be restricted to

MCP-1 signalling but also amplify migration induced by PDGF by an autocrine/paracrine loop. To investigate this mechanism in our aortic SMC model, we first evaluated accumulation of MCP-1 in response to PDGF. We showed an increase of mRNA coding MCP-1 as soon as 30min of PDGF stimulation (Figure 4A) and a 10-fold accumulation of MCP-1 protein after 48h (Figure 4B). To explore a possible paracrine/autocrine loop in PDGF-induced SMC migration, aortic SMC were incubated with a CCR2 inhibitor before stimulation with PDGF. In this condition, PDGF-induced aortic SMC migration was decreased about 50% indicating an important function of MCP-1/CCR2 signalling pathway in PDGF mediated migration (Figure 4C). To determine the possible involvement of PI3K γ in this process, the same experiments were performed in aortic SMC pre-incubated with AS252424 (Figure 4C) or infected with an adenovirus coding the inactive form of PI3K γ (Figure 4D). Results showed that PI3K γ inhibition reduce aortic SMC migration to the similar level than CCR2 inhibitor treatment indicating that PI3K γ is required downstream CCR2 activation to amplify aortic SMC migration upon PDGF stimulation.

Finally to confirm the involvement of PI3K γ in SMC migration, we isolated primary SMC from aortas of wild type and PI3K γ null mice. The cells were stained positive for smooth muscle actin and did not show any difference in the number of positive cells in both genotypes (Figure 5A). In line with the results in SMC treated with PI3K γ inhibitors, murine SMC derived from PI3K γ^{Δ} mice exhibited a dramatic reduced migratory response towards MCP-1 and PDGF when compared with wild type cells demonstrating the importance of PI3K γ in both MCP-1 and PDGF-induced migration process (Figure 5B).

4. Discussion

MCP-1 has been shown to contribute to all steps of arterial remodelling process by inducing monocyte infiltration and functional switch of SMC to the synthetic phenotype, leading to increased proliferation and migration. Most of the effects mediated by MCP-1 seem to be mediated by its interaction with the GPCR CCR2 but downstream signalling pathways are not well characterized. Data from literature have previously reported the involvement of phosphoinositide 3-kinase lipid products, especially PIP₃, in restenosis processes such as SMC proliferation and migration. Here we investigated whether PI3K isoform(s) could be involved in MCP-1-mediated SMC migration. Early signalling events occurring downstream activation of GPCR have been subject to intense investigation. It has been shown that GPCR agonists induce tyrosine phosphorylation of multiple substrates in target cells [32-34]. In SMC, GPCR activation leads to rapid activation of tyrosine kinase receptor such as EGFR and PDGFR that could be involved in PI3K/Akt activation [23, 35, 36]. Here, we reported that PI3K/Akt pathway is directly activated downstream activation of CCR2 by the chemokine MCP-1. Furthermore we evidenced that the γ isoform of PI3K was specifically involved in this MCP-1/CCR2 signalling pathway. Whereas PI3K γ has been largely reported to be involved in hematopoietic cells migration, only few studies reported the role of PI3K γ in non hematopoietic cell migration. Heller *et al.* have investigated the function of PI3K γ in sphingosine 1-phosphate (S1P)-induced migration of endothelial cells and demonstrated that PI3K β and γ were equally involved in this process [37]. Molecular mechanism involved in S1P-activated SMC differ from endothelial cells since S1P induces a rapid transactivation of EGFR and PDGFR that is required to activate PI3K/Akt pathway in this cell type [22]. S1P is able to induce migration of both endothelial and SMC but we did not observe any effect of PI3K γ inhibition on Akt phosphorylation induced by S1P in aortic SMC (data not shown). To our knowledge, our study is the first one to describe direct implication of PI3K γ in SMC migration. Using PI3K β inhibitors we also found a weak implication of PI3K β (data not shown) in MCP-1 induced aortic SMC migration that could explain the difference in Akt

phosphorylation induced by MCP-1 in cells treated with a pan-PI3K inhibitor such as wortmannin compared to cells treated with PI3K γ specific inhibitor. Nevertheless, the involvement of PI3K γ is predominant in MCP-1 stimulated aortic SMC since more than 85% of Akt phosphorylation was decreased in absence of PI3K γ activity and MCP-1-induced migration was totally abolished in the same conditions.

MCP-1 is highly expressed by inflammatory cells but also by cells of the arterial wall during the development of atherosclerosis and after balloon injury [27, 28, 38]. *In vitro* studies have reported that PDGF could be responsible in part for this increase in MCP-1 secretion by SMC [30, 31]. Our data extend the latter observations and show an involvement of MCP-1/CCR2 pathway in PDGF-induced aortic SMC migration. In addition, our results demonstrate that PI3K γ , by this autocrine pathway, could amplify migration process activated by PDGF. Other agonists such as TNF- α or thrombin are able to induce MCP-1 secretion in SMC [39, 40]. Moreover, it has been shown that other cell types found in arterial wall such as inflammatory cells or endothelial cells secrete MCP-1 in response to interleukin -6 [39, 41]. It could be interesting to investigate the possible involvement of PI3K γ downstream these effectors that are key player in intimal hyperplasia formation.

Although PI3K γ activation mechanisms require GPCR activation, other agonists acting via tyrosine kinase receptor have been shown to activate PI3K γ . For example, Jones GE *et al.* have demonstrated that migration induced by CSF-1, a tyrosine kinase receptor agonist, was altered in PI3K γ -deficient (PI3K γ^{Δ}) macrophages. Interestingly, incubation of cells with pertussis toxin used to block Gi coupled receptors had a dramatic effect on cell morphology indicating the involvement of a Gi-activated signalling pathway [42]. In the same cells, MCP-1-induced migration was dramatically decreased in absence of PI3K γ . One explanation for the defect in macrophages PI3K γ^{Δ} induced by CSF-1 could be an autocrine/paracrine pathway involving secretion of chemokines suggesting that the pathway described in our study in aortic SMC could be extend to other cell types.

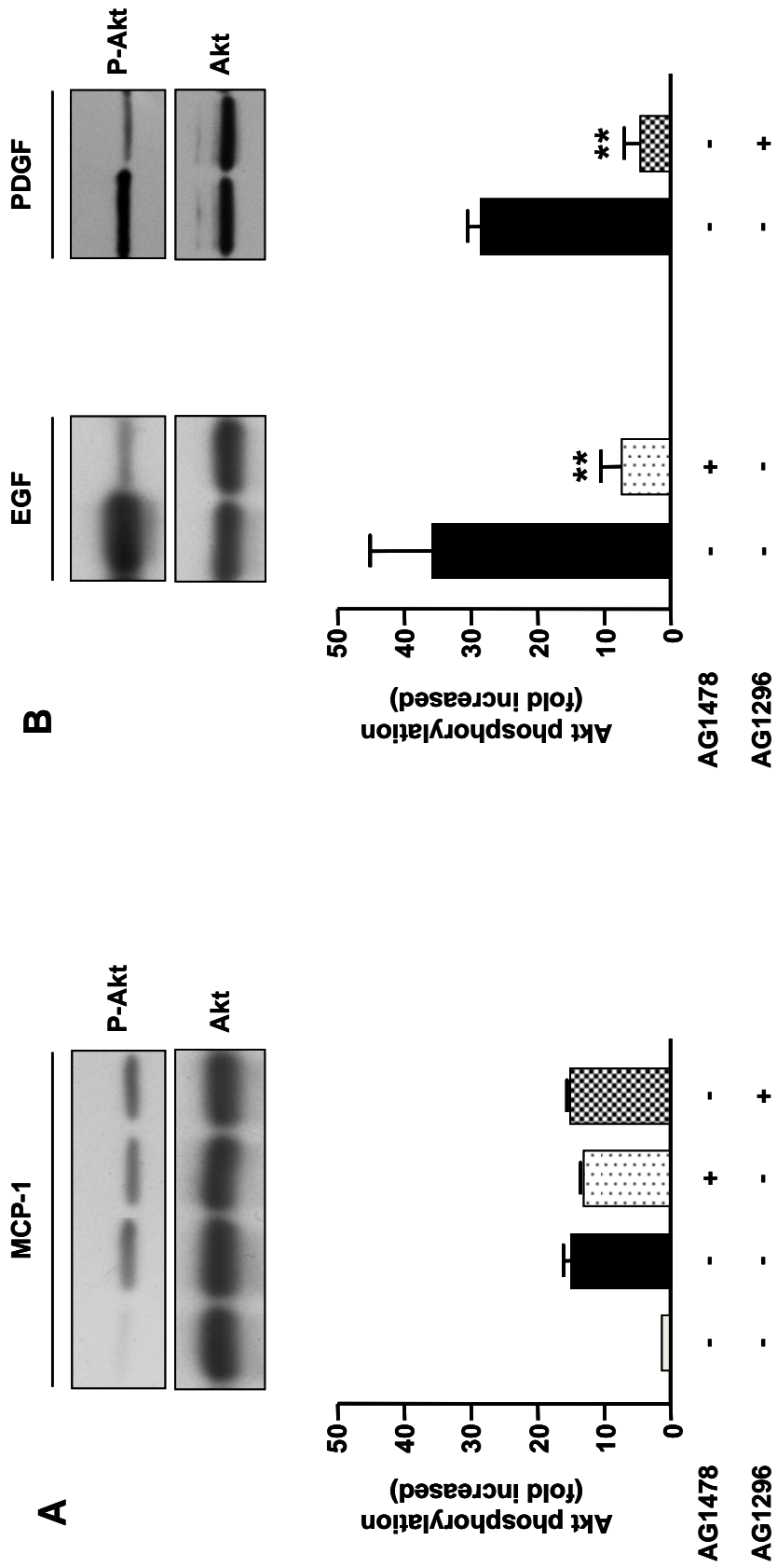
In summary, our study shows that PI3K γ is the major PI3K involved in Akt phosphorylation and migration induced by the chemokine MCP-1. Moreover, we demonstrate that the involvement of PI3K γ in aortic SMC migration is not restricted to MCP-1 since PI3K γ could amplify PDGF-induced cell migration by an autocrine/paracrine pathway involving MCP-1 secretion and CCR2 activation. These results add to anti-inflammatory properties of PI3K γ inhibitor in the arterial wall that we already described [16] make PI3K γ a promising target in the prevention of restenosis process.

References

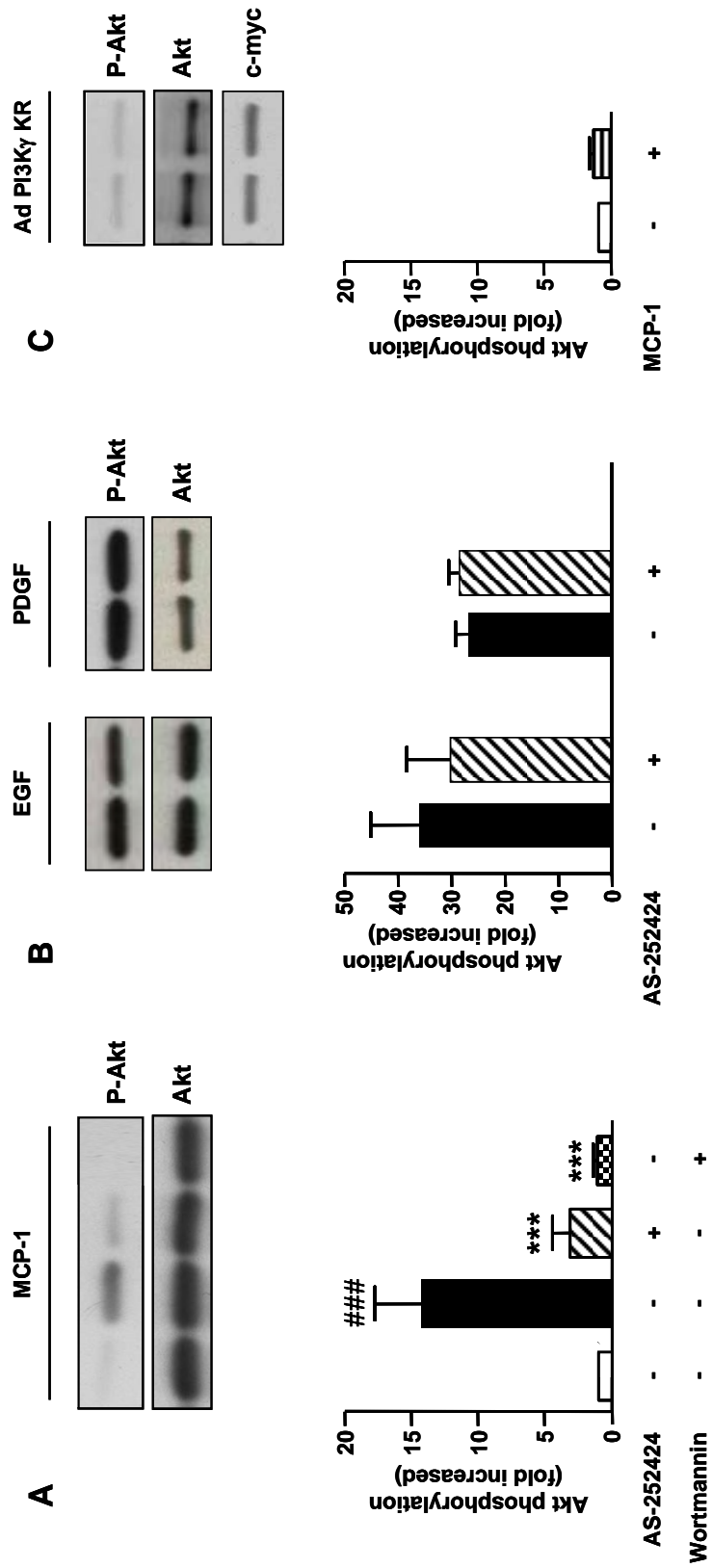
- [1] Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, Wambhoff BR. Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis. *Journal of vascular research*;47:168-180.
- [2] Zargham R. Preventing restenosis after angioplasty: a multistage approach. *Clin Sci (Lond)* 2008;114:257-264.
- [3] Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, *et al.* Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular cell* 1998;2:275-281.
- [4] Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2 $^{-/-}$ mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998;394:894-897.
- [5] Zhong L, Chen WQ, Ji XP, Zhang M, Zhao YX, Yao GH, *et al.* Dominant-negative mutation of monocyte chemoattractant protein-1 prevents vulnerable plaques from rupture in rabbits independent of serum lipid levels. *Journal of cellular and molecular medicine* 2008;12:2362-2371.
- [6] Mori E, Komori K, Yamaoka T, Tamii M, Katsoka C, Takeshita A, *et al.* Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2002;105:2905-2910.
- [7] Egashira K, Zhao Q, Katsoka C, Ohtani K, Usui M, Charo IF, *et al.* Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circulation research* 2002;90:1167-1172.
- [8] Horvath C, Welt FG, Nedelman M, Rao P, Rogers C. Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates: inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted. *Circulation research* 2002;90:488-494.
- [9] Hayes IM, Jordan NJ, Towers S, Smith G, Paterson JR, Earnshaw JJ, *et al.* Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1998;18:397-403.
- [10] Denger S, Jahn L, Wende P, Watson L, Gerber SH, Kubler W, *et al.* Expression of monocyte chemoattractant protein-1 cDNA in vascular smooth muscle cells: induction of the synthetic phenotype: a possible clue to SMC differentiation in the process of atherogenesis. *Atherosclerosis* 1999;144:15-23.
- [11] Ma J, Wang Q, Fei T, Han JD, Chen YG. MCP-1 mediates TGF-beta-induced angiogenesis by stimulating vascular smooth muscle cell migration. *Blood* 2007;109:987-994.
- [12] Grassia G, Maddaluno M, Guglielmotti A, Mangano G, Biondi G, Maffia P, *et al.* The anti-inflammatory agent bindarit inhibits neointima formation in both rats and hyperlipidaemic mice. *Cardiovascular research* 2009;84:485-493.

- [13] Spinetti G, Wang M, Monticone R, Zhang J, Zhao D, Lakatta EG. Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2004;24:1397-1402.
- [14] Vanhaesebroeck B, Leever SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, *et al.* Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual review of biochemistry* 2001;70:535-602.
- [15] Wymann MP, Zvelebil M, Laffargue M. Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends Pharmacol Sci* 2003;24:366-376.
- [16] Fougerat A, Gayral S, Gourdy P, Schambourg A, Ruckle T, Schwarz MK, *et al.* Genetic and pharmacological targeting of phosphoinositide 3-kinase-gamma reduces atherosclerosis and favors plaque stability by modulating inflammatory processes. *Circulation* 2008;117:1310-1317.
- [17] Zhou L, Takayama Y, Boucher P, Tallquist MD, Herz J. LRP1 regulates architecture of the vascular wall by controlling PDGFRbeta-dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation. *PLoS one* 2009;4:e6922.
- [18] Goncharova EA, Anmit AJ, Irani C, Carroll RG, Eszterhas AJ, Panetti RA, *et al.* PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L354-363.
- [19] Irani C, Goncharova EA, Hunter DS, Walker CL, Panetti RA, Krymskaya VP. Phosphatidylinositol 3-kinase but not tuberlin is required for PDGF-induced cell migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282:L854-862.
- [20] Radhakrishnan Y, Maile LA, Ling Y, Graves LM, Clemmons DR. Insulin-like growth factor-I stimulates Src-dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation via Grb2-associated p85 in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 2008;283:16320-16331.
- [21] He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:2509-2514.
- [22] Tanimoto T, Lungu AO, Berk BC. Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 2004;94:1050-1058.
- [23] Voisin L, Foisy S, Giasson E, Lambert C, Moreau P, Meloche S. EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C446-455.
- [24] Kalmes A, Daum G, Clowes AW. EGFR transactivation in the regulation of SMC function. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001;947:42-54; discussion 54-45.
- [25] Condliffe AM, Davidson K, Anderson KE, Ellson CD, Crabbe T, Okkenhaug K, *et al.* Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood* 2005;106:1432-1440.
- [26] Fernandez-Hernando C, Jozsef L, Jenkins D, Di Lorenzo A, Sessa WC. Absence of Akt1 reduces vascular smooth muscle cell migration and survival and induces features of plaque vulnerability and cardiac dysfunction during atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009;29:2033-2040.
- [27] Taubman MB, Rollins BJ, Poon M, Marmur J, Green RS, Berk BC, *et al.* JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 1992;70:314-325.
- [28] Wysocki SJ, Zheng MH, Smith A, Lamawansa MD, Iacopetta BJ, Robertson TA, *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in injured pig artery coincides with early appearance of infiltrating monocyte/macrophages. *Journal of cellular biochemistry* 1996;62:303-313.
- [29] Poon M, Hsu WC, Bogdanov VY, Taubman MB. Secretion of monocyte chemotactic activity by cultured rat aortic smooth muscle cells in response to PDGF is due predominantly to the induction of JEMCP-1. *The American journal of pathology* 1996;149:307-317.
- [30] Bogdanov VY, Poon M, Taubman MB. Platelet-derived growth factor-specific regulation of the JE promoter in rat aortic smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:24932-24938.
- [31] Liu B, Poon M, Taubman MB. PDGF-BB enhances monocyte chemoattractant protein-1 mRNA stability in smooth muscle cells by downregulating ribonuclease activity. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2006;41:160-169.

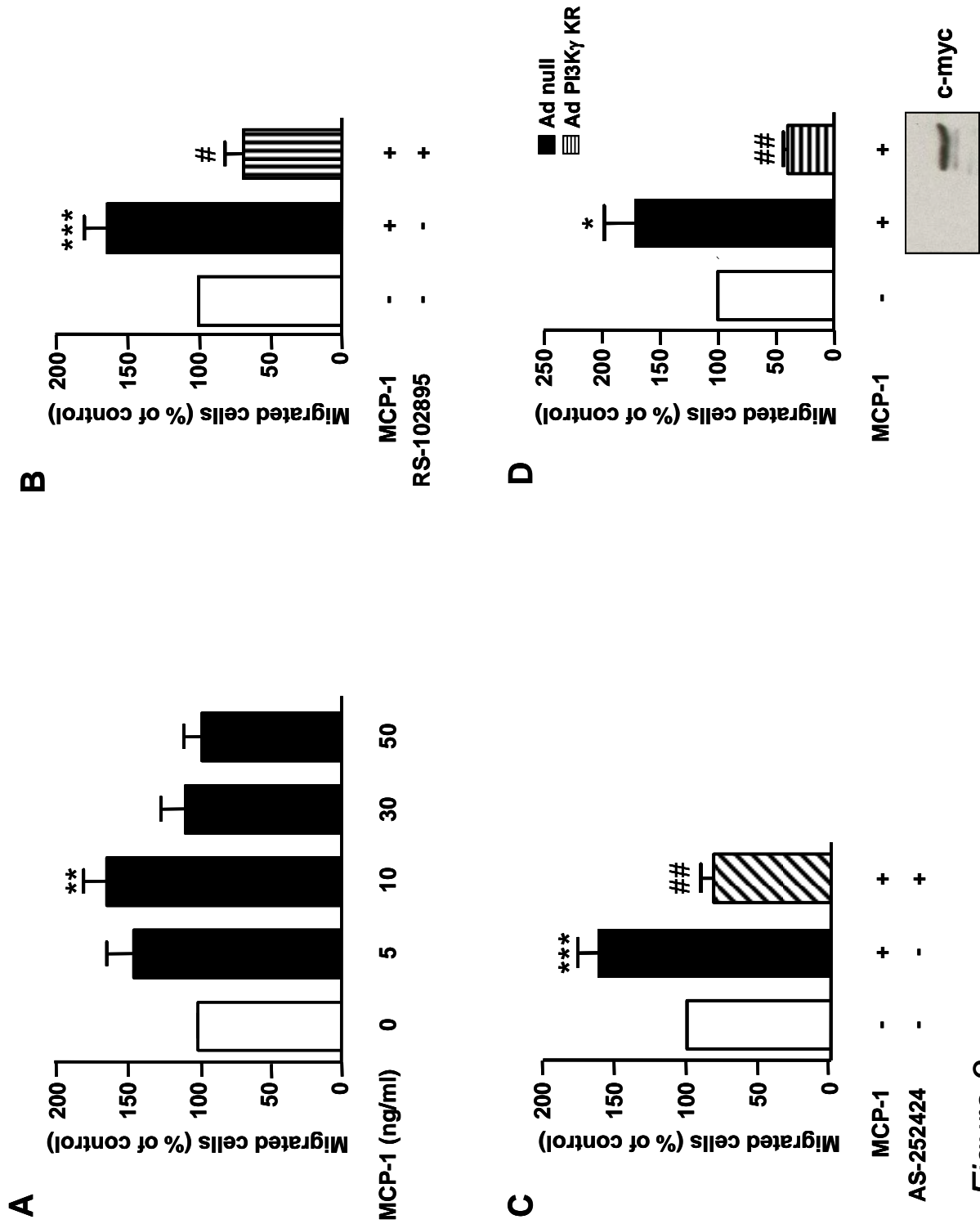
- [32] Leeb-Lundberg LM, Song XH. Bradykinin and bombesin rapidly stimulate tyrosine phosphorylation of a 120-kDa group of proteins in Swiss 3T3 cells. *The Journal of biological chemistry* 1991;266:7746-7749.
- [33] Force T, Kyriakis JM, Avruch J, Bouventre JV. Endothelin, vasopressin, and angiotensin II enhance tyrosine phosphorylation by protein kinase C-dependent and -independent pathways in glomerular mesangial cells. *The Journal of biological chemistry* 1991;266:6650-6656.
- [34] Laffargue M, Raynal P, Yart A, Peres C, Wetzker R, Roche S, *et al.* An epidermal growth factor receptor/Gab1 signaling pathway is required for activation of phosphoinositide 3-kinase by lysophosphatidic acid. *The Journal of biological chemistry* 1999;274:32835-32841.
- [35] Hsieh HL, Tung WH, Wu CY, Wang HH, Lin CC, Wang TS, *et al.* Thrombin induces EGF receptor expression and cell proliferation via a PKC(delta)/c-Src-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2009;29:1594-1601.
- [36] Baudhuin LM, Jiang Y, Zaslavsky A, Ishii I, Chun J, Xu Y. S1P3-mediated Akt activation and cross-talk with platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). *FASEB J* 2004;18:341-343.
- [37] Heller R, Chang Q, Ehrlich G, Hsieh SN, Schoenwaelder SM, Kuhlencordt PJ, *et al.* Overlapping and distinct roles for PI3Kbeta and gamma isoforms in S1P-induced migration of human and mouse endothelial cells. *Cardiovascular research* 2008;80:96-105.
- [38] Sako H, Miura S, Iwata A, Nishikawa H, Kawamura A, Matsuo K, *et al.* Changes in CCR2 chemokine receptor expression and plasma MCP-1 concentration after the implantation of bare metal stents versus sirolimus-eluting stents in patients with stable angina. *Internal medicine (Tokyo, Japan)* 2008;47:7-13.
- [39] Biswas P, Delfanti F, Bernasconi S, Mengozzi M, Cota M, Polentarutti N, *et al.* Interleukin-6 induces monocyte chemoattractant protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood* 1998;91:258-265.
- [40] Kranzhofer R, Clinton SK, Ishii K, Coughlin SR, Fenton JW, 2nd, Libby P. Thrombin potently stimulates cytokine production in human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes. *Circulation research* 1996;79:286-294.
- [41] Rott D, Zhu J, Zhou YF, Burnett MS, Zalles-Ganley A, Epstein SE. IL-6 is produced by splenocytes derived from CMV-infected mice in response to CMV antigens, and induces MCP-1 production by endothelial cells: a new mechanistic paradigm for infection-induced atherogenesis. *Atherosclerosis* 2003;170:223-228.
- [42] Jones GE, Prigmore E, Calvez R, Hogan C, Dunn GA, Hirsch E, *et al.* Requirement for PI 3-kinase gamma in macrophage migration to MCP-1 and CSF-1. *Experimental cell research* 2003;290:120-131.



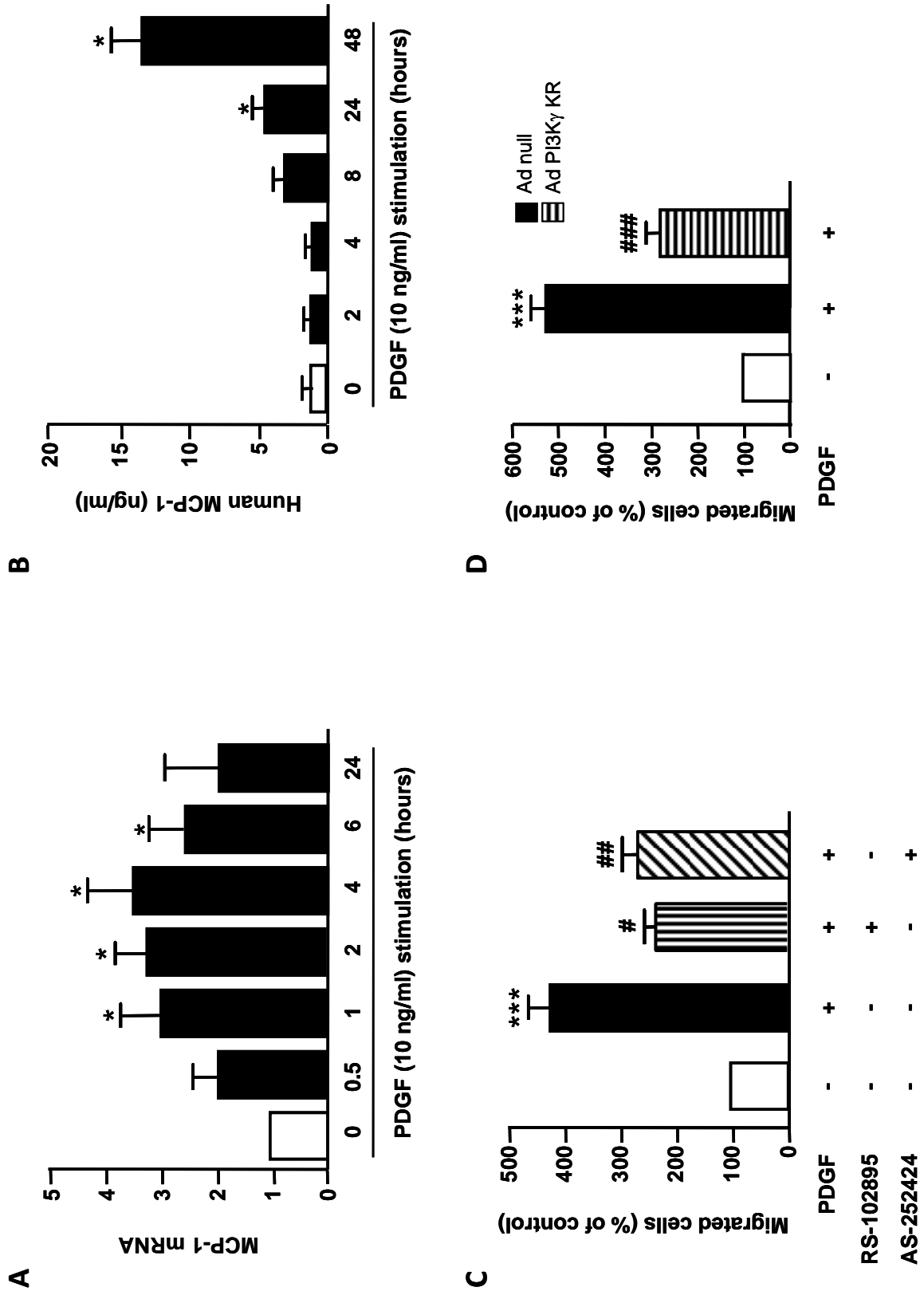
-Figure 1-



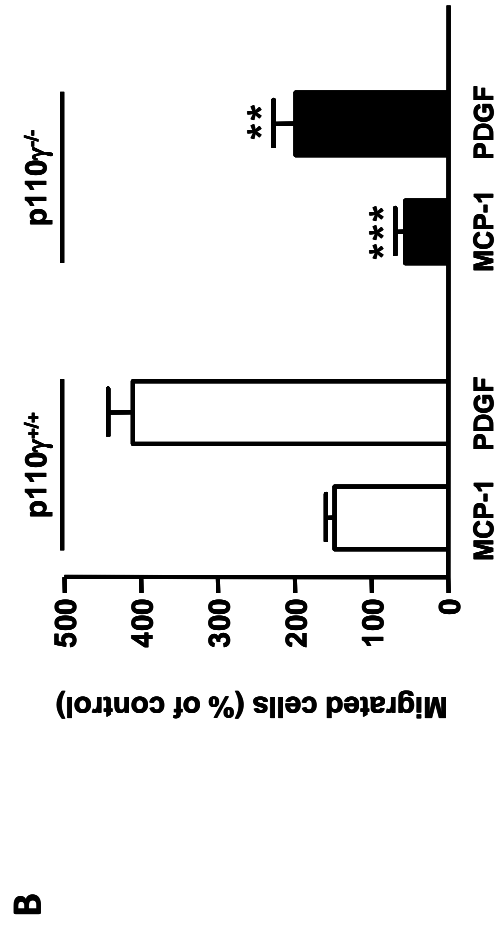
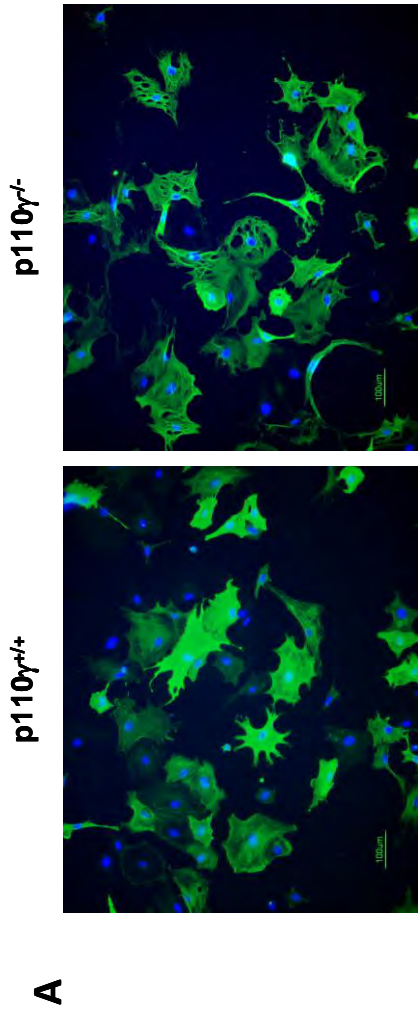
-Figure 2-



-Figure 3-



-Figure 4-



-Figure 5-

Figure legends

Figure 1 Akt phosphorylation induced by MCP-1 in aortic SMC does not require tyrosine kinase receptor transactivation. (A, B) Primary pig aortic SMC were pre-treated 30 min with tyrosine kinase activity inhibitors (AG1478: 300 nM, AG1296: 10 μ M) or with PI3K γ inhibitor AS252424 (100 nM) and stimulated with MCP-1 (10 ng/ml, 5 min) (A), EGF (10 ng/ml, 2 min) or PDGF-BB (10 ng/ml, 2 min) (B). Akt phosphorylation and expression was analyzed with antibodies against phosphorylated Akt (serine 473) and total Akt. Immunoblot shown are representative of 3 independent experiments (n=3). ** P<0.01 compared to EGF or PDGF stimulation.

Figure 2 PI3K γ is required for Akt phosphorylation in MCP-1 activated aortic SMC. (A,B) Pig aortic SMC were pre-incubated (30 min) (A) with wortmannin (100 nM) or AS-252424 (100 nM) and stimulated with MCP-1 (10 ng/ml, 5 min), (B) with AS252424 and stimulated with EGF (10 ng/ml, 5 min) or PDGF (10 ng/ml, 5 min). *** P<0.001 vs MCP-1 and ** P<0.001 compared to unstimulated cells. Lysates were analyzed by western blot using antibodies against phosphorylated Akt (serine 473) or total Akt. Immunoblot as representative experiments and densitometry analyses are shown (means \pm SEM, n=4). (C) Pig aortic SMC were infected with PI3K γ KR-myc adenovirus and stimulated with MCP-1 (10 ng/ml, 5 min). Akt phosphorylation and expression was analyzed with antibodies against phosphorylated Akt (serine 473), total Akt or C-myc. Immunoblot are shown as representative experiments (n=3).

Figure 3 PI3K γ is essential to MCP-1 induced aortic SMC migration. Pig aortic SMC migration was quantified with a wound healing assay using the Oris™ cell migration kit. Confluent SMC were treated with MCP-1 (10 ng/ml) in serum-free medium and allowed to migrate in the wound surface for 48 hours. Migrated cells were stained with DAPI and counted under a fluorescence microscope. Results are expressed as a percent of control. (A)

ARTICLE 2 : rôle de la PI3K γ dans la migration des cellules musculaires lisses aortiques

SMC were treated with indicated concentrations of MCP-1. (B) SMC were treated with MCP-1 (10 ng/ml) only or together with MCP-1 receptor inhibitor (RS-10295: 5 μ g/ml) in serum-free medium. (C) SMC were treated with MCP-1 (10 ng/ml) only or together with a specific PI3K γ inhibitor (AS-252424: 100 nM). (D) SMC infected with null-adenovirus or with an adenovirus encoding a dominant negative form of PI3K γ (PI3K γ -KR) for 72 hours were treated with MCP-1 (10 ng/ml). * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 compared to control, # P<0.05, ## P<0.01 compared to MCP-1 stimulation.

Figure 4 PI3K γ amplifies PDGF-stimulated aortic SMC migration by an MCP-1/CCR2 pathway. (A) Pig aortic SMC were stimulated with PDGF-BB (10 ng/ml) in serum free-medium for indicated times. Total RNA was extracted and subjected to quantitative RT-PCR using specific primers for MCP-1. (B) Human aortic SMC were stimulated with PDGF-BB (10 ng/ml) in serum free-medium at indicated concentrations. Cell supernatants were analyzed for MCP-1 protein content by specific ELISA kit as described under material and methods. (C) Confluent pig aortic SMC were treated with PDGF-BB (10 ng/ml) only or together with MCP-1 receptor inhibitor (RS-10295: 5 μ g/ml) or a specific PI3K γ inhibitor (AS-252424: 100 nM) in serum-free medium. Cells were allowed to migrate for 48 hours and migrated cells were stained with DAPI and counted under a fluorescence microscope. Results are expressed as a percent of control. (D) Pig aortic SMC infected with null-adenovirus or with an adenovirus encoding a dominant negative form of PI3K γ (PI3K γ -KR) for 72 hours were treated with PDGF-BB (10 ng/ml) and analyzed for migration as above. * P<0.05, *** P<0.001 compared to control, #<0.05, ## P<0.01, ### P<0.001 compared to PDGF stimulation.

Figure 5 Effect of PI3K γ deficiency in MCP-1 and PDGF-induced migration of mouse aortic SMC. (A) Aortic SMC from wild type (p110 $\gamma^{+/+}$) and PI3K γ -deficient mice (p110 $\gamma^{-/-}$) were fixed and stained with anti-smooth muscle α -actin antibody. Photomicrographs as representative experiments are shown. (B) Aortic SMC from p110 $\gamma^{+/+}$ and p110 $\gamma^{-/-}$ mice were stimulated with

ARTICLE 2 : rôle de la PI3K γ dans la migration des cellules musculaires lisses aortiques

MCP-1 (10 ng/ml) or PDGF-BB (10 ng/ml) in serum-free medium and allowed to migrate for 48h. Migrated cells were stained with DAPI and counted under a fluorescence microscope. Results are expressed as a percent of control. **P<0.01, *** P<0.001 compared to wild type cells.

III- Conclusion

Cette étude a permis d'identifier la PI3K γ comme l'isoforme majoritaire impliquée dans la phosphorylation d'Akt en aval de MCP-1 dans les CML et dans la migration de ces cellules induite par cette chimiokine. La PI3K γ est également capable d'amplifier la migration des CML en réponse au PDGF par un mécanisme autocrine/paracrine faisant intervenir la sécrétion de MCP-1, l'activation de son récepteur CCR2 et le recrutement de la PI3K γ (**Figure 34**). Ainsi, la PI3K γ joue un rôle essentiel dans la migration des CML vasculaires en aval de deux facteurs majeurs impliqués dans la resténose.

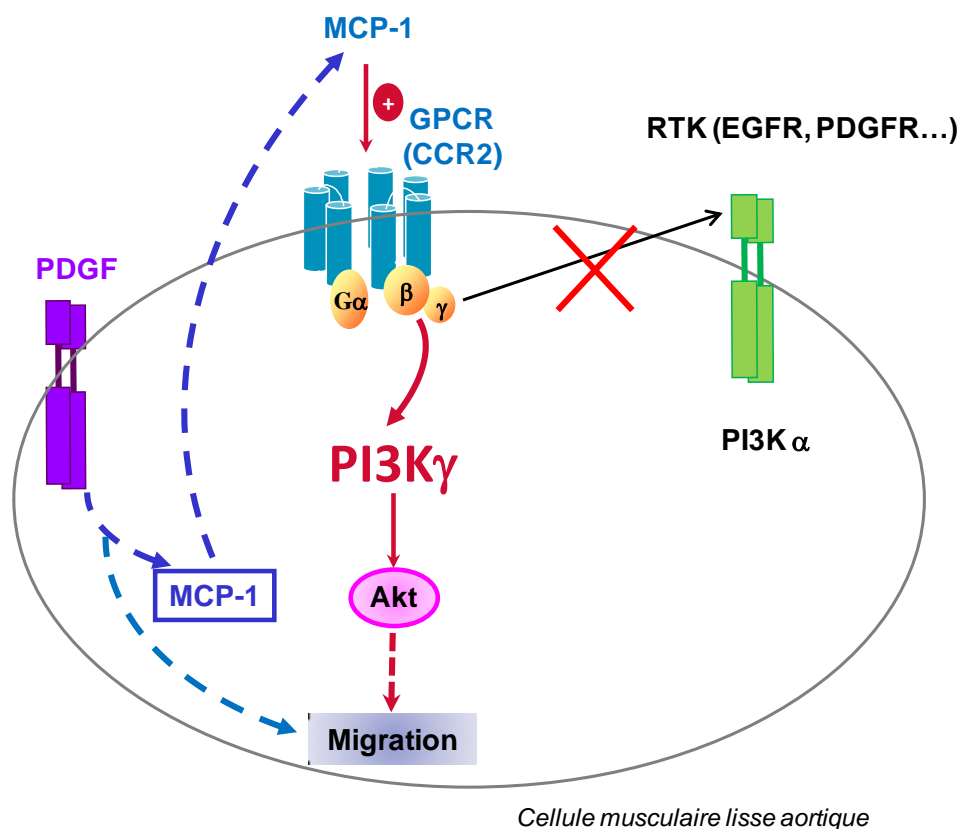


Figure 34 : Schéma illustrant le rôle de la PI3K γ dans la migration des CML aortiques en réponse à MCP-1 et au PDGF.

Ces travaux sont actuellement en cours de rédaction pour être soumis à publication. Pour finaliser cette étude, nous souhaitons également évaluer l'expression de CCR2 dans la paroi artérielle. En effet, bien que de nombreuses études montrent un rôle de MCP-1 dans les CML, l'expression de son récepteur CCR2 dans ces cellules est controversée et semble fortement régulée (cf chapitre I, paragraphe III-3.3.). Nous évaluerons donc l'expression de CCR2 par marquage immunohistochimique sur des segments artériels provenant de patients présentant

ARTICLE 2 : rôle de la PI3K γ dans la migration des cellules musculaires lisses aortiques

une hyperplasie intimale. Le profil d'expression de la PI3K γ sera également observé dans la paroi artérielle pathologique.

PARTIE III : Discussion et Perspectives

Discussion et Perspectives

Ces travaux de thèse ont permis d'identifier l'isoforme γ des PI3K comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement de l'athérosclérose et de ses complications. En effet, nous avons démontré l'importance de cette kinase dans les processus inflammatoires conduisant au développement de l'athérosclérose et à la déstabilisation de la plaque d'athérome. De plus, nos résultats montrent également l'implication de la PI3K γ dans la paroi vasculaire, en particulier dans la migration des CML, mécanisme majeur de la resténose. L'ensemble de ces données ouvre plusieurs axes de recherche pour une compréhension complète du rôle de la PI3K γ dans les pathologies de la paroi artérielle. Ainsi, l'identification du ou des types cellulaires immunitaires dans lesquels la PI3K γ est plus particulièrement impliquée lors de la formation des lésions athéromateuses nous permettrait de mieux comprendre les fonctions de cette protéine dans les processus inflammatoires de la paroi vasculaire. D'autre part, il sera nécessaire de valider nos résultats concernant le rôle de la PI3K γ dans les CML vasculaires par des modèles d'étude *in vivo* reproduisant la pathologie de la resténose. Enfin, il est important d'évaluer l'implication potentielle de la PI3K γ dans l'ensemble des cellules de la paroi artérielle, en particulier dans les cellules endothéliales, permettant d'avoir une vue d'ensemble des différentes fonctions de cette isoforme dans la paroi vasculaire.

I- PI3K γ et athérosclérose : la PI3K γ de quel type cellulaire est essentielle dans le développement de la pathologie ?

Les résultats présentés dans l'article 1 mettent en évidence le rôle central de la PI3K γ dans les processus inflammatoires conduisant au développement de l'athérosclérose. Les perspectives de ce travail consistent à préciser les mécanismes cellulaires mis en jeu, avec comme objectif principal de déterminer la fonction de la PI3K γ dans les différents types cellulaires du système immunitaire (macrophages, lymphocytes T, mastocytes) lors du développement de l'athérosclérose. nous discuterons également le rôle potentiel de la PI3K γ dans les EPC en évaluant l'effet de son inhibition dans ces cellules lors de l'athérosclérose.

I-1. Dans quelles cellules immunitaires ?

Nos résultats ont permis de montrer que l'absence de la PI3K γ spécifiquement dans les cellules inflammatoires peut à elle seule expliquer les effets anti-athérogènes observés lors de l'étude pharmacologique et suggèrent donc un rôle majeur de cette kinase dans les cellules du système immunitaire. Il serait donc maintenant intéressant de déterminer plus précisément dans quel type cellulaire immunitaire la PI3K γ est particulièrement impliquée dans cette pathologie. L'analyse de la composition cellulaire des plaques montrent une diminution de l'infiltration des macrophages (30%) et des lymphocytes T (39%) en absence de PI3K γ dans les cellules hématopoïétiques suggérant un rôle de cette isoforme dans le recrutement de ces cellules inflammatoires conduisant au développement de l'athérosclérose. Ces observations peuvent s'expliquer par le rôle central que joue la PI3K γ en aval de nombreuses chimiokines dans le recrutement des macrophages aux sites d'inflammation [272] [273] [274]. Ces chimiokines telles que MCP-1 sont en effet impliquées de façon importante dans le recrutement des macrophages jouant un rôle majeur dans les premières étapes de la maladie [31]. S'il est clairement établi que la PI3K γ est impliquée dans le recrutement des macrophages, son rôle dans la fonction de ces cellules est inconnu. Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre 1, il existe deux sous-types de monocytes chez la souris (Ly-6C^{high} et Ly-6C^{low}) qui se différencient dans les lésions en deux sous-types différents de macrophages : les macrophages M1 inflammatoires et les macrophages M2 anti-inflammatoires et exprimant les récepteurs scavengers. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer si la PI3K γ peut jouer un rôle dans la différenciation des macrophages M1 et/ou M2. Pour le tester *in vitro*, nous pourrions isoler des monocytes issus de souris sauvages ou déficientes en PI3K γ , les différencier en macrophages M1 (en présence de TNF- α ou LPS) ou en macrophages M2 (en présence d'IL-4 ou d'IL-13) et évaluer dans les deux génotypes les marqueurs de différenciation de ces deux sous-types de macrophages, par RT-PCR ou par des tests ELISA, tels que l'IL-6, le TNF- α , MCP-1 ou iNOS pour les macrophages M1 et l'IL-10, l'arginase 1 ou CD163 pour les macrophages M2. Dans nos modèles de souris athéromateuses traitées avec l'inhibiteur de PI3K γ ou déficientes en PI3K γ dans le système immunitaire, il serait intéressant d'analyser par cytométrie en flux la proportion des deux sous-types de monocytes à l'aide du marqueur Ly-6C. Des marquages immunohistochimiques des macrophages M1 et M2 dans les lésions athéromateuses à l'aide des marqueurs précédemment cités pourraient également être réalisés dans nos modèles.

Les effets de la PI3K γ du système immunitaire que nous observons pourraient aussi être dus à son rôle dans les lymphocytes T. La PI3K γ pourrait en effet être impliquée dans le recrutement de ces cellules aux sites d'inflammation mais également dans la modulation du ratio de différenciation CD4/CD8. Les données de la littérature concernant le rôle de la PI3K γ dans la migration de ces cellules sont assez contradictoires. Comme décrit dans l'introduction bibliographique, cette kinase serait impliquée dans l'angle de rotation de ces cellules plutôt que dans leur migration. En accord avec ces données, Barber *et al.* montrent *in vivo* que l'induction d'un lupus érythémateux chez la souris est amélioré par l'absence de PI3K γ sans modification de l'invasion des cellules T, suggérant que la PI3K γ n'est pas impliquée dans la migration des cellules T *in vivo* [294]. Lors de l'athérosclérose, la PI3K γ pourrait par contre conduire à une modification du ratio CD4/CD8. En accord avec ces données, les souris ApoE $^{-/-}$ traitées avec l'inhibiteur de PI3K γ que nous avons utilisées présentent une diminution du ratio CD4/CD8 en comparaison des animaux contrôles (**Figure 35**).

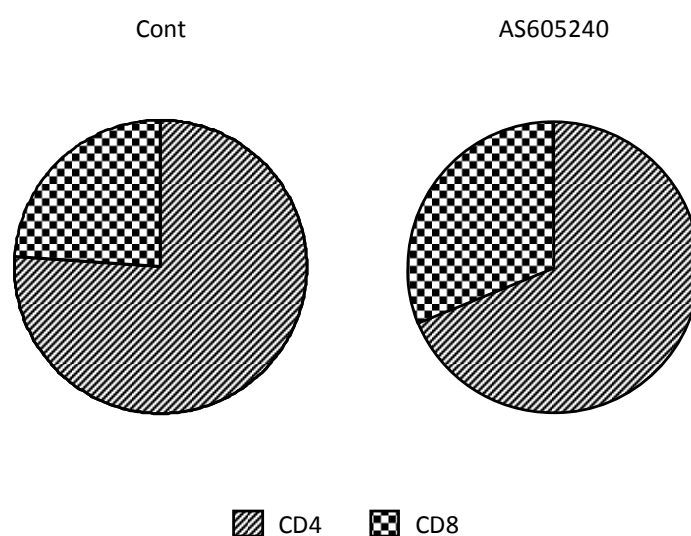


Figure 35 : L'inhibition pharmacologique de l'activité PI3K γ modifie le ratio CD4 $^{+}$ /CD8 $^{+}$ chez les souris ApoE $^{-/-}$. Des souris ApoE $^{-/-}$ âgées de 8 semaines sont traitées avec l'AS-605240 (10 mg kg $^{-1}$, n=5) ou véhicule (Cont, n=5) toutes les 12 heures pendant 5 semaines. Les cellules sanguines des deux groupes d'animaux sont marquées avec des anticorps anti-CD4 et anti-CD8 et analysées par cytométrie en flux. La proportion moyenne de cellules CD4 $^{+}$ et CD8 $^{+}$ de chaque souris est représentée.

D'après ces données et étant donné l'importance des lymphocytes T dans les étapes précoces de l'athérosclérose [50], il nous paraît particulièrement intéressant d'évaluer le rôle de la PI3K γ des lymphocytes T dans le développement de la plaque d'athérome, en particulier dans l'initiation de la maladie.

Afin de déterminer l'importance de la PI3K γ dans les lymphocytes T, nous avons débuté une étude utilisant des souris athéromateuses déficientes en lymphocytes (ApoE^{-/-} x Rag2^{-/-}) que nous avons reconstituées avec des splénocytes CD3⁺ issus de souris sauvages ou déficientes en PI3K γ . Les souris ApoE^{-/-}/Rag2^{-/-} non réinjectées ont constitué le contrôle de ces expériences permettant de vérifier que la déficience en lymphocytes inhibe le développement de l'athérosclérose comme décrit dans la littérature [50]. Les plaques d'athérome formées ont été étudiées sur des animaux âgés de 10 semaines et après 6 semaines de régime gras, comme pour l'étude précédente par analyse histologique des plaques d'athérome colorées à l'huile rouge. Si la PI3K γ des lymphocytes T joue un rôle essentiel dans le développement de l'athérosclérose, on s'attend à ce que 1) les souris Rag2^{-/-}/ApoE^{-/-} reconstituées avec des splénocytes CD3⁺ sauvages développent des lésions plus importantes que les souris Rag2^{-/-}/ApoE^{-/-} contrôles non reconstituées ; 2) le transfert adoptif des splénocytes CD3⁺ PI3K γ ^{-/-} ne permette pas une restitution du développement de la plaque en comparaison des animaux reconstitués avec des splénocytes CD3⁺ sauvages. En parallèle, les sous-populations lymphocytaires présentes dans les splénocytes des souris donneuses ont été analysées par cytométrie en flux (proportion CD4/CD8). Lors de premières expériences, nous avons rencontré des difficultés à reproduire les résultats décrits dans la littérature qui montrent que le transfert de lymphocytes T dans des souris athéromateuses immunodéficientes conduit à une restitution du développement de la plaque [50]. Nous avons alors testé un autre protocole consistant à réaliser une double réinjection de splénocytes CD3⁺. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus montrent une tendance, bien que non significative, à une restitution du développement des lésions athéromateuses avec le transfert de lymphocytes T sauvages qui n'est pas observée lorsque les lymphocytes T réinjectés sont dépourvus de la PI3K γ (**Figure 36**). De plus, les souris réinjectés PI3K γ ^{-/-} présentent bien une diminution du ratio CD4/CD8. Ces premiers résultats suggèrent donc l'implication de la PI3K γ des lymphocytes T dans le développement de la plaque d'athérome. Néanmoins, des études complémentaires sur un plus grand nombre d'animaux sont à présent nécessaires pour confirmer ces données. Les résultats non significatifs obtenus pourraient également s'expliquer par une faible proportion des lymphocytes T réinjectés qui atteignent le site de la lésion. Pour améliorer le protocole, nous pourrions réaliser une triple réinjection et/ou augmenter le nombre de lymphocytes T à réinjecter.

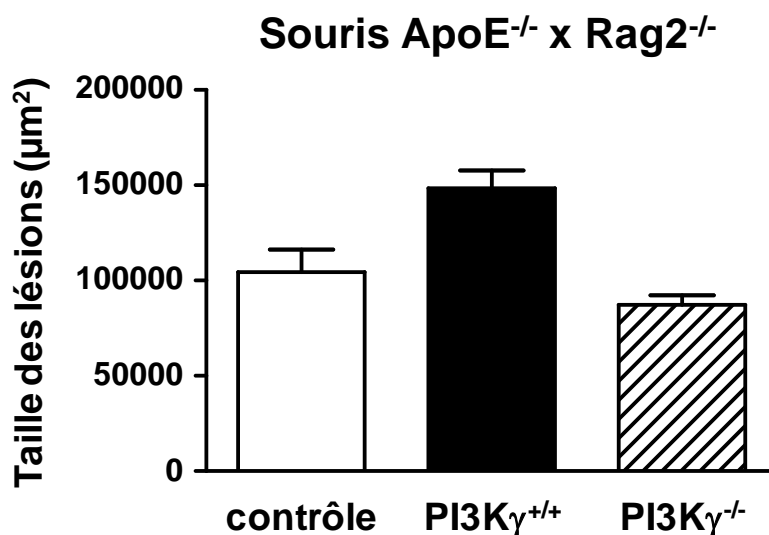


Figure 36 : Lésions athéromateuses développées par les souris ApoE^{-/-}/Rag2^{-/-} contrôles et reconstituées avec des splénocytes PI3K $\gamma^{+/+}$ ou PI3K $\gamma^{-/-}$.

Une expérience complémentaire et inverse visant à déterminer le rôle de la PI3K γ dans les lymphocytes serait de traiter ces souris ApoE^{-/-}/Rag2^{-/-} par un inhibiteur pharmacologique spécifique de l'isoforme γ de PI3K (AS-605240) et analyser comme précédemment les plaques d'athérome par des études quantitatives et qualitatives. Ainsi, nous pourrions évaluer la part des fonctions lymphocytaires de la PI3K γ par rapport aux autres types cellulaires dans le développement de la plaque d'athérome.

Nos résultats montrent un effet particulièrement intéressant de la PI3K γ hématopoïétique dans la déstabilisation de la plaque. Etant donné 1) le rôle récemment démontré des mastocytes dans ce processus [61] et 2) le rôle de la PI3K γ dans les fonctions mastocytaires [313] (cf chapitre 2, paragraphe II-2.4.), la PI3K γ des mastocytes pourrait jouer un rôle important dans la formation et/ou la déstabilisation des lésions athéromateuses. La PI3K γ pourrait d'une part être impliquée dans le recrutement de ces cellules et d'autre part dans leur fonction. Le recrutement des mastocytes *via* des agonistes de RCPG (SCF, CCL11) joue un rôle important dans le développement des lésions athéromateuses et pourrait impliquer la PI3K γ . Ainsi, il serait dans un premier temps intéressant d'analyser dans notre modèle le contenu en mastocytes dans les plaques d'athérome par marquage immunohistochimique à l'aide d'un anticorps mMCP-4 (mouse mast cell protease-4) [61]. Même si le recrutement des mastocytes sur le site de lésion n'est pas modifié en absence de PI3K γ , cette protéine pourrait avoir un effet direct sur la fonctionnalité de ces cellules lors de l'athérosclérose. En effet,

comme décrit dans l'introduction bibliographique, la PI3K γ joue un rôle central dans les fonctions mastocytaires, en particulier dans la dégranulation de ces cellules en réponse à la stimulation du récepteur aux IgE [313]. Ainsi, le rôle de la PI3K γ dans la fonction des mastocytes pourraient jouer un rôle important dans le développement de l'athérosclérose, en particulier dans les étapes tardives. Les mastocytes semblent en effet jouer un rôle majeur dans la déstabilisation des lésions en sécrétant de nombreuses molécules pro-inflammatoires ainsi que des enzymes capables d'induire l'activation de MMP ou d'agir directement sur les CML, l'ensemble de ces processus participant à la déstabilisation de la plaque [64] (cf chapitre 1). Sun *et al.* montrent ainsi une diminution de la taille des lésions en absence des mastocytes essentiellement à des stades avancés et observent une augmentation du contenu en collagène favorisant la stabilité de la plaque [61]. De ce fait, l'hypothèse mise en avant dans nos projets est l'implication de la PI3K γ mastocytaire dans la déstabilisation de la plaque.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons commencé par reproduire le modèle décrit par Sun *et al.* en croisant des souris déficientes en mastocytes matures (Kit^{W-sh/W-sh}), à cause d'une mutation inverse dans le gène c-kit, avec des souris LDLr^{-/-}. Nous vérifierons dans un premier temps que ces souris LDLr^{-/-}/Kit^{W-sh/W-sh} soumises à un régime hypercholestérolémique développent des lésions moins importantes que les souris contrôles LDLr^{-/-}, comme cela a été montré par Sun *et al.* [61]. Puis, ces souris double déficientes seront reconstituées avec des mastocytes issus de la moelle osseuse de souris sauvages ou déficientes en PI3K γ et soumises à un régime hypercholestérolémique pendant 10 ou 25 semaines afin d'évaluer le rôle de la PI3K γ des mastocytes dans le développement et la stabilité de la plaque. Les lésions athéromateuses développées par les souris des différents génotypes seront analysées comme dans l'article 1 par coloration des lipides à l'huile rouge. De même, nous analyserons la composition cellulaire des plaques, en cellules inflammatoires, en CML et en collagène. Nous pourrions également réaliser des expériences de zymographie *in situ* pour visualiser l'activité des protéases.

En fonction des résultats obtenus *in vivo*, différentes expériences complémentaires permettant de préciser le rôle de la PI3K γ des mastocytes dans la pathologie pourraient être réalisées. Ainsi, si l'effet de la déficience en PI3K γ est observé lors de l'initiation et/ou le développement des lésions, nous pourrions évaluer *in vitro* l'effet de la PI3K γ sur la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par ces cellules. Des expériences préliminaires sur des mastocytes issus de souris sauvages ou PI3K γ ^{-/-} montrent une diminution des taux d'ARNm en IL-6, MCP-1 et TNF- α , mesurés par PCR quantitative (**Figure 37**).

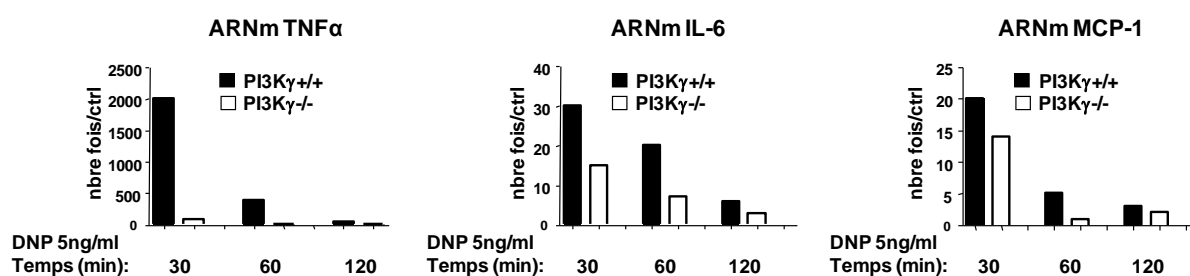


Figure 37 : Production des ARNm de l'IL-6, TNF- α et MCP-1 dans les mastocytes dérivés de la moelle osseuse de souris sauvages et PI3K γ ^{-/-}. Les cellules de la moelle osseuse issue de souris sauvages ou PI3K γ ^{-/-} sont cultivées en présence d'IL-3 pendant trois semaines permettant leur différenciation en mastocytes. Les mastocytes sont ensuite stimulés par du DNP (5 ng/ml) et la production d'ARNm codant pour le TNF α , l'IL-6 et MCP-1 est mesurée après 30, 60 et 120 min de stimulation. Les résultats sont exprimés en nombre de fois d'augmentation par rapport aux cellules non stimulées.

Ces données devront maintenant être confirmées au niveau protéique avec par exemple un test ELISA. Dans leurs travaux, Sun et *al.* montrent que le transfert de mastocytes dérivés de la moelle osseuse de souris déficientes en IL-6 ou en IFN- γ à des souris LDLr^{-/-} conduit à une diminution de la taille des lésions comparable à celle induite par la déficience totale en mastocytes [61]. Ces résultats indiquant un rôle majeur de ces cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les mastocytes dans le développement de l'athérosclérose, associés à nos premiers résultats, renforcent la potentielle implication de la PI3K γ dans le développement de la pathologie.

Si les résultats obtenus *in vivo* montrent un effet de la PI3K γ des mastocytes sur la déstabilisation de la plaque, il serait intéressant d'évaluer l'impact des mastocytes sur les fonctions des CML ainsi que le rôle de la PI3K γ dans ces mécanismes. Nous pourrions réaliser des co-cultures de CML et de cellules de moelle osseuse issues de souris sauvages ou déficientes en PI3K γ préparées comme décrit précédemment et comparer 1) l'apoptose des CML, par la méthode TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling) ou par marquage des phosphatidylsérines par l'annexine V à la surface des cellules ou encore par l'analyse des caspases par western-blot ; 2) l'activité de protéases telles que les gélatinases MMP-2 et MMP-9 par zymographie sur gel, ou les cathepsines en utilisant une sonde iodée qui se lie aux sites actifs de ces protéases actives [365].

Ainsi, en utilisant en particulier deux modèles de transfert adoptif (**Figure 38**), l'ensemble des résultats devraient permettre de déterminer les mécanismes cellulaires mis en jeu dans les effets anti-athérogènes de la PI3K γ et d'identifier le ou les types cellulaires du système immunitaire dans lesquels la PI3K γ joue un rôle central dans le développement de la pathologie. En raison du rôle prépondérant de ces différents types cellulaires en fonction du stade de développement de la maladie considéré, la PI3K γ pourrait être impliquée dans le recrutement des macrophages et des lymphocytes T dans les étapes précoces et dans les fonctions des mastocytes dans les stades plus tardifs.

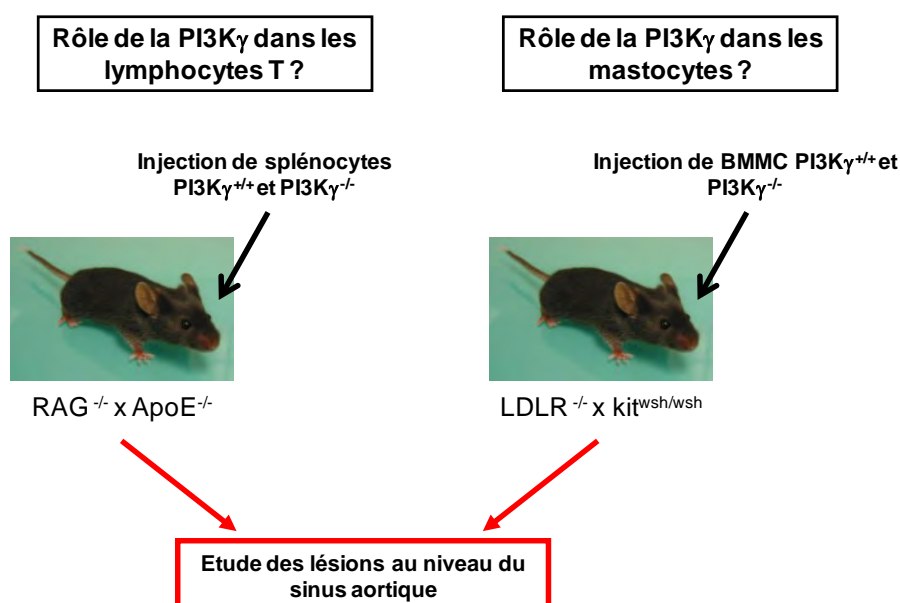


Figure 38 : Principales perspectives de l'article 1. L'objectif principal consiste à déterminer dans quels types cellulaires du système immunitaire (lymphocytes et/ou mastocytes) la PI3K γ est plus particulièrement impliquée lors du développement de l'athérosclérose. BMMC : bone marrow-derived mast cells.

1-2. Implication de la PI3K γ d'autres types cellulaires ?

Les expériences de transfert de moelle osseuse présentées dans l'article 1 ont montré que la PI3K γ des cellules du système immunitaire peut à elle seule expliquer les effets observés dans l'étude pharmacologique. Cependant, la PI3K γ étant également exprimée dans les EPC, nous ne pouvons pas exclure un rôle de son activité dans ces cellules qui peuvent également dériver de la moelle osseuse.

Le rôle de la PI3K γ dans les EPC est controversé, de même que le rôle de ces cellules progénitrices dans le développement des lésions athéromateuses. Le recrutement des EPC implique en particulier la chimiokine SDF-1 α et son récepteur CXCR4. Par ailleurs, Chavakis

et al. ont montré un rôle de la PI3K γ dans la migration des EPC en réponse à SDF-1 α [327]. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 1 (paragraphe II-3.1.), dans l'athérosclérose les EPC pourraient participer à la régénération endothéliale mais aussi à la déstabilisation de la plaque. Les résultats obtenus par différentes équipes sont contradictoires et ne permettent pas de conclure quant au rôle des EPC dans la pathologie. Alors que certains auteurs montrent un rôle athéroprotecteur de ces cellules progénitrices [22], d'autres n'observent aucun effet sur le développement de la plaque [24], et d'autres encore montrent que le recrutement et la mobilisation des EPC dérivées de la moelle osseuse sont impliqués dans l'augmentation de la taille des lésions et la déstabilisation de la plaque [23]. Cet effet des EPC sur la déstabilisation des lésions est particulièrement intéressant puisque nos résultats montrent une augmentation de la stabilité de la plaque dans les souris athéromteuses chimères réinjectées avec de la moelle osseuse PI3K γ ^{-/-}. Il serait donc intéressant d'évaluer le rôle de la PI3K γ des EPC dans la déstabilisation de la plaque. Cependant, les EPC constituent une population hétérogène comprenant des cellules de différentes origines (moelle osseuse, sang circulant, résidant dans l'adventice) et de différents phénotypes dont la définition précise n'est pas claire et nécessite d'être établie.

II- PI3K γ et resténose ?

Nos résultats présentés dans l'article 2 montrent l'implication de la PI3K γ dans les mécanismes cellulaires mis en jeu dans les processus de resténose. En particulier, nous avons démontré pour la première fois un rôle de cette isoforme dans les fonctions des CML vasculaires. La PI3K γ joue en effet un rôle dans la migration de ces cellules en réponse à MCP-1 et de façon indirecte en aval du PDGF, ces deux facteurs étant fortement impliqués dans la resténose. Ces données obtenues *in vitro* ouvrent de nombreuses perspectives de travail pour une meilleure compréhension du rôle de la PI3K γ dans la paroi artérielle. Au niveau cellulaire, il sera en particulier intéressant de déterminer comment l'activation de la PI3K γ en aval de CCR2 conduit à la migration cellulaire dans les CML. D'autre part, l'implication réelle des effets observés *in vitro*, associés aux effets inflammatoires de la PI3K γ , devra être évaluée chez l'animal dans des modèles d'hyperplasie inimale. Finalement, il est important de garder à l'esprit que la PI3K γ pourrait être impliquée dans les fonctions d'autres types cellulaires composant la paroi vasculaire et il sera en particulier important de vérifier que l'inhibition de cette protéine ne modifie pas la cicatrisation de l'endothélium.

II-1. *In vitro*

II-1.1. Rôle de l'activité kinase-indépendante de la PI3K γ dans la migration des CML ?

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, la PI3K γ possède en plus de son activité lipide kinase, un rôle de protéine adaptatrice indépendant de son activité kinase. Cette fonction de la PI3K γ a été mise en évidence grâce à la génération de souris exprimant une forme catalytiquement inactive de la PI3K γ (PI3K γ -KI) et est particulièrement décrite dans les cardiomyocytes [276]. L'activité kinase indépendante de la PI3K γ pourrait également jouer un rôle dans les CML, comme cela a été décrit récemment dans les cellules endothéliales [328]. Pour tester cette hypothèse, des CML isolées à partir d'aortes de souris PI3K γ -KI pourront être utilisées dans nos tests de migration en réponse au PDGF. En comparant les résultats avec ceux obtenus à l'aide des souris PI3K $\gamma^{-/-}$ présentés dans l'article 2, nous pourrions déterminer si les effets de la PI3K γ sur les CML sont dus à son rôle de « docking protein » et/ou à son activité. Nous pensons néanmoins que le rôle de la PI3K γ dans la migration des CML dépend du PIP₃ et de la kinase Akt et que sa fonction de protéine adaptatrice n'est pas impliquée.

II-1.2. Détermination des mécanismes moléculaires de la migration des CML dépendante de la PI3K γ

A ce jour, aucune autre étude n'a rapporté l'implication de la PI3K γ dans les mécanismes de migration des CML. En revanche, comme décrit dans l'introduction bibliographique, de nombreux travaux ont montré un rôle de cette kinase dans la migration des macrophages [272] [273] [274]. Il a également été montré que la PI3K γ contribue à la migration de macrophages murins primaires induite par la chimiokine CCL5 (ou RANTES) *via* l'activation de la petite GTPase Rac1 et de son effecteur PAK2 (p21-activated protein kinase-2) [366]. Par ailleurs, des travaux récents montrent que Akt, en particulier l'isoforme Akt1, joue un rôle majeur dans le contrôle de la migration des CML *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs montrent également que Akt1 est nécessaire à l'activation de Rac1 et de PAK1 dans les CML [347]. De plus, Weber *et al.* montrent l'implication de la voie Rac/PAK dans la migration des CML [367]. Dans notre étude, nous avons montré que la PI3K γ est l'isoforme responsable de la phosphorylation d'Akt dans les CML. D'après l'ensemble de ces données et dans le but de décortiquer les voies de signalisation dépendantes de la PI3K γ conduisant à la migration des CML, il serait intéressant d'évaluer dans notre modèle le lien possible entre la

PI3K γ , Akt et/ou la voie Rac/PAK. Ainsi nous pourrions observer l'effet de l'inhibition d'Akt sur la migration des CML, l'activation de Rac et la phosphorylation de PAK. Dans les CML issues de souris PI3K $\gamma^{-/-}$, nous pourrions aussi mesurer la migration en présence d'inhibiteurs d'Akt, de Rac et de PAK.

II-2. In vivo

II-2.1. PI3K γ et hyperplasie intinale ?

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* devront être confirmés *in vivo* dans un modèle reproduisant l'hyperplasie intinale caractérisant la resténose. L'hyperplasie intinale est due à deux mécanismes principaux : la migration et la prolifération des CML. L'effet de MCP-1 sur la prolifération des CML *in vitro* est controversé. En effet, bien que les études les plus récentes montrent que MCP-1 est capable de stimuler la prolifération de CML humaines [189] [190] et de rat [186] [187], des travaux précédents avaient montré un rôle négatif [185] ou aucun effet [368] de cette chimiokine dans la prolifération des CML. Dans notre modèle nous n'avons pas observé d'effet de MCP-1 sur la prolifération des CML. Néanmoins, le rôle de la PI3K γ dans la migration des CML, ainsi que son implication dans les processus inflammatoires de la paroi artérielle que nous avons démontré [302] et qui jouent un rôle majeur dans le processus de resténose, suggèrent que l'inhibition de la PI3K γ pourrait avoir un effet bénéfique dans la prévention de la resténose en bloquant à la fois les phénomènes inflammatoires et la migration des CML. Pour tester cette hypothèse *in vivo*, nous mettons actuellement au point un modèle de lésion artérielle chez la souris permettant de visualiser l'hyperplasie intinale. La lésion est réalisée dans l'artère fémorale de la souris à l'aide d'un guide d'angioplastie de 0.35 mm de diamètre et induit la formation d'une néointima observable à partir de 7 jours et significative à partir de 14 jours. Des coupes histologiques de l'artère lésée seront ensuite réalisées, colorées au trichrome Masson et l'épaisseur de la néointima développée par les souris sauvages sera comparée à celle développée par les souris PI3K $\gamma^{-/-}$ à 7, 14 et à 28 jours. Nous pourrions également observer par immunohistochimie l'hyperplasie intinale et l'inflammation. Ainsi, les CML seront identifiées à l'aide d'un anticorps anti-smooth muscle α -actine, les macrophages avec un anticorps anti-MOMA-2, les lymphocytes T avec un anticorps anti-CD3 et les neutrophiles avec un anticorps Ly-6G ou par marquage de la myeloperoxydase. Les mêmes expériences pourront être effectuées avec les souris PI3K γ -KI afin de déterminer l'implication de l'activité ou du rôle de protéine adaptatrice de la PI3K γ . De plus, nous pourrions réaliser des souris chimères par un transfert

de moelle osseuse issue de souris déficientes en PI3K γ à des souris sauvages puis effectuer, sur ces souris dépourvues de la PI3K γ dans les cellules immunitaires, une lésion artérielle comme décrit précédemment. En comparant les résultats obtenus avec ceux utilisant les souris PI3K $\gamma^{-/-}$, nous pourrions différencier les effets dus à la PI3K γ des CML de ceux impliquant la PI3K γ immunitaire.

II-2.2. PI3K γ et cicatrisation artérielle ?

La complication majeure associée à la pose de stent actifs est l'apparition de thromboses tardives, qui pourraient être dues à un effet anti-prolifératif des molécules utilisées pour recouvrir les stents non seulement sur les CML mais également sur les cellules endothéliales [213]. Ceci entraînerait un défaut de régénération de l'endothélium qui augmente le risque de thrombose. Les stratégies thérapeutiques pour la prévention de la resténose intra-stent visent donc actuellement à inhiber la prolifération/migration des CML mais aussi à préserver ou à augmenter la cicatrisation artérielle.

La PI3K γ est exprimée dans les cellules endothéliales et est principalement impliquée dans l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium *via* l'expression des sélectines [324]. Les données de la littérature concernant le rôle de la PI3K γ dans la régénération endothéliale sont controversées (cf chapitre 2, II-3.1.). En effet alors que certaines études indiquent une implication de cette kinase dans la néovascularisation [327] [328], Doukas *et al.* n'observent pas d'effet de l'inhibition des PI3K γ/δ sur ce processus [287]. De plus, l'implication de l'activité kinase de la PI3K γ ou de son rôle de protéine adaptatrice est à préciser dans ces mécanismes. Aux vues de l'ensemble de ces données et du rôle « bénéfique » des EPC dans le processus de resténose (cf chapitre 1, paragraphe III-3.1.), il apparaît important d'évaluer l'effet de l'inhibition de la PI3K γ sur la cicatrisation de l'endothélium *in vivo*. Ainsi, des modèles murins permettant de visualiser la régénération endothéliale sont également en cours de réalisation dans le laboratoire. La lésion artérielle est réalisée comme décrit pour l'hyperplasie intinale dans l'artère carotide de souris et la réparation de l'endothélium est observée à 3 ou 5 jours après injection de Bleu Evans, colorant qui se fixe sélectivement sur la membrane basale des zones dénudées. Un deuxième modèle murin d'agression périovasculaire de la carotide pourra être réalisé par l'application d'un courant électrique sur l'artère. A la différence du modèle de lésion mécanique, cette lésion entraîne la destruction totale des cellules endothéliales et des CML. Bien que moins physiologique, ce modèle est plus facile à réaliser techniquement et n'entraîne pas de modification du flux sanguin. La

réendothélialisation est quantifiée comme précédemment avec le Bleu Evans. La comparaison des résultats obtenus avec ces deux modèles chez les souris des différents génotypes (PI3K $\gamma^{+/+}$, PI3K $\gamma^{-/-}$ et PI3K γ -KI) devrait permettre de donner une réponse claire quant au rôle de la PI3K γ dans la cicatrisation artérielle et à l'implication de son activité ou de sa fonction de protéine adaptatrice dans ce processus.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis d'identifier la PI3K γ comme un acteur central des processus inflammatoires de la paroi artérielle conduisant au développement de l'athérosclérose. Ces résultats laissent néanmoins encore de nombreuses questions en suspens, en particulier concernant les mécanismes cellulaires impliquant la PI3K γ dans cette pathologie. Les mécanismes inflammatoires de la paroi vasculaire étant également observés dans la resténose et nos résultats montrant l'implication de la PI3K γ dans la migration des CML *in vitro*, nous pensons que cette kinase pourrait également jouer un rôle essentiel dans l'hyperplasie intimale, mécanisme majeure de la resténose. Le rôle de la PI3K γ dans la formation du thrombus [321] renforce l'intérêt de cibler cette kinase dans les pathologies cardiovasculaires. Ainsi, bien que l'implication de la PI3K γ dans la cicatrisation artérielle reste à exclure, cette protéine pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans le contexte des pathologies cardiovasculaires, en particulier pour le traitement de l'athérosclérose et de ses complications.

PARTIE IV : Bibliographie

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Wang, M., Monticone, R. E. and Lakatta, E. G. Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease. *Current opinion in nephrology and hypertension*. **19**, 201-207
- [2] Herrera, M. D., Mingorance, C., Rodriguez-Rodriguez, R. and Alvarez de Sotomayor, M. Endothelial dysfunction and aging: an update. *Ageing research reviews*. **9**, 142-152
- [3] Yildiz, O. (2007) Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1100**, 353-360
- [4] Cottart, C. H., Laguillier, C., Nivet-Antoine, V., Klimczak, C., Sebban, C. and Beaudoux, J. L. (2009) [Biology of arterial ageing and arteriosclerosis.]. *Comptes rendus biologies*. **332**, 433-447
- [5] Ross, R. (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol*. **57**, 791-804
- [6] Ross, R. (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. **340**, 115-126
- [7] Hansson, G. K. and Libby, P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. **6**, 508-519
- [8] Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. **420**, 868-874
- [9] Tanzawa, K., Shimada, Y., Kuroda, M., Tsujita, Y., Arai, M. and Watanabe, H. (1980) WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS letters*. **118**, 81-84
- [10] Jawien, J., Nastalek, P. and Korbut, R. (2004) Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. **55**, 503-517
- [11] Plump, A. S., Smith, J. D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J. G., Rubin, E. M. and Breslow, J. L. (1992) Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. **71**, 343-353
- [12] Ishibashi, S., Goldstein, J. L., Brown, M. S., Herz, J. and Burns, D. K. (1994) Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *The Journal of clinical investigation*. **93**, 1885-1893
- [13] Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., de Vries-Van der Weij, J., van der Hoorn, J., Princen, H. M. and Kooistra, T. (2007) Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **27**, 1706-1721
- [14] Westrick, R. J., Winn, M. E. and Eitzman, D. T. (2007) Murine models of vascular thrombosis (Eitzman series). *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **27**, 2079-2093
- [15] Mestas, J. and Ley, K. (2008) Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends in cardiovascular medicine*. **18**, 228-232
- [16] Johnson, R. C., Chapman, S. M., Dong, Z. M., Ordovas, J. M., Mayadas, T. N., Herz, J., Hynes, R. O., Schaefer, E. J. and Wagner, D. D. (1997) Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice. *The Journal of clinical investigation*. **99**, 1037-1043
- [17] Collins, R. G., Velji, R., Guevara, N. V., Hicks, M. J., Chan, L. and Beaudet, A. L. (2000) P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*. **191**, 189-194

- [18] Dong, Z. M., Chapman, S. M., Brown, A. A., Frenette, P. S., Hynes, R. O. and Wagner, D. D. (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. **102**, 145-152
- [19] Cybulsky, M. I., Iiyama, K., Li, H., Zhu, S., Chen, M., Iiyama, M., Davis, V., Gutierrez-Ramos, J. C., Connelly, P. W. and Milstone, D. S. (2001) A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. **107**, 1255-1262
- [20] Patel, S. S., Thiagarajan, R., Willerson, J. T. and Yeh, E. T. (1998) Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice. *Circulation*. **97**, 75-81
- [21] Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. and Nourshargh, S. (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. **7**, 678-689
- [22] Rauscher, F. M., Goldschmidt-Clermont, P. J., Davis, B. H., Wang, T., Gregg, D., Ramaswami, P., Pippen, A. M., Annex, B. H., Dong, C. and Taylor, D. A. (2003) Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*. **108**, 457-463
- [23] George, J., Afek, A., Abashidze, A., Shmilovich, H., Deutsch, V., Kopolovich, J., Miller, H. and Keren, G. (2005) Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **25**, 2636-2641
- [24] Zoll, J., Fontaine, V., Gourdy, P., Barateau, V., Vilar, J., Leroyer, A., Lopes-Kam, I., Mallat, Z., Arnal, J. F., Henry, P., Tobelem, G. and Tedgui, A. (2008) Role of human smooth muscle cell progenitors in atherosclerotic plaque development and composition. *Cardiovascular research*. **77**, 471-480
- [25] Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A. M. and Dimmeler, S. (2001) Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circulation research*. **89**, E1-7
- [26] Moreno, P. R., Purushothaman, K. R., Fuster, V., Echeverri, D., Trusczyńska, H., Sharma, S. K., Badimon, J. J. and O'Connor, W. N. (2004) Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. **110**, 2032-2038
- [27] Werner, N. and Nickenig, G. (2006) Clinical and therapeutical implications of EPC biology in atherosclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. **10**, 318-332
- [28] Weber, C., Zernecke, A. and Libby, P. (2008) The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol*. **8**, 802-815
- [29] Galkina, E. and Ley, K. (2009) Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annual review of immunology*. **27**, 165-197
- [30] Gu, L., Okada, Y., Clinton, S. K., Gerard, C., Sukhova, G. K., Libby, P. and Rollins, B. J. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Molecular cell*. **2**, 275-281
- [31] Boring, L., Gosling, J., Cleary, M. and Charo, I. F. (1998) Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*. **394**, 894-897
- [32] Veillard, N. R., Steffens, S., Pelli, G., Lu, B., Kwak, B. R., Gerard, C., Charo, I. F. and Mach, F. (2005) Differential influence of chemokine receptors CCR2 and CXCR3 in development of atherosclerosis in vivo. *Circulation*. **112**, 870-878
- [33] van Wanrooij, E. J., de Jager, S. C., van Es, T., de Vos, P., Birch, H. L., Owen, D. A., Watson, R. J., Biessen, E. A., Chapman, G. A., van Berkel, T. J. and Kuiper, J. (2008) CXCR3 antagonist NBI-74330 attenuates atherosclerotic plaque formation in LDL receptor-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **28**, 251-257

- [34] Woollard, K. J. and Geissmann, F. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat Rev Cardiol.* **7**, 77-86
- [35] Ylitalo, R., Oksala, O., Yla-Herttuala, S. and Ylitalo, P. (1994) Effects of clodronate (dichloromethylene bisphosphonate) on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. *The Journal of laboratory and clinical medicine.* **123**, 769-776
- [36] Libby, P., Nahrendorf, M., Pittet, M. J. and Swirski, F. K. (2008) Diversity of denizens of the atherosclerotic plaque: not all monocytes are created equal. *Circulation.* **117**, 3168-3170
- [37] Swirski, F. K., Libby, P., Aikawa, E., Alcaide, P., Luscinskas, F. W., Weissleder, R. and Pittet, M. J. (2007) Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytoysis and give rise to macrophages in atheromata. *The Journal of clinical investigation.* **117**, 195-205
- [38] Lesnik, P., Haskell, C. A. and Charo, I. F. (2003) Decreased atherosclerosis in CX3CR1^{-/-} mice reveals a role for fractalkine in atherogenesis. *The Journal of clinical investigation.* **111**, 333-340
- [39] Combadiere, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., Merval, R., Proudfoot, A., Tedgui, A. and Mallat, Z. (2008) Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytoysis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation.* **117**, 1649-1657
- [40] Auffray, C., Sieweke, M. H. and Geissmann, F. (2009) Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology.* **27**, 669-692
- [41] Gautier, E. L., Jakubzick, C. and Randolph, G. J. (2009) Regulation of the migration and survival of monocyte subsets by chemokine receptors and its relevance to atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* **29**, 1412-1418
- [42] Smith, J. D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J. and Miyata, M. (1995) Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **92**, 8264-8268
- [43] Stoneman, V., Braganza, D., Figg, N., Mercer, J., Lang, R., Goddard, M. and Bennett, M. (2007) Monocyte/macrophage suppression in CD11b diphtheria toxin receptor transgenic mice differentially affects atherogenesis and established plaques. *Circulation research.* **100**, 884-893
- [44] Glass, C. K. and Witztum, J. L. (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* **104**, 503-516
- [45] Moore, K. J., Kunjathoor, V. V., Koehn, S. L., Manning, J. J., Tseng, A. A., Silver, J. M., McKee, M. and Freeman, M. W. (2005) Loss of receptor-mediated lipid uptake via scavenger receptor A or CD36 pathways does not ameliorate atherosclerosis in hyperlipidemic mice. *The Journal of clinical investigation.* **115**, 2192-2201
- [46] Tabas, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* **10**, 36-46
- [47] Tabas, I. (2005) Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* **25**, 2255-2264
- [48] Liu, J., Thewke, D. P., Su, Y. R., Linton, M. F., Fazio, S. and Sinensky, M. S. (2005) Reduced macrophage apoptosis is associated with accelerated atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-null mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* **25**, 174-179

- [49] Gautier, E. L., Huby, T., Witztum, J. L., Ouzilleau, B., Miller, E. R., Saint-Charles, F., Aucouturier, P., Chapman, M. J. and Lesnik, P. (2009) Macrophage apoptosis exerts divergent effects on atherogenesis as a function of lesion stage. *Circulation*. **119**, 1795-1804
- [50] Song, L., Leung, C. and Schindler, C. (2001) Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *The Journal of clinical investigation*. **108**, 251-259
- [51] Zhou, X., Nicoletti, A., Elhage, R. and Hansson, G. K. (2000) Transfer of CD4(+) T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*. **102**, 2919-2922
- [52] Davenport, P. and Tipping, P. G. (2003) The role of interleukin-4 and interleukin-12 in the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of pathology*. **163**, 1117-1125
- [53] Elhage, R., Jawien, J., Rudling, M., Ljunggren, H. G., Takeda, K., Akira, S., Bayard, F. and Hansson, G. K. (2003) Reduced atherosclerosis in interleukin-18 deficient apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovascular research*. **59**, 234-240
- [54] Gupta, S., Pablo, A. M., Jiang, X., Wang, N., Tall, A. R. and Schindler, C. (1997) IFN-gamma potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *The Journal of clinical investigation*. **99**, 2752-2761
- [55] Daugherty, A. and Rateri, D. L. (2002) T lymphocytes in atherosclerosis: the yin-yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. *Circulation research*. **90**, 1039-1040
- [56] Zhou, X., Paulsson, G., Stemme, S. and Hansson, G. K. (1998) Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic apo E-knockout mice. *The Journal of clinical investigation*. **101**, 1717-1725
- [57] Ait-Oufella, H., Salomon, B. L., Potteaux, S., Robertson, A. K., Gourdy, P., Zoll, J., Merval, R., Esposito, B., Cohen, J. L., Fisson, S., Flavell, R. A., Hansson, G. K., Klatzmann, D., Tedgui, A. and Mallat, Z. (2006) Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nature medicine*. **12**, 178-180
- [58] Mallat, Z., Taleb, S., Ait-Oufella, H. and Tedgui, A. (2009) The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. *Journal of lipid research*. **50 Suppl**, S364-369
- [59] Major, A. S., Fazio, S. and Linton, M. F. (2002) B-lymphocyte deficiency increases atherosclerosis in LDL receptor-null mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **22**, 1892-1898
- [60] Caligiuri, G., Nicoletti, A., Poirier, B. and Hansson, G. K. (2002) Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *The Journal of clinical investigation*. **109**, 745-753
- [61] Sun, J., Sukhova, G. K., Wolters, P. J., Yang, M., Kitamoto, S., Libby, P., MacFarlane, L. A., Mallen-St Clair, J. and Shi, G. P. (2007) Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nature medicine*. **13**, 719-724
- [62] Haley, K. J., Lilly, C. M., Yang, J. H., Feng, Y., Kennedy, S. P., Turi, T. G., Thompson, J. F., Sukhova, G. H., Libby, P. and Lee, R. T. (2000) Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation*. **102**, 2185-2189
- [63] Kovanen, P. T. (2007) Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis. *Immunol Rev*. **217**, 105-122
- [64] Libby, P. and Shi, G. P. (2007) Mast cells as mediators and modulators of atherogenesis. *Circulation*. **115**, 2471-2473
- [65] Kokkonen, J. O. (1989) Stimulation of rat peritoneal mast cells enhances uptake of low density lipoproteins by rat peritoneal macrophages in vivo. *Atherosclerosis*. **79**, 213-223
- [66] Fougerat, A., Gayral, S., Malet, N., Briand-Mesange, F., Breton-Douillon, M. and Laffargue, M. (2009) Phosphoinositide 3-kinases and their role in inflammation: potential clinical targets in atherosclerosis? *Clin Sci (Lond)*. **116**, 791-804

- [67] Boyle, J. J., Bowyer, D. E., Weissberg, P. L. and Bennett, M. R. (2001) Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-ligand/Fas interactions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **21**, 1402-1407
- [68] Kolodgie, F. D., Narula, J., Burke, A. P., Haider, N., Farb, A., Hui-Liang, Y., Smialek, J. and Virmani, R. (2000) Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *The American journal of pathology*. **157**, 1259-1268
- [69] Schrijvers, D. M., De Meyer, G. R., Kockx, M. M., Herman, A. G. and Martinet, W. (2005) Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **25**, 1256-1261
- [70] Galis, Z. S., Muszynski, M., Sukhova, G. K., Simon-Morrissey, E., Unemori, E. N., Lark, M. W., Amento, E. and Libby, P. (1994) Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circulation research*. **75**, 181-189
- [71] Lee, E., Grodzinsky, A. J., Libby, P., Clinton, S. K., Lark, M. W. and Lee, R. T. (1995) Human vascular smooth muscle cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **15**, 2284-2289
- [72] Mach, F., Schonbeck, U., Bonnefoy, J. Y., Pober, J. S. and Libby, P. (1997) Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation*. **96**, 396-399
- [73] Mach, F., Schonbeck, U., Sukhova, G. K., Bourcier, T., Bonnefoy, J. Y., Pober, J. S. and Libby, P. (1997) Functional CD40 ligand is expressed on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for CD40-CD40 ligand signaling in atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**, 1931-1936
- [74] Geng, Y. J., Wu, Q., Muszynski, M., Hansson, G. K. and Libby, P. (1996) Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **16**, 19-27
- [75] Naruko, T., Ueda, M., Haze, K., van der Wal, A. C., van der Loos, C. M., Itoh, A., Komatsu, R., Ikura, Y., Ogami, M., Shimada, Y., Ehara, S., Yoshiyama, M., Takeuchi, K., Yoshikawa, J. and Becker, A. E. (2002) Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation*. **106**, 2894-2900
- [76] Zerneck, A., Bot, I., Djalali-Talab, Y., Shagdarsuren, E., Bidzhekov, K., Meiler, S., Krohn, R., Schober, A., Sperandio, M., Soehnlein, O., Bornemann, J., Tacke, F., Biessen, E. A. and Weber, C. (2008) Protective role of CXC receptor 4/CXC ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circulation research*. **102**, 209-217
- [77] van Leeuwen, M., Gijbels, M. J., Duijvestijn, A., Smook, M., van de Gaar, M. J., Heeringa, P., de Winther, M. P. and Tervaert, J. W. (2008) Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **28**, 84-89
- [78] Liu, P., Yu, Y. R., Spencer, J. A., Johnson, A. E., Vallanat, C. T., Fong, A. M., Patterson, C. and Patel, D. D. (2008) CX3CR1 deficiency impairs dendritic cell accumulation in arterial intima and reduces atherosclerotic burden. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **28**, 243-250
- [79] Yilmaz, A., Lochno, M., Traeg, F., Cicha, I., Reiss, C., Stumpf, C., Raaz, D., Anger, T., Amann, K., Probst, T., Ludwig, J., Daniel, W. G. and Garlich, C. D. (2004) Emergence of dendritic cells in rupture-prone regions of vulnerable carotid plaques. *Atherosclerosis*. **176**, 101-110

- [80] Gautier, E. L., Huby, T., Saint-Charles, F., Ouzilleau, B., Pirault, J., Deswaerte, V., Ginhoux, F., Miller, E. R., Witztum, J. L., Chapman, M. J. and Lesnik, P. (2009) Conventional dendritic cells at the crossroads between immunity and cholesterol homeostasis in atherosclerosis. *Circulation*. **119**, 2367-2375
- [81] Kovanen, P. T., Kaartinen, M. and Paavonen, T. (1995) Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation*. **92**, 1084-1088
- [82] Lindstedt, K. A. and Kovanen, P. T. (2004) Mast cells in vulnerable coronary plaques: potential mechanisms linking mast cell activation to plaque erosion and rupture. *Current opinion in lipidology*. **15**, 567-573
- [83] Bot, I., de Jager, S. C., Zernecke, A., Lindstedt, K. A., van Berkel, T. J., Weber, C. and Biessen, E. A. (2007) Perivascular mast cells promote atherogenesis and induce plaque destabilization in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. **115**, 2516-2525
- [84] Saarinen, J., Kalkkinen, N., Welgus, H. G. and Kovanen, P. T. (1994) Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *The Journal of biological chemistry*. **269**, 18134-18140
- [85] Gruber, B. L., Marchese, M. J., Suzuki, K., Schwartz, L. B., Okada, Y., Nagase, H. and Ramamurthy, N. S. (1989) Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *The Journal of clinical investigation*. **84**, 1657-1662
- [86] Wang, Y., Shiota, N., Leskinen, M. J., Lindstedt, K. A. and Kovanen, P. T. (2001) Mast cell chymase inhibits smooth muscle cell growth and collagen expression in vitro: transforming growth factor-beta1-dependent and -independent effects. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **21**, 1928-1933
- [87] Leskinen, M. J., Kovanen, P. T. and Lindstedt, K. A. (2003) Regulation of smooth muscle cell growth, function and death in vitro by activated mast cells--a potential mechanism for the weakening and rupture of atherosclerotic plaques. *Biochemical pharmacology*. **66**, 1493-1498
- [88] van der Wal, A. C., Becker, A. E., van der Loos, C. M. and Das, P. K. (1994) Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. **89**, 36-44
- [89] Croce, K. and Libby, P. (2007) Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol*. **14**, 55-61
- [90] Newby, A. C. (2006) Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates. *Cardiovascular research*. **69**, 614-624
- [91] Newby, A. C. (2005) Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiological reviews*. **85**, 1-31
- [92] Galis, Z. S., Sukhova, G. K., Lark, M. W. and Libby, P. (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation*. **94**, 2493-2503
- [93] Filippov, S., Koenig, G. C., Chun, T. H., Hotary, K. B., Ota, I., Bugge, T. H., Roberts, J. D., Fay, W. P., Birkedal-Hansen, H., Holmbeck, K., Sabeh, F., Allen, E. D. and Weiss, S. J. (2005) MT1-matrix metalloproteinase directs arterial wall invasion and neointima formation by vascular smooth muscle cells. *The Journal of experimental medicine*. **202**, 663-671
- [94] Cheng, L., Mantile, G., Pauly, R., Nater, C., Felici, A., Monticone, R., Bilato, C., Gluzband, Y. A., Crow, M. T., Stetler-Stevenson, W. and Capogrossi, M. C. (1998) Adenovirus-mediated gene transfer of the human tissue inhibitor of metalloproteinase-2

- blocks vascular smooth muscle cell invasiveness in vitro and modulates neointimal development in vivo. *Circulation*. **98**, 2195-2201
- [95] Fulop, T., Jr., Larbi, A., Fortun, A., Robert, L. and Khalil, A. (2005) Elastin peptides induced oxidation of LDL by phagocytic cells. *Pathol Biol (Paris)*. **53**, 416-423
- [96] Faury, G. (1998) Role of the elastin-laminin receptor in the cardiovascular system. *Pathol Biol (Paris)*. **46**, 517-526
- [97] Mochizuki, S., Brassart, B. and Hinek, A. (2002) Signaling pathways transduced through the elastin receptor facilitate proliferation of arterial smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. **277**, 44854-44863
- [98] Geng, Y. J. and Libby, P. (2002) Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **22**, 1370-1380
- [99] Doran, A. C., Meller, N. and McNamara, C. A. (2008) Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **28**, 812-819
- [100] Stary, H. C., Chandler, A. B., Dinsmore, R. E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Jr., Rosenfeld, M. E., Schwartz, C. J., Wagner, W. D. and Wissler, R. W. (1995) A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. **92**, 1355-1374
- [101] Rong, J. X., Shapiro, M., Trogan, E. and Fisher, E. A. (2003) Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **100**, 13531-13536
- [102] Braun, M., Pietsch, P., Schror, K., Baumann, G. and Felix, S. B. (1999) Cellular adhesion molecules on vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*. **41**, 395-401
- [103] Cai, Q., Lanting, L. and Natarajan, R. (2004) Interaction of monocytes with vascular smooth muscle cells regulates monocyte survival and differentiation through distinct pathways. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **24**, 2263-2270
- [104] Raines, E. W. and Ferri, N. (2005) Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokines affecting endothelial and smooth muscle cells in vascular disease. *Journal of lipid research*. **46**, 1081-1092
- [105] Bauriedel, G., Hutter, R., Welsch, U., Bach, R., Sievert, H. and Luderitz, B. (1999) Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovascular research*. **41**, 480-488
- [106] Clarke, M. C., Figg, N., Maguire, J. J., Davenport, A. P., Goddard, M., Littlewood, T. D. and Bennett, M. R. (2006) Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nature medicine*. **12**, 1075-1080
- [107] Clarke, M. C., Littlewood, T. D., Figg, N., Maguire, J. J., Davenport, A. P., Goddard, M. and Bennett, M. R. (2008) Chronic apoptosis of vascular smooth muscle cells accelerates atherosclerosis and promotes calcification and medial degeneration. *Circulation research*. **102**, 1529-1538
- [108] Clarke, M. C., Talib, S., Figg, N. L. and Bennett, M. R. Vascular smooth muscle cell apoptosis induces interleukin-1-directed inflammation: effects of hyperlipidemia-mediated inhibition of phagocytosis. *Circulation research*. **106**, 363-372
- [109] Newby, A. C. (2007) Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. *Trends in cardiovascular medicine*. **17**, 253-258
- [110] Caplice, N. M., Bunch, T. J., Stalboerger, P. G., Wang, S., Simper, D., Miller, D. V., Russell, S. J., Litzow, M. R. and Edwards, W. D. (2003) Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **100**, 4754-4759
- [111] Orlandi, A. and Bennett, M. Progenitor cell-derived smooth muscle cells in vascular disease. *Biochemical pharmacology*. **79**, 1706-1713
- [112] Sata, M., Saiura, A., Kunisato, A., Tojo, A., Okada, S., Tokuhisa, T., Hirai, H., Makuuchi, M., Hirata, Y. and Nagai, R. (2002) Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nature medicine*. **8**, 403-409
- [113] Bentzon, J. F., Sondergaard, C. S., Kassem, M. and Falk, E. (2007) Smooth muscle cells healing atherosclerotic plaque disruptions are of local, not blood, origin in apolipoprotein E knockout mice. *Circulation*. **116**, 2053-2061
- [114] Baigent, C., Keech, A., Kearney, P. M., Blackwell, L., Buck, G., Pollicino, C., Kirby, A., Sourjina, T., Peto, R., Collins, R. and Simes, R. (2005) Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. **366**, 1267-1278
- [115] Barter, P. J., Brandrup-Wognsen, G., Palmer, M. K. and Nicholls, S. J. Effect of statins on HDL-C: a complex process unrelated to changes in LDL-C: analysis of the VOYAGER Database. *Journal of lipid research*. **51**, 1546-1553
- [116] Hausenloy, D. J. and Yellon, D. M. (2008) Targeting residual cardiovascular risk: raising high-density lipoprotein cholesterol levels. *Heart (British Cardiac Society)*. **94**, 706-714
- [117] Jun, M., Foote, C., Lv, J., Neal, B., Patel, A., Nicholls, S. J., Grobbee, D. E., Cass, A., Chalmers, J. and Perkovic, V. Effects of fibrates on cardiovascular outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. **375**, 1875-1884
- [118] Taylor, A. J., Lee, H. J. and Sullenberger, L. E. (2006) The effect of 24 months of combination statin and extended-release niacin on carotid intima-media thickness: ARBITER 3. *Current medical research and opinion*. **22**, 2243-2250
- [119] van der Hoorn, J. W., de Haan, W., Berbee, J. F., Havekes, L. M., Jukema, J. W., Rensen, P. C. and Princen, H. M. (2008) Niacin increases HDL by reducing hepatic expression and plasma levels of cholesteryl ester transfer protein in APOE*3Leiden.CETP mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **28**, 2016-2022
- [120] Saini, H. K., Xu, Y. J., Arneja, A. S., Tappia, P. S. and Dhalla, N. S. (2005) Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis. *Journal of cellular and molecular medicine*. **9**, 818-839
- [121] Moubayed, S. P., Heinonen, T. M. and Tardif, J. C. (2007) Anti-inflammatory drugs and atherosclerosis. *Current opinion in lipidology*. **18**, 638-644
- [122] Mach, F. (2004) Statins as immunomodulatory agents. *Circulation*. **109**, II15-17
- [123] Ridker, P. M., Cannon, C. P., Morrow, D., Rifai, N., Rose, L. M., McCabe, C. H., Pfeffer, M. A. and Braunwald, E. (2005) C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *The New England journal of medicine*. **352**, 20-28
- [124] Schramm, R., Menger, M. D., Harder, Y., Schmits, R., Adam, O., Weitz-Schmidt, G. and Schafers, H. J. (2007) Statins inhibit lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *Immunology*. **120**, 315-324
- [125] Rader, D. J. and Daugherty, A. (2008) Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature*. **451**, 904-913
- [126] Kakuta, T., Currier, J. W., Haudenschild, C. C., Ryan, T. J. and Faxon, D. P. (1994) Differences in compensatory vessel enlargement, not intimal formation, account for restenosis after angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit model. *Circulation*. **89**, 2809-2815
- [127] Costa, M. A. and Simon, D. I. (2005) Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents. *Circulation*. **111**, 2257-2273

- [128] Inoue, T. and Node, K. (2009) Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents. *Circ J.* **73**, 615-621
- [129] Touchard, A. G. and Schwartz, R. S. (2006) Preclinical restenosis models: challenges and successes. *Toxicologic pathology.* **34**, 11-18
- [130] Xu, Q. (2004) Mouse models of arteriosclerosis: from arterial injuries to vascular grafts. *The American journal of pathology.* **165**, 1-10
- [131] Hui, D. Y. (2008) Intimal hyperplasia in murine models. *Current drug targets.* **9**, 251-260
- [132] Kumar, A. and Lindner, V. (1997) Remodeling with neointima formation in the mouse carotid artery after cessation of blood flow. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* **17**, 2238-2244
- [133] Roque, M., Fallon, J. T., Badimon, J. J., Zhang, W. X., Taubman, M. B. and Reis, E. D. (2000) Mouse model of femoral artery denudation injury associated with the rapid accumulation of adhesion molecules on the luminal surface and recruitment of neutrophils. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* **20**, 335-342
- [134] Christen, T., Verin, V., Bochaton-Piallat, M., Popowski, Y., Ramaekers, F., Debruyne, P., Camenzind, E., van Eys, G. and Gabbiani, G. (2001) Mechanisms of neointima formation and remodeling in the porcine coronary artery. *Circulation.* **103**, 882-888
- [135] von der Leyen, H. E., Gibbons, G. H., Morishita, R., Lewis, N. P., Zhang, L., Nakajima, M., Kaneda, Y., Cooke, J. P. and Dzau, V. J. (1995) Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **92**, 1137-1141
- [136] Asahara, T., Bauters, C., Pastore, C., Kearney, M., Rossow, S., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J. F. and Isner, J. M. (1995) Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation.* **91**, 2793-2801
- [137] Isner, J. M. (2001) Still more debate over VEGF. *Nature medicine.* **7**, 639-641
- [138] Van Belle, E., Maillard, L., Tio, F. O. and Isner, J. M. (1997) Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation. *Biochemical and biophysical research communications.* **235**, 311-316
- [139] Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H. A., Mantovani, A. and Marme, D. (1996) Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood.* **87**, 3336-3343
- [140] Marumo, T., Schini-Kerth, V. B. and Busse, R. (1999) Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes.* **48**, 1131-1137
- [141] Celletti, F. L., Waugh, J. M., Amabile, P. G., Brendolan, A., Hilfiker, P. R. and Dake, M. D. (2001) Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nature medicine.* **7**, 425-429
- [142] Shibata, M., Suzuki, H., Nakatani, M., Koba, S., Geshi, E., Katagiri, T. and Takeyama, Y. (2001) The involvement of vascular endothelial growth factor and flt-1 in the process of neointimal proliferation in pig coronary arteries following stent implantation. *Histochemistry and cell biology.* **116**, 471-481
- [143] Ohtani, K., Egashira, K., Hiasa, K., Zhao, Q., Kitamoto, S., Ishibashi, M., Usui, M., Inoue, S., Yonemitsu, Y., Sueishi, K., Sata, M., Shibuya, M. and Sunagawa, K. (2004) Blockade of vascular endothelial growth factor suppresses experimental restenosis after intraluminal injury by inhibiting recruitment of monocyte lineage cells. *Circulation.* **110**, 2444-2452

- [144] Khurana, R., Zhuang, Z., Bhardwaj, S., Murakami, M., De Muinck, E., Yla-Herttuala, S., Ferrara, N., Martin, J. F., Zachary, I. and Simons, M. (2004) Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia. *Circulation*. **110**, 2436-2443
- [145] Walter, D. H., Rittig, K., Bahlmann, F. H., Kirchmair, R., Silver, M., Murayama, T., Nishimura, H., Losordo, D. W., Asahara, T. and Isner, J. M. (2002) Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation*. **105**, 3017-3024
- [146] Werner, N., Junk, S., Laufs, U., Link, A., Walenta, K., Bohm, M. and Nickenig, G. (2003) Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circulation research*. **93**, e17-24
- [147] Tuleta, I., Skowasch, D., Peuster, M., Nickenig, G. and Bauriedel, G. (2008) Cells of primarily extravascular origin in neointima formation following stent implantation: coordinated expression of endothelial progenitor, dendritic and neural crest-derived cells. *Cardiology*. **110**, 199-205
- [148] Inoue, T., Sata, M., Hikichi, Y., Sohma, R., Fukuda, D., Uchida, T., Shimizu, M., Komoda, H. and Node, K. (2007) Mobilization of CD34-positive bone marrow-derived cells after coronary stent implantation: impact on restenosis. *Circulation*. **115**, 553-561
- [149] Welt, F. G. and Rogers, C. (2002) Inflammation and restenosis in the stent era. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **22**, 1769-1776
- [150] Fukuda, D., Shimada, K., Tanaka, A., Kawarabayashi, T., Yoshiyama, M. and Yoshikawa, J. (2004) Circulating monocytes and in-stent neointima after coronary stent implantation. *Journal of the American College of Cardiology*. **43**, 18-23
- [151] Hayashi, S., Watanabe, N., Nakazawa, K., Suzuki, J., Tsushima, K., Tamatani, T., Sakamoto, S. and Isobe, M. (2000) Roles of P-selectin in inflammation, neointimal formation, and vascular remodeling in balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation*. **102**, 1710-1717
- [152] Bienvenu, J. G., Tanguay, J. F., Theoret, J. F., Kumar, A., Schaub, R. G. and Merhi, Y. (2001) Recombinant soluble p-selectin glycoprotein ligand-1-Ig reduces restenosis through inhibition of platelet-neutrophil adhesion after double angioplasty in swine. *Circulation*. **103**, 1128-1134
- [153] Simon, D. I., Chen, Z., Xu, H., Li, C. Q., Dong, J., McIntire, L. V., Ballantyne, C. M., Zhang, L., Furman, M. I., Berndt, M. C. and Lopez, J. A. (2000) Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *The Journal of experimental medicine*. **192**, 193-204
- [154] Simon, D. I., Dhen, Z., Seifert, P., Edelman, E. R., Ballantyne, C. M. and Rogers, C. (2000) Decreased neointimal formation in Mac-1(-/-) mice reveals a role for inflammation in vascular repair after angioplasty. *The Journal of clinical investigation*. **105**, 293-300
- [155] Rogers, C., Edelman, E. R. and Simon, D. I. (1998) A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **95**, 10134-10139
- [156] Inoue, T., Uchida, T., Yaguchi, I., Sakai, Y., Takayanagi, K. and Morooka, S. (2003) Stent-induced expression and activation of the leukocyte integrin Mac-1 is associated with neointimal thickening and restenosis. *Circulation*. **107**, 1757-1763
- [157] Furukawa, Y., Matsumori, A., Ohashi, N., Shioi, T., Ono, K., Harada, A., Matsushima, K. and Sasayama, S. (1999) Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemoattractant and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circulation research*. **84**, 306-314
- [158] Cipollone, F., Marini, M., Fazio, M., Pini, B., Iezzi, A., Reale, M., Paloscia, L., Materazzo, G., D'Annunzio, E., Conti, P., Chiarelli, F., Cuccurullo, F. and Mezzetti, A. (2001) Elevated circulating levels of monocyte chemoattractant protein-1 in patients with

- restenosis after coronary angioplasty. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **21**, 327-334
- [159] Oshima, S., Ogawa, H., Hokimoto, S., Nakamura, S., Noda, K., Saito, T., Soejima, H., Takazoe, K., Ishibashi, F. and Yasue, H. (2001) Plasma monocyte chemoattractant protein-1 antigen levels and the risk of restenosis after coronary stent implantation. *Japanese circulation journal*. **65**, 261-264
- [160] Hokimoto, S., Oike, Y., Saito, T., Kitaoka, M., Oshima, S., Noda, K., Moriyama, Y., Ishibashi, F. and Ogawa, H. (2002) Increased expression of monocyte chemoattractant protein-1 in atherectomy specimens from patients with restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circ J*. **66**, 114-116
- [161] Horvath, C., Welt, F. G., Nedelman, M., Rao, P. and Rogers, C. (2002) Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates: inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted. *Circulation research*. **90**, 488-494
- [162] Roque, M., Kim, W. J., Gazdoin, M., Malik, A., Reis, E. D., Fallon, J. T., Badimon, J. J., Charo, I. F. and Taubman, M. B. (2002) CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **22**, 554-559
- [163] Mori, E., Komori, K., Yamaoka, T., Tanii, M., Kataoka, C., Takeshita, A., Usui, M., Egashira, K. and Sugimachi, K. (2002) Essential role of monocyte chemoattractant protein-1 in development of restenotic changes (neointimal hyperplasia and constrictive remodeling) after balloon angioplasty in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*. **105**, 2905-2910
- [164] Egashira, K., Zhao, Q., Kataoka, C., Ohtani, K., Usui, M., Charo, I. F., Nishida, K., Inoue, S., Katoh, M., Ichiki, T. and Takeshita, A. (2002) Importance of monocyte chemoattractant protein-1 pathway in neointimal hyperplasia after periarterial injury in mice and monkeys. *Circulation research*. **90**, 1167-1172
- [165] Schober, A., Zerneck, A., Liehn, E. A., von Hundelshausen, P., Knarren, S., Kuziel, W. A. and Weber, C. (2004) Crucial role of the CCL2/CCR2 axis in neointimal hyperplasia after arterial injury in hyperlipidemic mice involves early monocyte recruitment and CCL2 presentation on platelets. *Circulation research*. **95**, 1125-1133
- [166] Egashira, K., Nakano, K., Ohtani, K., Funakoshi, K., Zhao, G., Ihara, Y., Koga, J., Kimura, S., Tominaga, R. and Sunagawa, K. (2007) Local delivery of anti-monocyte chemoattractant protein-1 by gene-eluting stents attenuates in-stent stenosis in rabbits and monkeys. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **27**, 2563-2568
- [167] Zhu, B., Reardon, C. A., Getz, G. S. and Hui, D. Y. (2002) Both apolipoprotein E and immune deficiency exacerbate neointimal hyperplasia after vascular injury in mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **22**, 450-455
- [168] Dimayuga, P., Cercek, B., Oguchi, S., Fredrikson, G. N., Yano, J., Shah, P. K., Jovinge, S. and Nilsson, J. (2002) Inhibitory effect on arterial injury-induced neointimal formation by adoptive B-cell transfer in Rag-1 knockout mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **22**, 644-649
- [169] Dimayuga, P. C., Li, H., Chyu, K. Y., Fredrikson, G. N., Nilsson, J., Fishbein, M. C., Shah, P. K. and Cercek, B. (2005) T cell modulation of intimal thickening after vascular injury: the bimodal role of IFN-gamma in immune deficiency. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **25**, 2528-2534
- [170] Boehm, M., Olive, M., True, A. L., Crook, M. F., San, H., Qu, X. and Nabel, E. G. (2004) Bone marrow-derived immune cells regulate vascular disease through a p27(Kip1)-dependent mechanism. *The Journal of clinical investigation*. **114**, 419-426
- [171] Neumann, F. J., Ott, I., Gawaz, M., Puchner, G. and Schomig, A. (1996) Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *Journal of the American College of Cardiology*. **27**, 819-824

- [172] Inoue, T., Sakai, Y., Hoshi, K., Yaguchi, I., Fujito, T. and Morooka, S. (1998) Lower expression of neutrophil adhesion molecule indicates less vessel wall injury and might explain lower restenosis rate after cutting balloon angioplasty. *Circulation*. **97**, 2511-2518
- [173] Welt, F. G., Edelman, E. R., Simon, D. I. and Rogers, C. (2000) Neutrophil, not macrophage, infiltration precedes neointimal thickening in balloon-injured arteries. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **20**, 2553-2558
- [174] Inoue, T., Kato, T., Hikichi, Y., Hashimoto, S., Hirase, T., Morooka, T., Imoto, Y., Takeda, Y., Sendo, F. and Node, K. (2006) Stent-induced neutrophil activation is associated with an oxidative burst in the inflammatory process, leading to neointimal thickening. *Thrombosis and haemostasis*. **95**, 43-48
- [175] Chen, Z., Keaney, J. F., Jr., Schulz, E., Levison, B., Shan, L., Sakuma, M., Zhang, X., Shi, C., Hazen, S. L. and Simon, D. I. (2004) Decreased neointimal formation in Nox2-deficient mice reveals a direct role for NADPH oxidase in the response to arterial injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**, 13014-13019
- [176] Inoue, T., Sohma, R., Miyazaki, T., Iwasaki, Y., Yaguchi, I. and Morooka, S. (2000) Comparison of activation process of platelets and neutrophils after coronary stent implantation versus balloon angioplasty for stable angina pectoris. *The American journal of cardiology*. **86**, 1057-1062
- [177] Welt, F. G., Tso, C., Edelman, E. R., Kjelsberg, M. A., Paolini, J. F., Seifert, P. and Rogers, C. (2003) Leukocyte recruitment and expression of chemokines following different forms of vascular injury. *Vascular medicine (London, England)*. **8**, 1-7
- [178] Kenagy, R. D., Hart, C. E., Stetler-Stevenson, W. G. and Clowes, A. W. (1997) Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation*. **96**, 3555-3560
- [179] Ferns, G. A., Raines, E. W., Sprugel, K. H., Motani, A. S., Reidy, M. A. and Ross, R. (1991) Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science (New York, N.Y.)*. **253**, 1129-1132
- [180] Jawien, A., Bowen-Pope, D. F., Lindner, V., Schwartz, S. M. and Clowes, A. W. (1992) Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty. *The Journal of clinical investigation*. **89**, 507-511
- [181] Owens, G. K., Kumar, M. S. and Wamhoff, B. R. (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological reviews*. **84**, 767-801
- [182] Lindner, V., Lappi, D. A., Baird, A., Majack, R. A. and Reidy, M. A. (1991) Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circulation research*. **68**, 106-113
- [183] Rutherford, C., Martin, W., Salame, M., Carrier, M., Anggard, E. and Ferns, G. (1997) Substantial inhibition of neo-intimal response to balloon injury in the rat carotid artery using a combination of antibodies to platelet-derived growth factor-BB and basic fibroblast growth factor. *Atherosclerosis*. **130**, 45-51
- [184] Spinetti, G., Wang, M., Monticone, R., Zhang, J., Zhao, D. and Lakatta, E. G. (2004) Rat aortic MCP-1 and its receptor CCR2 increase with age and alter vascular smooth muscle cell function. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **24**, 1397-1402
- [185] Ikeda, U., Okada, K., Ishikawa, S., Saito, T., Kasahara, T. and Shimada, K. (1995) Monocyte chemoattractant protein 1 inhibits growth of rat vascular smooth muscle cells. *The American journal of physiology*. **268**, H1021-1026

- [186] Porreca, E., Di Febbo, C., Reale, M., Castellani, M. L., Baccante, G., Barbacane, R., Conti, P., Cuccurullo, F. and Poggi, A. (1997) Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) is a mitogen for cultured rat vascular smooth muscle cells. *Journal of vascular research*. **34**, 58-65
- [187] Parenti, A., Bellik, L., Brogelli, L., Filippi, S. and Ledda, F. (2004) Endogenous VEGF-A is responsible for mitogenic effects of MCP-1 on vascular smooth muscle cells. *American journal of physiology*. **286**, H1978-1984
- [188] Lo, I. C., Shih, J. M. and Jiang, M. J. (2005) Reactive oxygen species and ERK 1/2 mediate monocyte chemotactic protein-1-stimulated smooth muscle cell migration. *Journal of biomedical science*. **12**, 377-388
- [189] Selzman, C. H., Miller, S. A., Zimmerman, M. A., Gamboni-Robertson, F., Harken, A. H. and Banerjee, A. (2002) Monocyte chemotactic protein-1 directly induces human vascular smooth muscle proliferation. *American journal of physiology*. **283**, H1455-1461
- [190] Viedt, C., Vogel, J., Athanasiou, T., Shen, W., Orth, S. R., Kubler, W. and Kreuzer, J. (2002) Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **22**, 914-920
- [191] Poon, M., Hsu, W. C., Bogdanov, V. Y. and Taubman, M. B. (1996) Secretion of monocyte chemotactic activity by cultured rat aortic smooth muscle cells in response to PDGF is due predominantly to the induction of JE/MCP-1. *The American journal of pathology*. **149**, 307-317
- [192] Taubman, M. B., Rollins, B. J., Poon, M., Marmur, J., Green, R. S., Berk, B. C. and Nadal-Ginard, B. (1992) JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. **70**, 314-325
- [193] Liu, B., Poon, M. and Taubman, M. B. (2006) PDGF-BB enhances monocyte chemoattractant protein-1 mRNA stability in smooth muscle cells by downregulating ribonuclease activity. *J Mol Cell Cardiol*. **41**, 160-169
- [194] Hayes, I. M., Jordan, N. J., Towers, S., Smith, G., Paterson, J. R., Earnshaw, J. J., Roach, A. G., Westwick, J. and Williams, R. J. (1998) Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **18**, 397-403
- [195] Schecter, A. D., Berman, A. B., Yi, L., Ma, H., Daly, C. M., Soejima, K., Rollins, B. J., Charo, I. F. and Taubman, M. B. (2004) MCP-1-dependent signaling in CCR2(-/-) aortic smooth muscle cells. *Journal of leukocyte biology*. **75**, 1079-1085
- [196] Schecter, A. D., Rollins, B. J., Zhang, Y. J., Charo, I. F., Fallon, J. T., Rossikhina, M., Giesen, P. L., Nemerson, Y. and Taubman, M. B. (1997) Tissue factor is induced by monocyte chemoattractant protein-1 in human aortic smooth muscle and THP-1 cells. *The Journal of biological chemistry*. **272**, 28568-28573
- [197] Walsh, K., Smith, R. C. and Kim, H. S. (2000) Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circulation research*. **87**, 184-188
- [198] Beohar, N., Flaherty, J. D., Davidson, C. J., Maynard, R. C., Robbins, J. D., Shah, A. P., Choi, J. W., MacDonald, L. A., Jorgensen, J. P., Pinto, J. V., Chandra, S., Klaus, H. M., Wang, N. C., Harris, K. R., Decker, R. and Bonow, R. O. (2004) Antirestenotic effects of a locally delivered caspase inhibitor in a balloon injury model. *Circulation*. **109**, 108-113
- [199] Schober, A. (2008) Chemokines in vascular dysfunction and remodeling. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **28**, 1950-1959
- [200] Schober, A., Knarren, S., Lietz, M., Lin, E. A. and Weber, C. (2003) Crucial role of stromal cell-derived factor-1alpha in neointima formation after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. **108**, 2491-2497

- [201] Zerneck, A., Schober, A., Bot, I., von Hundelshausen, P., Liehn, E. A., Mopps, B., Mericskay, M., Gierschik, P., Biessen, E. A. and Weber, C. (2005) SDF-1 α /CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells. *Circulation research*. **96**, 784-791
- [202] Delafontaine, P. (1998) Growth factors and vascular smooth muscle cell growth responses. *European heart journal*. **19 Suppl G**, G18-22
- [203] Eto, H., Biro, S., Miyata, M., Kaieda, H., Obata, H., Kihara, T., Orihara, K. and Tei, C. (2003) Angiotensin II type 1 receptor participates in extracellular matrix production in the late stage of remodeling after vascular injury. *Cardiovascular research*. **59**, 200-211
- [204] Cho, A., Graves, J. and Reidy, M. A. (2000) Mitogen-activated protein kinases mediate matrix metalloproteinase-9 expression in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **20**, 2527-2532
- [205] Galis, Z. S., Johnson, C., Godin, D., Magid, R., Shipley, J. M., Senior, R. M. and Ivan, E. (2002) Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circulation research*. **91**, 852-859
- [206] Eisenberg, M. J. and Konnyu, K. J. (2006) Review of randomized clinical trials of drug-eluting stents for the prevention of in-stent restenosis. *The American journal of cardiology*. **98**, 375-382
- [207] Morice, M. C., Serruys, P. W., Sousa, J. E., Fajadet, J., Ban Hayashi, E., Perin, M., Colombo, A., Schuler, G., Barragan, P., Guagliumi, G., Molnar, F. and Falotico, R. (2002) A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *The New England journal of medicine*. **346**, 1773-1780
- [208] Stone, G. W., Moses, J. W., Ellis, S. G., Schofer, J., Dawkins, K. D., Morice, M. C., Colombo, A., Schampaert, E., Grube, E., Kirtane, A. J., Cutlip, D. E., Fahy, M., Pocock, S. J., Mehran, R. and Leon, M. B. (2007) Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *The New England journal of medicine*. **356**, 998-1008
- [209] Stettler, C., Wandel, S., Allemann, S., Kastrati, A., Morice, M. C., Schomig, A., Pfisterer, M. E., Stone, G. W., Leon, M. B., de Lezo, J. S., Goy, J. J., Park, S. J., Sabate, M., Suttorp, M. J., Kelbaek, H., Spaulding, C., Menichelli, M., Vermeersch, P., Dirksen, M. T., Cervinka, P., Petronio, A. S., Nordmann, A. J., Diem, P., Meier, B., Zwahlen, M., Reichenbach, S., Trelle, S., Windecker, S. and Juni, P. (2007) Outcomes associated with drug-eluting and bare-metal stents: a collaborative network meta-analysis. *Lancet*. **370**, 937-948
- [210] Windecker, S. and Meier, B. (2007) Late coronary stent thrombosis. *Circulation*. **116**, 1952-1965
- [211] Bavry, A. A., Kumbhani, D. J., Helton, T. J., Borek, P. P., Mood, G. R. and Bhatt, D. L. (2006) Late thrombosis of drug-eluting stents: a meta-analysis of randomized clinical trials. *The American journal of medicine*. **119**, 1056-1061
- [212] Finn, A. V., Nakazawa, G., Joner, M., Kolodgie, F. D., Mont, E. K., Gold, H. K. and Virmani, R. (2007) Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **27**, 1500-1510
- [213] Luscher, T. F., Steffel, J., Eberli, F. R., Joner, M., Nakazawa, G., Tanner, F. C. and Virmani, R. (2007) Drug-eluting stent and coronary thrombosis: biological mechanisms and clinical implications. *Circulation*. **115**, 1051-1058
- [214] Pendyala, L., Jabara, R., Robinson, K. and Chronos, N. (2009) Passive and active polymer coatings for intracoronary stents: novel devices to promote arterial healing. *Journal of interventional cardiology*. **22**, 37-48
- [215] Aoki, J., Serruys, P. W., van Beusekom, H., Ong, A. T., McFadden, E. P., Sianos, G., van der Giessen, W. J., Regar, E., de Feyter, P. J., Davis, H. R., Rowland, S. and Kutryk, M. J. (2005) Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the

- HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *Journal of the American College of Cardiology*. **45**, 1574-1579
- [216] Blindt, R., Vogt, F., Astafieva, I., Fach, C., Hristov, M., Krott, N., Seitz, B., Kapurniotu, A., Kwok, C., Dewor, M., Bosserhoff, A. K., Bernhagen, J., Hanrath, P., Hoffmann, R. and Weber, C. (2006) A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *Journal of the American College of Cardiology*. **47**, 1786-1795
- [217] de Scheerder, I., Wang, K., Wilczek, K., van Dorpe, J., Verbeken, E., Desmet, W., Schacht, E. and Piessens, J. (1996) Local methylprednisolone inhibition of foreign body response to coated intracoronary stents. *Coron Artery Dis*. **7**, 161-166
- [218] Versaci, F., Gaspardone, A., Tomai, F., Ribichini, F., Russo, P., Proietti, I., Ghini, A. S., Ferrero, V., Chiariello, L., Gioffre, P. A., Romeo, F. and Crea, F. (2002) Immunosuppressive Therapy for the Prevention of Restenosis after Coronary Artery Stent Implantation (IMPRESS Study). *Journal of the American College of Cardiology*. **40**, 1935-1942
- [219] Ferrero, V., Ribichini, F., Pesarini, G., Brunelleschi, S. and Vassanelli, C. (2007) Glucocorticoids in the prevention of restenosis after coronary angioplasty: therapeutic potential. *Drugs*. **67**, 1243-1255
- [220] van der Hoeven, B. L., Pires, N. M., Warda, H. M., Putter, H., Quax, P. H., Schaliij, M. J. and Jukema, J. W. (2008) Dexamethasone-eluting stents for the prevention of in-stent restenosis: evidence for a differential effect in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetic patients. *International journal of cardiology*. **124**, 166-171
- [221] Suzuki, T., Kopia, G., Hayashi, S., Bailey, L. R., Llanos, G., Wilensky, R., Klugherz, B. D., Papandreou, G., Narayan, P., Leon, M. B., Yeung, A. C., Tio, F., Tsao, P. S., Falotico, R. and Carter, A. J. (2001) Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation*. **104**, 1188-1193
- [222] Kim, J. Y., Ko, Y. G., Shim, C. Y., Park, S., Hwang, K. C., Choi, D., Jang, Y., Chung, N., Shim, W. H. and Cho, S. Y. (2005) Comparison of effects of drug-eluting stents versus bare metal stents on plasma C-reactive protein levels. *The American journal of cardiology*. **96**, 1384-1388
- [223] Sugimoto, Y., Whitman, M., Cantley, L. C. and Erikson, R. L. (1984) Evidence that the Rous sarcoma virus transforming gene product phosphorylates phosphatidylinositol and diacylglycerol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **81**, 2117-2121
- [224] Macara, I. G., Marinetti, G. V. and Balduzzi, P. C. (1984) Transforming protein of avian sarcoma virus UR2 is associated with phosphatidylinositol kinase activity: possible role in tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **81**, 2728-2732
- [225] Whitman, M., Kaplan, D. R., Schaffhausen, B., Cantley, L. and Roberts, T. M. (1985) Association of phosphatidylinositol kinase activity with polyoma middle-T competent for transformation. *Nature*. **315**, 239-242
- [226] Wymann, M. P. and Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochimica et biophysica acta*. **1436**, 127-150
- [227] Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J. and Waterfield, M. D. (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annual review of biochemistry*. **70**, 535-602
- [228] Whitman, M., Downes, C. P., Keeler, M., Keller, T. and Cantley, L. (1988) Type I phosphatidylinositol kinase makes a novel inositol phospholipid, phosphatidylinositol-3-phosphate. *Nature*. **332**, 644-646

- [229] Wymann, M. P., Zvelebil, M. and Laffargue, M. (2003) Phosphoinositide 3-kinase signalling--which way to target? *Trends in pharmacological sciences*. **24**, 366-376
- [230] Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K. and Stephens, L. R. (2006) Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochemical Society transactions*. **34**, 647-662
- [231] Suire, S., Coadwell, J., Ferguson, G. J., Davidson, K., Hawkins, P. and Stephens, L. (2005) p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr Biol*. **15**, 566-570
- [232] Voigt, P., Dorner, M. B. and Schaefer, M. (2006) Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *The Journal of biological chemistry*. **281**, 9977-9986
- [233] Falasca, M. and Maffucci, T. (2007) Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochemical Society transactions*. **35**, 211-214
- [234] Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D. and Emr, S. D. (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science (New York, N.Y.)*. **260**, 88-91
- [235] Murray, J. T., Panaretou, C., Stenmark, H., Miaczynska, M. and Backer, J. M. (2002) Role of Rab5 in the recruitment of hVps34/p150 to the early endosome. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. **3**, 416-427
- [236] Stephens, L. R., Jackson, T. R. and Hawkins, P. T. (1993) Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochimica et biophysica acta*. **1179**, 27-75
- [237] Yart, A., Laffargue, M., Mayeux, P., Chretien, S., Peres, C., Tonks, N., Roche, S., Payrastra, B., Chap, H. and Raynal, P. (2001) A critical role for phosphoinositide 3-kinase upstream of Gab1 and SHP2 in the activation of ras and mitogen-activated protein kinases by epidermal growth factor. *The Journal of biological chemistry*. **276**, 8856-8864
- [238] Kazlauskas, A. and Cooper, J. A. (1990) Phosphorylation of the PDGF receptor beta subunit creates a tight binding site for phosphatidylinositol 3 kinase. *The EMBO journal*. **9**, 3279-3286
- [239] Kanda, S., Hodgkin, M. N., Woodfield, R. J., Wakelam, M. J., Thomas, G. and Claesson-Welsh, L. (1997) Phosphatidylinositol 3'-kinase-independent p70 S6 kinase activation by fibroblast growth factor receptor-1 is important for proliferation but not differentiation of endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. **272**, 23347-23353
- [240] Campbell, G. S. (1997) Growth-hormone signal transduction. *The Journal of pediatrics*. **131**, S42-44
- [241] Argetsinger, L. S., Hsu, G. W., Myers, M. G., Jr., Billestrup, N., White, M. F. and Carter-Su, C. (1995) Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *The Journal of biological chemistry*. **270**, 14685-14692
- [242] Yamamoto, K., Altschuler, D., Wood, E., Horlick, K., Jacobs, S. and Lapetina, E. G. (1992) Association of phosphorylated insulin-like growth factor-I receptor with the SH2 domains of phosphatidylinositol 3-kinase p85. *The Journal of biological chemistry*. **267**, 11337-11343
- [243] Backer, J. M., Myers, M. G., Jr., Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X. J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., Schlessinger, J. and et al. (1992) Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *The EMBO journal*. **11**, 3469-3479
- [244] Chen, K., Iribarren, P., Gong, W. and Wang, J. M. (2005) The essential role of phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) in regulating pro-inflammatory responses and the progression of cancer. *Cellular & molecular immunology*. **2**, 241-252

- [245] Fruman, D. A. (2004) Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Current opinion in immunology*. **16**, 314-320
- [246] Kurosu, H., Maehama, T., Okada, T., Yamamoto, T., Hoshino, S., Fukui, Y., Ui, M., Hazeki, O. and Katada, T. (1997) Heterodimeric phosphoinositide 3-kinase consisting of p85 and p110beta is synergistically activated by the betagamma subunits of G proteins and phosphotyrosyl peptide. *The Journal of biological chemistry*. **272**, 24252-24256
- [247] Guillermet-Guibert, J., Bjorklof, K., Salpekar, A., Gonella, C., Ramadani, F., Bilancio, A., Meek, S., Smith, A. J., Okkenhaug, K. and Vanhaesebroeck, B. (2008) The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**, 8292-8297
- [248] Jia, S., Liu, Z., Zhang, S., Liu, P., Zhang, L., Lee, S. H., Zhang, J., Signoretti, S., Loda, M., Roberts, T. M. and Zhao, J. J. (2008) Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature*. **454**, 776-779
- [249] Ciruolo, E., Iezzi, M., Marone, R., Marengo, S., Curcio, C., Costa, C., Azzolino, O., Gonella, C., Rubinetto, C., Wu, H., Dastru, W., Martin, E. L., Silengo, L., Altruda, F., Turco, E., Lanzetti, L., Musiani, P., Ruckle, T., Rommel, C., Backer, J. M., Forni, G., Wymann, M. P. and Hirsch, E. (2008) Phosphoinositide 3-kinase p110beta activity: key role in metabolism and mammary gland cancer but not development. *Science signaling*. **1**, ra3
- [250] Voisin, L., Foisy, S., Giasson, E., Lambert, C., Moreau, P. and Meloche, S. (2002) EGF receptor transactivation is obligatory for protein synthesis stimulation by G protein-coupled receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. **283**, C446-455
- [251] Linseman, D. A., Benjamin, C. W. and Jones, D. A. (1995) Convergence of angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. **270**, 12563-12568
- [252] Rao, G. N., Delafontaine, P. and Runge, M. S. (1995) Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*. **270**, 27871-27875
- [253] Tanimoto, T., Lungu, A. O. and Berk, B. C. (2004) Sphingosine 1-phosphate transactivates the platelet-derived growth factor beta receptor and epidermal growth factor receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. **94**, 1050-1058
- [254] Kalmes, A., Daum, G. and Clowes, A. W. (2001) EGFR transactivation in the regulation of SMC function. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **947**, 42-54; discussion 54-45
- [255] Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., Nurnberg, B. and et al. (1995) Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science (New York, N.Y.)*. **269**, 690-693
- [256] Bohnacker, T., Marone, R., Collmann, E., Calvez, R., Hirsch, E. and Wymann, M. P. (2009) PI3Kgamma adaptor subunits define coupling to degranulation and cell motility by distinct PtdIns(3,4,5)P3 pools in mast cells. *Science signaling*. **2**, ra27
- [257] Suire, S., Condliffe, A. M., Ferguson, G. J., Ellson, C. D., Guillou, H., Davidson, K., Welch, H., Coadwell, J., Turner, M., Chilvers, E. R., Hawkins, P. T. and Stephens, L. (2006) Gbetagammias and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. *Nature cell biology*. **8**, 1303-1309
- [258] Kurig, B., Shymanets, A., Bohnacker, T., Prajwal, Brock, C., Ahmadian, M. R., Schaefer, M., Gohla, A., Harteneck, C., Wymann, M. P., Jeanclos, E. and Nurnberg, B. (2009) Ras is an indispensable coregulator of the class IB phosphoinositide 3-kinase

- p87/p110gamma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **106**, 20312-20317
- [259] Pacold, M. E., Suire, S., Perisic, O., Lara-Gonzalez, S., Davis, C. T., Walker, E. H., Hawkins, P. T., Stephens, L., Eccleston, J. F. and Williams, R. L. (2000) Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell*. **103**, 931-943
- [260] Suire, S., Hawkins, P. and Stephens, L. (2002) Activation of phosphoinositide 3-kinase gamma by Ras. *Curr Biol*. **12**, 1068-1075
- [261] Itoh, T. and Takenawa, T. (2002) Phosphoinositide-binding domains: Functional units for temporal and spatial regulation of intracellular signalling. *Cellular signalling*. **14**, 733-743
- [262] Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B. and Wymann, M. P. (2008) Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochimica et biophysica acta*. **1784**, 159-185
- [263] Stocker, H., Andjelkovic, M., Oldham, S., Laffargue, M., Wymann, M. P., Hemmings, B. A. and Hafen, E. (2002) Living with lethal PIP3 levels: viability of flies lacking PTEN restored by a PH domain mutation in Akt/PKB. *Science (New York, N.Y.)*. **295**, 2088-2091
- [264] Manning, B. D. and Cantley, L. C. (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*. **129**, 1261-1274
- [265] Bondeva, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R. and Wymann, M. P. (1998) Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science (New York, N.Y.)*. **282**, 293-296
- [266] Lehmann, K., Muller, J. P., Schlott, B., Skroblin, P., Barz, D., Norgauer, J. and Wetzker, R. (2009) PI3Kgamma controls oxidative bursts in neutrophils via interactions with PKCalpha and p47phox. *The Biochemical journal*. **419**, 603-610
- [267] Naga Prasad, S. V., Jayatilleke, A., Madamanchi, A. and Rockman, H. A. (2005) Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nature cell biology*. **7**, 785-796
- [268] Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B. and Foukas, L. C. (2005) Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends in biochemical sciences*. **30**, 194-204
- [269] Bi, L., Okabe, I., Bernard, D. J., Wynshaw-Boris, A. and Nussbaum, R. L. (1999) Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry*. **274**, 10963-10968
- [270] Bi, L., Okabe, I., Bernard, D. J. and Nussbaum, R. L. (2002) Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm Genome*. **13**, 169-172
- [271] Foukas, L. C., Claret, M., Pearce, W., Okkenhaug, K., Meek, S., Peskett, E., Sancho, S., Smith, A. J., Withers, D. J. and Vanhaesebroeck, B. (2006) Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature*. **441**, 366-370
- [272] Hirsch, E., Katanaev, V. L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F. and Wymann, M. P. (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science (New York, N.Y.)*. **287**, 1049-1053
- [273] Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R. G., Oliveira-dos-Santos, A. J., Stanford, W. L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I., Joza, N., Mak, T. W., Ohashi, P. S., Suzuki, A. and Penninger, J. M. (2000) Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science (New York, N.Y.)*. **287**, 1040-1046

- [274] Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A. V. and Wu, D. (2000) Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* (New York, N.Y. **287**, 1046-1049
- [275] Okkenhaug, K., Bilancio, A., Farjot, G., Priddle, H., Sancho, S., Peskett, E., Pearce, W., Meek, S. E., Salpekar, A., Waterfield, M. D., Smith, A. J. and Vanhaesebroeck, B. (2002) Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110delta PI 3-kinase mutant mice. *Science* (New York, N.Y. **297**, 1031-1034
- [276] Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S. D., Silengo, L., Altruda, F., Wetzker, R., Wymann, M. P., Lembo, G. and Hirsch, E. (2004) PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. **118**, 375-387
- [277] Ghigo, A., Damilano, F., Braccini, L. and Hirsch, E. PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. *Bioessays*. **32**, 185-196
- [278] Oudit, G. Y. and Penninger, J. M. (2009) Cardiac regulation by phosphoinositide 3-kinases and PTEN. *Cardiovascular research*. **82**, 250-260
- [279] Oudit, G. Y., Crackower, M. A., Eriksson, U., Sarao, R., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Gidrewicz, D., Rybin, V. O., Wada, T., Steinberg, S. F., Backx, P. H. and Penninger, J. M. (2003) Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure. *Circulation*. **108**, 2147-2152
- [280] Crackower, M. A., Oudit, G. Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J., Sah, R., Cheng, H. Y., Rybin, V. O., Lembo, G., Fratta, L., Oliveira-dos-Santos, A. J., Benovic, J. L., Kahn, C. R., Izumo, S., Steinberg, S. F., Wymann, M. P., Backx, P. H. and Penninger, J. M. (2002) Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*. **110**, 737-749
- [281] Kerfant, B. G., Zhao, D., Lorenzen-Schmidt, I., Wilson, L. S., Cai, S., Chen, S. R., Maurice, D. H. and Backx, P. H. (2007) PI3Kgamma is required for PDE4, not PDE3, activity in subcellular microdomains containing the sarcoplasmic reticular calcium ATPase in cardiomyocytes. *Circulation research*. **101**, 400-408
- [282] Oudit, G. Y. and Kassiri, Z. (2007) Role of PI3 kinase gamma in excitation-contraction coupling and heart disease. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*. **7**, 295-304
- [283] Damilano, F., Perino, A. and Hirsch, E. PI3K kinase and scaffold functions in heart. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **1188**, 39-45
- [284] Iaccarino, G., Tomhave, E. D., Lefkowitz, R. J. and Koch, W. J. (1998) Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade. *Circulation*. **98**, 1783-1789
- [285] Naga Prasad, S. V., Barak, L. S., Rapacciuolo, A., Caron, M. G. and Rockman, H. A. (2001) Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *The Journal of biological chemistry*. **276**, 18953-18959
- [286] Nienaber, J. J., Tachibana, H., Naga Prasad, S. V., Esposito, G., Wu, D., Mao, L. and Rockman, H. A. (2003) Inhibition of receptor-localized PI3K preserves cardiac beta-adrenergic receptor function and ameliorates pressure overload heart failure. *The Journal of clinical investigation*. **112**, 1067-1079
- [287] Doukas, J., Wrasidlo, W., Noronha, G., Dneprovskaja, E., Fine, R., Weis, S., Hood, J., Demaria, A., Soll, R. and Cheresch, D. (2006) Phosphoinositide 3-kinase gamma/delta inhibition limits infarct size after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**, 19866-19871

- [288] Haubner, B. J., Neely, G. G., Voelkl, J. G., Damilano, F., Kuba, K., Imai, Y., Komnenovic, V., Mayr, A., Pachinger, O., Hirsch, E., Penninger, J. M. and Metzler, B. PI3Kgamma protects from myocardial ischemia and reperfusion injury through a kinase-independent pathway. *PloS one*. **5**, e9350
- [289] Vanhaesebroeck, B., Jones, G. E., Allen, W. E., Zicha, D., Hooshmand-Rad, R., Sawyer, C., Wells, C., Waterfield, M. D. and Ridley, A. J. (1999) Distinct PI(3)Ks mediate mitogenic signalling and cell migration in macrophages. *Nature cell biology*. **1**, 69-71
- [290] Ferrandi, C., Ardisson, V., Ferro, P., Ruckle, T., Zaratin, P., Ammannati, E., Hauben, E., Rommel, C. and Cirillo, R. (2007) Phosphoinositide 3-kinase gamma inhibition plays a crucial role in early steps of inflammation by blocking neutrophil recruitment. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **322**, 923-930
- [291] Nombela-Arrieta, C., Lacalle, R. A., Montoya, M. C., Kunisaki, Y., Megias, D., Marques, M., Carrera, A. C., Manes, S., Fukui, Y., Martinez, A. C. and Stein, J. V. (2004) Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase gamma during T and B lymphocyte homing. *Immunity*. **21**, 429-441
- [292] Reif, K., Okkenhaug, K., Sasaki, T., Penninger, J. M., Vanhaesebroeck, B. and Cyster, J. G. (2004) Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110gamma and p110delta, in lymphocyte chemotaxis and homing. *J Immunol*. **173**, 2236-2240
- [293] Nombela-Arrieta, C., Mempel, T. R., Soriano, S. F., Mazo, I., Wymann, M. P., Hirsch, E., Martinez, A. C., Fukui, Y., von Andrian, U. H. and Stein, J. V. (2007) A central role for DOCK2 during interstitial lymphocyte motility and sphingosine-1-phosphate-mediated egress. *The Journal of experimental medicine*. **204**, 497-510
- [294] Barber, D. F., Bartolome, A., Hernandez, C., Flores, J. M., Fernandez-Arias, C., Rodriguez-Borlado, L., Hirsch, E., Wymann, M., Balomenos, D. and Carrera, A. C. (2006) Class IB-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) deficiency ameliorates IA-PI3K-induced systemic lupus but not T cell invasion. *J Immunol*. **176**, 589-593
- [295] Martin, A. L., Schwartz, M. D., Jameson, S. C. and Shimizu, Y. (2008) Selective regulation of CD8 effector T cell migration by the p110 gamma isoform of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*. **180**, 2081-2088
- [296] Thomas, M. S., Mitchell, J. S., DeNucci, C. C., Martin, A. L. and Shimizu, Y. (2008) The p110gamma isoform of phosphatidylinositol 3-kinase regulates migration of effector CD4 T lymphocytes into peripheral inflammatory sites. *Journal of leukocyte biology*. **84**, 814-823
- [297] Lim, D. H., Cho, J. Y., Song, D. J., Lee, S. Y., Miller, M. and Broide, D. H. (2009) PI3K gamma-deficient mice have reduced levels of allergen-induced eosinophilic inflammation and airway remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **296**, L210-219
- [298] Takeda, M., Ito, W., Tanabe, M., Ueki, S., Kato, H., Kihara, J., Tanigai, T., Chiba, T., Yamaguchi, K., Kayaba, H., Imai, Y., Okuyama, K., Ohno, I., Sasaki, T. and Chihara, J. (2009) Allergic airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling do not develop in phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice. *The Journal of allergy and clinical immunology*. **123**, 805-812
- [299] Saudemont, A., Garcon, F., Yadi, H., Roche-Molina, M., Kim, N., Segonds-Pichon, A., Martin-Fontecha, A., Okkenhaug, K. and Colucci, F. (2009) p110gamma and p110delta isoforms of phosphoinositide 3-kinase differentially regulate natural killer cell migration in health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **106**, 5795-5800
- [300] Camps, M., Ruckle, T., Ji, H., Ardisson, V., Rintelen, F., Shaw, J., Ferrandi, C., Chabert, C., Gillieron, C., Francon, B., Martin, T., Gretener, D., Perrin, D., Leroy, D., Vitte, P. A., Hirsch, E., Wymann, M. P., Cirillo, R., Schwarz, M. K. and Rommel, C. (2005)

- Blockade of PI3K γ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nature medicine*. **11**, 936-943
- [301] Barber, D. F., Bartolome, A., Hernandez, C., Flores, J. M., Redondo, C., Fernandez-Arias, C., Camps, M., Ruckle, T., Schwarz, M. K., Rodriguez, S., Martinez, A. C., Balomenos, D., Rommel, C. and Carrera, A. C. (2005) PI3K γ inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nature medicine*. **11**, 933-935
- [302] Fougerat, A., Gayral, S., Gourdy, P., Schambourg, A., Ruckle, T., Schwarz, M. K., Rommel, C., Hirsch, E., Arnal, J. F., Salles, J. P., Perret, B., Breton-Douillon, M., Wymann, M. P. and Laffargue, M. (2008) Genetic and pharmacological targeting of phosphoinositide 3-kinase- γ reduces atherosclerosis and favors plaque stability by modulating inflammatory processes. *Circulation*. **117**, 1310-1317
- [303] Passos, G. F., Figueiredo, C. P., Prediger, R. D., Silva, K. A., Siqueira, J. M., Duarte, F. S., Leal, P. C., Medeiros, R. and Calixto, J. B. Involvement of phosphoinositide 3-kinase γ in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced by beta-amyloid 1-40 peptide in mice. *Brain, behavior, and immunity*. **24**, 493-501
- [304] Ji, H., Rintelen, F., Waltzinger, C., Bertschy Meier, D., Bilancio, A., Pearce, W., Hirsch, E., Wymann, M. P., Ruckle, T., Camps, M., Vanhaesebroeck, B., Okkenhaug, K. and Rommel, C. (2007) Inactivation of PI3K γ and PI3K δ distorts T-cell development and causes multiple organ inflammation. *Blood*. **110**, 2940-2947
- [305] Webb, L. M., Vigorito, E., Wymann, M. P., Hirsch, E. and Turner, M. (2005) Cutting edge: T cell development requires the combined activities of the p110 γ and p110 δ catalytic isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*. **175**, 2783-2787
- [306] Alcazar, I., Marques, M., Kumar, A., Hirsch, E., Wymann, M., Carrera, A. C. and Barber, D. F. (2007) Phosphoinositide 3-kinase γ participates in T cell receptor-induced T cell activation. *The Journal of experimental medicine*. **204**, 2977-2987
- [307] Garcon, F., Patton, D. T., Emery, J. L., Hirsch, E., Rottapel, R., Sasaki, T. and Okkenhaug, K. (2008) CD28 provides T-cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer. *Blood*. **111**, 1464-1471
- [308] Del Prete, A., Vermi, W., Dander, E., Otero, K., Barberis, L., Luini, W., Bernasconi, S., Sironi, M., Santoro, A., Garlanda, C., Facchetti, F., Wymann, M. P., Vecchi, A., Hirsch, E., Mantovani, A. and Sozzani, S. (2004) Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3K γ -deficient mice. *The EMBO journal*. **23**, 3505-3515
- [309] Rodrigues, D. H., Vilela, M. C., Barcelos, L. S., Pinho, V., Teixeira, M. M. and Teixeira, A. L. Absence of PI3K γ leads to increased leukocyte apoptosis and diminished severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. **222**, 90-94
- [310] Condliffe, A. M., Davidson, K., Anderson, K. E., Ellson, C. D., Crabbe, T., Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B., Turner, M., Webb, L., Wymann, M. P., Hirsch, E., Ruckle, T., Camps, M., Rommel, C., Jackson, S. P., Chilvers, E. R., Stephens, L. R. and Hawkins, P. T. (2005) Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood*. **106**, 1432-1440
- [311] Gu, H., Saito, K., Klamann, L. D., Shen, J., Fleming, T., Wang, Y., Pratt, J. C., Lin, G., Lim, B., Kinet, J. P. and Neel, B. G. (2001) Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature*. **412**, 186-190
- [312] Kraft, S. and Kinet, J. P. (2007) New developments in Fc ϵ RI regulation, function and inhibition. *Nat Rev Immunol*. **7**, 365-378

- [313] Laffargue, M., Calvez, R., Finan, P., Trifilieff, A., Barbier, M., Altruda, F., Hirsch, E. and Wymann, M. P. (2002) Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity*. **16**, 441-451
- [314] Ali, K., Bilancio, A., Thomas, M., Pearce, W., Gilfillan, A. M., Tkaczyk, C., Kuehn, N., Gray, A., Giddings, J., Peskett, E., Fox, R., Bruce, I., Walker, C., Sawyer, C., Okkenhaug, K., Finan, P. and Vanhaesebroeck, B. (2004) Essential role for the p110delta phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature*. **431**, 1007-1011
- [315] Lee, K. S., Lee, H. K., Hayflick, J. S., Lee, Y. C. and Puri, K. D. (2006) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase delta attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model. *Faseb J*. **20**, 455-465
- [316] Ali, K., Camps, M., Pearce, W. P., Ji, H., Ruckle, T., Kuehn, N., Pasquali, C., Chabert, C., Rommel, C. and Vanhaesebroeck, B. (2008) Isoform-specific functions of phosphoinositide 3-kinases: p110 delta but not p110 gamma promotes optimal allergic responses in vivo. *J Immunol*. **180**, 2538-2544
- [317] Hirsch, E., Lembo, G., Montrucchio, G., Rommel, C., Costa, C. and Barberis, L. (2006) Signaling through PI3Kgamma: a common platform for leukocyte, platelet and cardiovascular stress sensing. *Thrombosis and haemostasis*. **95**, 29-35
- [318] Watanabe, N., Nakajima, H., Suzuki, H., Oda, A., Matsubara, Y., Moroi, M., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H., Koyasu, S., Ikeda, Y. and Handa, M. (2003) Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85alpha-null platelets characterized by an impaired response to GP VI stimulation. *Blood*. **102**, 541-548
- [319] Jackson, S. P., Schoenwaelder, S. M., Goncalves, I., Nesbitt, W. S., Yap, C. L., Wright, C. E., Kenche, V., Anderson, K. E., Dopheide, S. M., Yuan, Y., Sturgeon, S. A., Prabaharan, H., Thompson, P. E., Smith, G. D., Shepherd, P. R., Daniele, N., Kulkarni, S., Abbott, B., Saylik, D., Jones, C., Lu, L., Giuliano, S., Hughan, S. C., Angus, J. A., Robertson, A. D. and Salem, H. H. (2005) PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nature medicine*. **11**, 507-514
- [320] van der Meijden, P. E., Schoenwaelder, S. M., Feijge, M. A., Cosemans, J. M., Munnix, I. C., Wetzker, R., Heller, R., Jackson, S. P. and Heemskerk, J. W. (2008) Dual P2Y₁₂ receptor signaling in thrombin-stimulated platelets--involvement of phosphoinositide 3-kinase beta but not gamma isoform in Ca²⁺ mobilization and procoagulant activity. *The FEBS journal*. **275**, 371-385
- [321] Lian, L., Wang, Y., Draznin, J., Eslin, D., Bennett, J. S., Poncz, M., Wu, D. and Abrams, C. S. (2005) The relative role of PLCbeta and PI3Kgamma in platelet activation. *Blood*. **106**, 110-117
- [322] Martin, V., Guillermet-Guibert, J., Chicanne, G., Cabou, C., Jandrot-Perrus, M., Plantavid, M., Vanhaesebroeck, B., Payrastre, B. and Gratacap, M. P. Deletion of the p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase in platelets reveals its central role in Akt activation and thrombus formation in vitro and in vivo. *Blood*. **115**, 2008-2013
- [323] Hirsch, E., Bosco, O., Tropel, P., Laffargue, M., Calvez, R., Altruda, F., Wymann, M. and Montrucchio, G. (2001) Resistance to thromboembolism in PI3Kgamma-deficient mice. *Faseb J*. **15**, 2019-2021
- [324] Puri, K. D., Doggett, T. A., Huang, C. Y., Douangpanya, J., Hayflick, J. S., Turner, M., Penninger, J. and Diacovo, T. G. (2005) The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood*. **106**, 150-157
- [325] Serban, D., Leng, J. and Cheresch, D. (2008) H-ras regulates angiogenesis and vascular permeability by activation of distinct downstream effectors. *Circulation research*. **102**, 1350-1358
- [326] Gavard, J., Hou, X., Qu, Y., Masedunskas, A., Martin, D., Weigert, R., Li, X. and Gutkind, J. S. (2009) A role for a CXCR2/phosphatidylinositol 3-kinase gamma signaling

- axis in acute and chronic vascular permeability. *Molecular and cellular biology*. **29**, 2469-2480
- [327] Chavakis, E., Carmona, G., Urbich, C., Gottig, S., Henschler, R., Penninger, J. M., Zeiher, A. M., Chavakis, T. and Dimmeler, S. (2008) Phosphatidylinositol-3-kinase-gamma is integral to homing functions of progenitor cells. *Circulation research*. **102**, 942-949
- [328] Madeddu, P., Kraenkel, N., Barcelos, L. S., Siragusa, M., Campagnolo, P., Oikawa, A., Caporali, A., Herman, A., Azzolino, O., Barberis, L., Perino, A., Damilano, F., Emanuelli, C. and Hirsch, E. (2008) Phosphoinositide 3-kinase gamma gene knockout impairs postischemic neovascularization and endothelial progenitor cell functions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **28**, 68-76
- [329] Siragusa, M., Katare, R., Meloni, M., Damilano, F., Hirsch, E., Emanuelli, C. and Madeddu, P. Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in angiogenesis and healing of experimental myocardial infarction in mice. *Circulation research*. **106**, 757-768
- [330] Michell, B. J., Griffiths, J. E., Mitchelhill, K. I., Rodriguez-Crespo, I., Tiganis, T., Bozinovski, S., de Montellano, P. R., Kemp, B. E. and Pearson, R. B. (1999) The Akt kinase signals directly to endothelial nitric oxide synthase. *Curr Biol*. **9**, 845-848
- [331] Zeng, G., Nystrom, F. H., Ravichandran, L. V., Cong, L. N., Kirby, M., Mostowski, H. and Quon, M. J. (2000) Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation*. **101**, 1539-1545
- [332] Kuboki, K., Jiang, Z. Y., Takahara, N., Ha, S. W., Igarashi, M., Yamauchi, T., Feener, E. P., Herbert, T. P., Rhodes, C. J. and King, G. L. (2000) Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo : a specific vascular action of insulin. *Circulation*. **101**, 676-681
- [333] di Villa Bianca, R., Sorrentino, R., Sorrentino, R., Imbimbo, C., Palmieri, A., Fusco, F., Maggi, M., De Palma, R., Cirino, G. and Mirone, V. (2006) Sphingosine 1-phosphate induces endothelial nitric-oxide synthase activation through phosphorylation in human corpus cavernosum. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **316**, 703-708
- [334] Dimmeler, S., Dernbach, E. and Zeiher, A. M. (2000) Phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase at ser-1177 is required for VEGF-induced endothelial cell migration. *FEBS letters*. **477**, 258-262
- [335] Cieslik, K., Abrams, C. S. and Wu, K. K. (2001) Up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase promoter by the phosphatidylinositol 3-kinase gamma /Janus kinase 2/MEK-1-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*. **276**, 1211-1219
- [336] Macrez, N., Mironneau, C., Carricaburu, V., Quignard, J. F., Babich, A., Czupalla, C., Nurnberg, B. and Mironneau, J. (2001) Phosphoinositide 3-kinase isoforms selectively couple receptors to vascular L-type Ca(2+) channels. *Circulation research*. **89**, 692-699
- [337] Viard, P., Butcher, A. J., Halet, G., Davies, A., Nurnberg, B., Hebllich, F. and Dolphin, A. C. (2004) PI3K promotes voltage-dependent calcium channel trafficking to the plasma membrane. *Nature neuroscience*. **7**, 939-946
- [338] Saward, L. and Zahradka, P. (1997) Angiotensin II activates phosphatidylinositol 3-kinase in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. **81**, 249-257
- [339] Seki, T., Yokoshiki, H., Sunagawa, M., Nakamura, M. and Sperelakis, N. (1999) Angiotensin II stimulation of Ca²⁺-channel current in vascular smooth muscle cells is inhibited by lavendustin-A and LY-294002. *Pflugers Arch*. **437**, 317-323
- [340] Quignard, J. F., Mironneau, J., Carricaburu, V., Fournier, B., Babich, A., Nurnberg, B., Mironneau, C. and Macrez, N. (2001) Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates angiotensin II-induced stimulation of L-type calcium channels in vascular myocytes. *The Journal of biological chemistry*. **276**, 32545-32551

- [341] Vecchione, C., Patrucco, E., Marino, G., Barberis, L., Poulet, R., Aretini, A., Maffei, A., Gentile, M. T., Storto, M., Azzolino, O., Brancaccio, M., Colussi, G. L., Bettarini, U., Altruda, F., Silengo, L., Tarone, G., Wymann, M. P., Hirsch, E. and Lembo, G. (2005) Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3K γ . *The Journal of experimental medicine*. **201**, 1217-1228
- [342] Marx, S. O., Jayaraman, T., Go, L. O. and Marks, A. R. (1995) Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*. **76**, 412-417
- [343] Mourani, P. M., Garl, P. J., Wenzlau, J. M., Carpenter, T. C., Stenmark, K. R. and Weiser-Evans, M. C. (2004) Unique, highly proliferative growth phenotype expressed by embryonic and neointimal smooth muscle cells is driven by constitutive Akt, mTOR, and p70S6K signaling and is actively repressed by PTEN. *Circulation*. **109**, 1299-1306
- [344] Sousa, J. E., Costa, M. A., Abizaid, A. C., Rensing, B. J., Abizaid, A. S., Tanajura, L. F., Kozuma, K., Van Langenhove, G., Sousa, A. G., Falotico, R., Jaeger, J., Popma, J. J. and Serruys, P. W. (2001) Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation*. **104**, 2007-2011
- [345] Bacqueville, D., Casagrande, F., Perret, B., Chap, H., Darbon, J. M. and Breton-Douillon, M. (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors block aortic smooth muscle cell proliferation in mid-late G1 phase: effect on cyclin-dependent kinase 2 and the inhibitory protein p27KIP1. *Biochemical and biophysical research communications*. **244**, 630-636
- [346] Goncharova, E. A., Ammit, A. J., Irani, C., Carroll, R. G., Eszterhas, A. J., Panettieri, R. A. and Krymskaya, V. P. (2002) PI3K is required for proliferation and migration of human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **283**, L354-363
- [347] Fernandez-Hernando, C., Jozsef, L., Jenkins, D., Di Lorenzo, A. and Sessa, W. C. (2009) Absence of Akt1 reduces vascular smooth muscle cell migration and survival and induces features of plaque vulnerability and cardiac dysfunction during atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. **29**, 2033-2040
- [348] Bacqueville, D., Deleris, P., Mendre, C., Pieraggi, M. T., Chap, H., Guillon, G., Perret, B. and Breton-Douillon, M. (2001) Characterization of a G protein-activated phosphoinositide 3-kinase in vascular smooth muscle cell nuclei. *The Journal of biological chemistry*. **276**, 22170-22176
- [349] Ruckle, T., Schwarz, M. K. and Rommel, C. (2006) PI3K γ inhibition: towards an 'aspirin of the 21st century'? *Nat Rev Drug Discov*. **5**, 903-918
- [350] Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M. M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W. F., Dodge, J., Grindey, G. and et al. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer research*. **54**, 2419-2423
- [351] Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. and Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *The Journal of biological chemistry*. **269**, 5241-5248
- [352] Knight, Z. A., Gonzalez, B., Feldman, M. E., Zunder, E. R., Goldenberg, D. D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A., Toth, B., Balla, T., Weiss, W. A., Williams, R. L. and Shokat, K. M. (2006) A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110 α in insulin signaling. *Cell*. **125**, 733-747
- [353] Raynaud, F. I., Eccles, S., Clarke, P. A., Hayes, A., Nutley, B., Alix, S., Henley, A., Di-Stefano, F., Ahmad, Z., Guillard, S., Bjerke, L. M., Kelland, L., Valenti, M., Patterson, L., Gowan, S., de Haven Brandon, A., Hayakawa, M., Kaizawa, H., Koizumi, T., Ohishi, T., Patel, S., Saghir, N., Parker, P., Waterfield, M. and Workman, P. (2007) Pharmacologic

characterization of a potent inhibitor of class I phosphatidylinositol 3-kinases. *Cancer research*. **67**, 5840-5850

[354] Maira, S. M., Stauffer, F., Brueggen, J., Furet, P., Schnell, C., Fritsch, C., Brachmann, S., Chene, P., De Pover, A., Schoemaker, K., Fabbro, D., Gabriel, D., Simonen, M., Murphy, L., Finan, P., Sellers, W. and Garcia-Echeverria, C. (2008) Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics*. **7**, 1851-1863

[355] Billottet, C., Grandage, V. L., Gale, R. E., Quattropani, A., Rommel, C., Vanhaesebroeck, B. and Khwaja, A. (2006) A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene*. **25**, 6648-6659

[356] Sujobert, P., Bardet, V., Cornillet-Lefebvre, P., Hayflick, J. S., Prie, N., Verdier, F., Vanhaesebroeck, B., Muller, O., Pesce, F., Ifrah, N., Hunault-Berger, M., Berthou, C., Villemagne, B., Jourdan, E., Audhuy, B., Solary, E., Witz, B., Harousseau, J. L., Hemberlin, C., Lamy, T., Lioure, B., Cahn, J. Y., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C. and Bouscary, D. (2005) Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood*. **106**, 1063-1066

[357] Randis, T. M., Puri, K. D., Zhou, H. and Diacovo, T. G. (2008) Role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in inflammatory arthritis and tissue localization of neutrophils. *European journal of immunology*. **38**, 1215-1224

[358] Hayer, S., Pundt, N., Peters, M. A., Wunrau, C., Kuhnel, I., Neugebauer, K., Strietholt, S., Zwerina, J., Korb, A., Penninger, J., Joosten, L. A., Gay, S., Ruckle, T., Schett, G. and Pap, T. (2009) PI3Kgamma regulates cartilage damage in chronic inflammatory arthritis. *FASEB J*. **23**, 4288-4298

[359] Wei, X., Han, J., Chen, Z. Z., Qi, B. W., Wang, G. C., Ma, Y. H., Zheng, H., Luo, Y. F., Wei, Y. Q. and Chen, L. J. A phosphoinositide 3-kinase-gamma inhibitor, AS605240 prevents bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Biochemical and biophysical research communications*. **397**, 311-317

[360] Pinho, V., Souza, D. G., Barsante, M. M., Hamer, F. P., De Freitas, M. S., Rossi, A. G. and Teixeira, M. M. (2005) Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils in vivo: importance for the resolution of allergic inflammation. *Journal of leukocyte biology*. **77**, 800-810

[361] Doukas, J., Eide, L., Stebbins, K., Racanelli-Layton, A., Dellamary, L., Martin, M., Dneprovskaja, E., Noronha, G., Soll, R., Wrasidlo, W., Acevedo, L. M. and Cheresch, D. A. (2009) Aerosolized phosphoinositide 3-kinase gamma/delta inhibitor TG100-115 [3-[2,4-diamino-6-(3-hydroxyphenyl)pteridin-7-yl]phenol] as a therapeutic candidate for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. **328**, 758-765

[362] Palanki, M. S., Dneprovskaja, E., Doukas, J., Fine, R. M., Hood, J., Kang, X., Lohse, D., Martin, M., Noronha, G., Soll, R. M., Wrasidlo, W., Yee, S. and Zhu, H. (2007) Discovery of 3,3'-(2,4-diaminopteridine-6,7-diyl)diphenol as an isozyme-selective inhibitor of PI3K for the treatment of ischemia reperfusion injury associated with myocardial infarction. *Journal of medicinal chemistry*. **50**, 4279-4294

[363] Hirsch, E., Ciralo, E., Ghigo, A. and Costa, C. (2008) Taming the PI3K team to hold inflammation and cancer at bay. *Pharmacology & therapeutics*. **118**, 192-205

[364] Chang, J. D., Sukhova, G. K., Libby, P., Schwartz, E., Lichtenstein, A. H., Field, S. J., Kennedy, C., Madhavarapu, S., Luo, J., Wu, D. and Cantley, L. C. (2007) Deletion of the phosphoinositide 3-kinase p110gamma gene attenuates murine atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**, 8077-8082

- [365] Shi, G. P., Munger, J. S., Meara, J. P., Rich, D. H. and Chapman, H. A. (1992) Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *The Journal of biological chemistry*. **267**, 7258-7262
- [366] Weiss-Haljiti, C., Pasquali, C., Ji, H., Gillieron, C., Chabert, C., Curchod, M. L., Hirsch, E., Ridley, A. J., Hooft van Huijsduijnen, R., Camps, M. and Rommel, C. (2004) Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma, Rac, and PAK signaling in chemokine-induced macrophage migration. *The Journal of biological chemistry*. **279**, 43273-43284
- [367] Weber, D. S., Taniyama, Y., Rocic, P., Seshiah, P. N., Dechert, M. A., Gerthoffer, W. T. and Griendling, K. K. (2004) Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. *Circulation research*. **94**, 1219-1226
- [368] Weber, D. S., Taniyama, Y., Rocic, P., Seshiah, P. N., Dechert, M. A., Gerthoffer, W. T. and Griendling, K. K. (2004) Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. *Circulation research*. **94**, 1219-1226

PARTIE V : Annexe

Phosphoinositide 3-kinases and their role in inflammation: potential clinical targets in atherosclerosis?

Anne FOUGERAT, Stéphanie GAYRAL, Nicole MALET, Fabienne BRIAND-MESANGE, Monique BRETON-DOUILLON and Muriel LAFFARGUE

Département Lipoprotéines et Médiateurs lipidiques, INSERM U563, site Toulouse-Purpan, BP 3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France

ABSTRACT

Inflammation has a central role in the pathogenesis of atherosclerosis at various stages of the disease. Therefore it appears of great interest to develop novel and innovative drugs targeting inflammatory proteins for the treatment of atherosclerosis. The PI3K (phosphoinositide 3-kinase) family, which catalyses the phosphorylation of the 3-OH position of phosphoinositides and generates phospholipids, controls a wide variety of intracellular signalling pathways. Recent studies provide evidence for a crucial role of this family not only in immune function, such as inflammatory cell recruitment, and expression and activation of inflammatory mediators, but also in antigen-dependent responses making it an interesting target to modulate inflammatory processes. The present review will focus on the regulation of inflammation within the vasculature during atherogenesis. We will concentrate on the different functions played by each isoform of PI3K in immune cells which could be involved in this pathology, raising the possibility that inhibition of one or more PI3K isoforms may represent an effective approach in the treatment of atherosclerosis.

PHYSIOPATHOLOGY OF ATHEROSCLEROSIS

Arteries present a common structural pattern consisting of three concentric tunica separated by elastic lamina layers. The innermost tunica intima delimits the vessel wall towards the blood flow and is composed of lining ECs (endothelial cells). Below, the tunica media is formed by a layer of circumferential vascular SMCs (smooth muscle cells) which maintain vasculature tone. Finally,

the outer adventitia which consists mainly of connective tissue fibres blends the vessel into its surrounding [1].

Atherosclerosis is a multifaceted pathology affecting large/medium-sized arteries and is an inevitable component of aging. Indeed, triggers of atherosclerosis, such as consuming a fatty diet, smoking, hypertension, dyslipidaemia, obesity, infections and stress, can initiate the pathological mechanisms that make the vascular endothelium dysfunctional. Disturbed ECs results in

Key words: atherogenesis, immune cells, inflammation, plaque rupture, phosphoinositide 3-kinase, thrombosis.

Abbreviations: ApoE, apolipoprotein E; BCR, B-cell receptor; CB₂, cannabinoid 2; E₂, 17 β -oestradiol; EC, endothelial cell; FGF, fibroblast growth factor; fMLP, N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine; FOXO, forkhead box O; GPCR, G-protein-coupled receptor; HDL, high-density lipoprotein; Hsp, heat-shock protein; IFN, interferon; IL, interleukin; ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motif; LDL, low-density lipoprotein; LDLr, LDL receptor; LPS, lipopolysaccharide; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; MC, mast cell; M-CSF, macrophage colony-stimulating factor; MMP, matrix metalloproteinase; oxLDL, oxidized LDL; LOX-1, lectin-type oxLDL receptor-1; NF- κ B, nuclear factor κ B; PDGF, platelet-derived growth factor; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; PKB, protein kinase B; PPAR, peroxisome-proliferator-activated receptor; PX domain, Phox homology domain; RANTES, regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted; ROS, reactive oxygen species; SH2, Src homology 2; SMC, smooth muscle cell; SR-A, scavenger receptor-A; TCR, T-cell receptor; TLR, Toll-like receptor; TNF- α , tumour necrosis factor α ; VCAM-1, vascular cell-adhesion molecule-1; wt, wild-type.

Correspondence: Dr Muriel Laffargue (email muriel.laffargue@inserm.fr).

altered endothelium permeability, permitting lipoprotein accumulation within the intima and inducing EC molecule adhesion expression, which mediates leucocyte adhesion and infiltration. This intimal collection constitutes the 'fatty streak', which is asymptomatic and can evolve to advanced/complicated lesions depending on the inflammatory process. In the vessel wall, infiltrated monocytes mature into macrophages which accumulate modified lipoproteins through receptor endocytosis and are converted into foam cells. Simultaneously, T-cells direct their adaptive immune response. Cytokines and growth factors secreted by leucocytes, as well as ECs, promote proliferation and migration of SMCs, surrounding lipid core with a protective fibrous cap and separating the prothrombotic lipid pool from luminal blood flow. In the intima, SMCs secrete extracellular matrix proteins, and this process contributes to the evolution of the lesion from a lipid-rich plaque to a fibrotic, and in the long-term, calcified lesion [1,2].

During the 1990s, the balance between SMCs and inflammatory cells was emphasized as a strong determinant of plaque rupture and plaque stability and became a major notion in understanding the clinical manifestation of atheroma disease. In stable plaques, a thick cap consisting of SMCs and extracellular matrix covers the entire lipid core. These lesions are clinically silent and they rarely rupture. By contrast, the fibrous cap in unstable plaques is thin, especially at the shoulder lesion and contains few SMCs, but numerous inflammatory cells. These plaques are prone to rupture leading to thrombosis, followed by either occlusion or episodic plaque expansion. Moreover, during plaque development, remodelling of the artery takes place and consists of reactive changes in the underlying vessel wall to preserve a normal lumen and prevent flow occlusion. However, the degree of inflammation and cap thickness determine the risks of plaque rupturing [3]. Repeated ruptures increase stenoses and can promote myocardial infarction, stroke and gangrene in the peripheral vasculature.

Thus understanding of the atherosclerosis process shows that inflammation participates from atheroma inception, its development up until complications and places this vascular pathology as a chronic inflammatory disease.

INFLAMMATION IN ATHEROSCLEROSIS DEVELOPMENT

The inflammatory processes of atherosclerosis require both innate and adaptive immunity. Macrophages play a central role among immune cells involved in this pathology, since they take part in both the lipid core formation and the production of inflammatory mediators. In addition, accumulating evidence supports the important role of T-cells in the first steps of atherosclerosis, whereas

B-cells are poorly represented in the intimal plaque and their role is limited to antigen presentation [4].

In addition, MCs (mast cells) and neutrophils have recently been identified in atherosclerotic lesions. MCs appear to play different functions in atherogenesis from endothelial alteration to final plaque destabilization [5], and neutrophils have been suggested to be involved in the pathology due to their ability to produce ROS (reactive oxygen species) via the NADPH oxidase pathway and, thus, promoting lipid peroxidation, endothelial dysfunction, inflammation, cell migration and apoptosis [6]. However, identification of neutrophils in atherosclerotic lesions, as well as their involvement in atherogenesis, have only recently been demonstrated [7,8].

With the development of mouse models of atherosclerosis, it has become possible to examine more carefully the role of immune responses in this disease. Among the most widely used mouse models of atherosclerosis are ApoE^{-/-} [ApoE (apolipoprotein E)-deficient] and LDLr^{-/-} [LDL (low-density lipoprotein) receptor-deficient] mice [9,10]. ApoE is a glycoprotein synthesized in the liver and macrophages, and is involved in lipid metabolism. Deletion of the *apoE* gene in mice leads to severe hypercholesterolaemia and spontaneous development of atherosclerotic lesions that are well-characterized and resemble lesions in humans from fatty streak lesions to fibrous cap formation. LDLr^{-/-} mice, a model of familial hypercholesterolaemia, have a more modest lipoprotein abnormality than the ApoE^{-/-} mice and develop atherosclerotic lesions only after a high-fat/high-cholesterol diet. As with ApoE^{-/-} mice, lesions developed by these mice appear morphologically identical with those found in humans.

Inflammation in early atherosclerotic lesions (fatty streaks)

Shortly after VCAM-1 (vascular cell-adhesion molecule-1) induction on ECs (Figure 1A), monocytes and T-cells pass through the arterial intima by diapedesis. Various chemokines contribute to this process, such as MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) and IL-8 (interleukin-8), both involved in macrophage recruitment, and IFN- γ (interferon- γ)-inducible chemokines, including IP-10 (inducible protein-10), Mig (monokine induced by IFN- γ) and I-TAC (IFN-inducible T-cell α -chemoattractant), which are involved in T-cell activation. As an example, mice susceptible to atherogenesis and lacking MCP-1 or its receptor CCR2 (CC chemokine receptor 2) are defective in atherogenesis, with a decrease in mononuclear phagocyte accumulation [11,12].

Production of M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) by ECs and SMCs favours monocyte differentiation into pro-atherogenic macrophages, which accumulate lipids and secrete pro-inflammatory mediators within the intima. Lipid uptake by macrophages is mainly attributed to their ability to internalize oxidized or

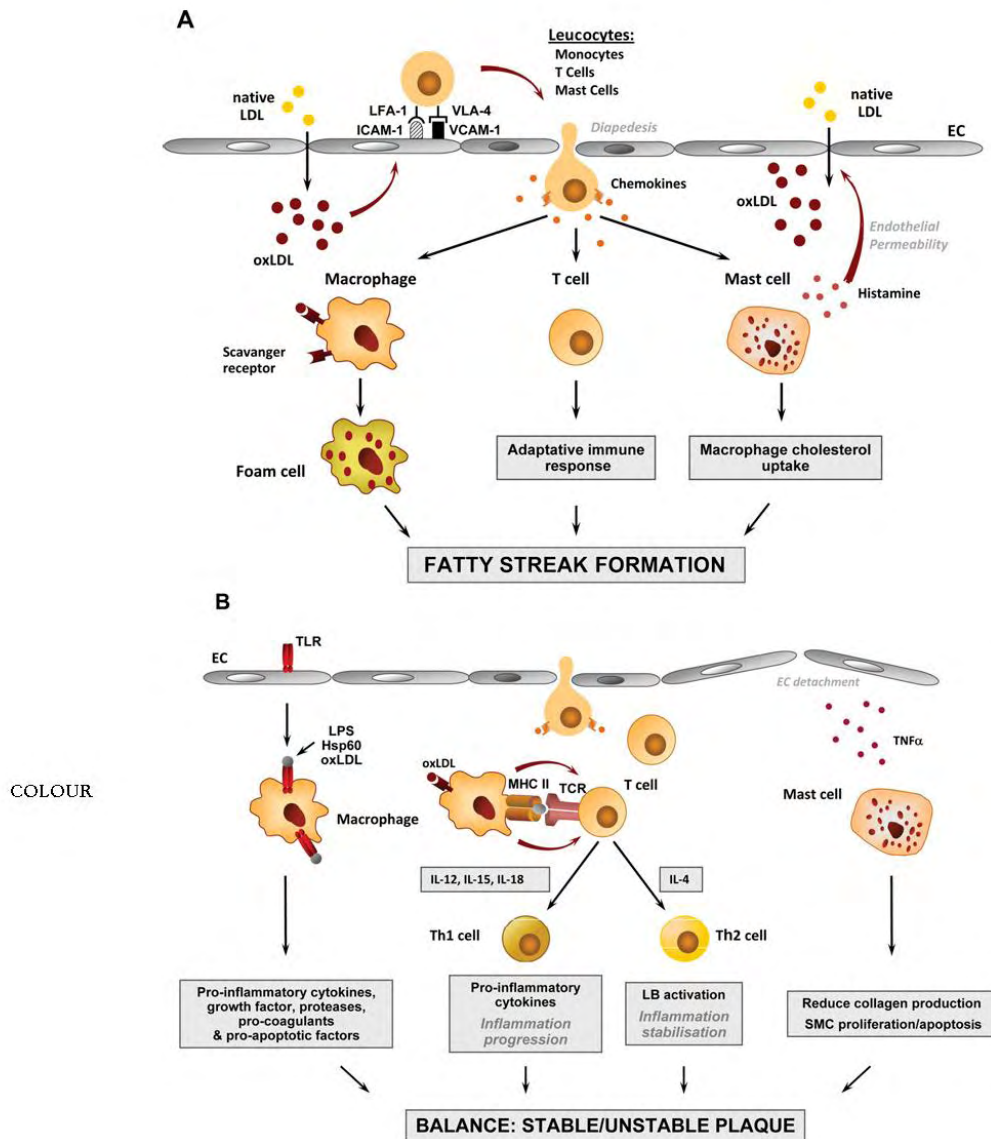


Figure 1 Inflammatory cells involved in atherosclerosis

(A) Inflammation in fatty streaks. After VCAM-1 induction on ECs, leucocytes (monocytes, T-cells and MCs) enter the arterial intima by diapedesis. Differentiated macrophages accumulate modified lipoprotein (oxLDL) by scavenger receptors and are converted into foam cells. T-cells then direct their adaptative immune response. In parallel, MCs release granule components which enhance endothelial permeability to plasma lipoproteins and inhibit cholesterol efflux in macrophages. ICAM-1, intercellular adhesion molecule 1; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen 1; VLA-4, very late antigen-4. (B) Inflammation in plaque stabilization. In innate immunity, macrophages express TLRs which bind to LPS, Hsp60, oxLDL etc. and induce pro-inflammatory cytokines, proteases, and pro-apoptotic and pro-coagulant mediators. Interaction between TCRs and antigens carried by MHC class II macrophages activate T-cells. After IL-12, IL-15, IL-18 and IFN- γ secretion, T-cells direct a pro-inflammatory Th1 response, whereas IL-4 secretion results in a Th2 anti-inflammatory response able to stimulate B-cells (LB), which could produce antibodies again oxLDL. In the same way, MCs secrete TNF- α , which induces EC detachment, and other granule components which reduce collagen production and influence SMC proliferation/apoptosis. Together, innate and adaptative immune responses could influence the atherosclerotic plaque towards a stable or unstable fate.

glycated lipoproteins through scavenger receptors such as CD36, CD68, CXCL16 (CXC-chemokine ligand 16), LOX-1 [lectin-type oxLDL (oxidized LDL) receptor-1] and SR-A (scavenger receptor-A), which are highly expressed on their cell surface. As these receptors are poorly regulated, macrophages accumulate cholesterol and become foam cells, which are highly present in early fatty streak lesions. According to these results, mice defective in the M-CSF, G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), SR-A or CD36 are all defective in atherogenesis [13]. In parallel with foam cell formation, oxLDL, LPS (lipopolysaccharide) and Hsp60 (heat-shock protein 60) interact with TLRs (Toll-like receptors), which are innate immune recognition receptors, leading to macrophage activation. These activated macrophages disrupt vascular cell functions by synthesizing and releasing pro-inflammatory cytokines, chemokines, growth factors [FGF (fibroblast growth factor) and PDGF (platelet-derived growth factor)], MMPs (matrix metalloproteinases), ROS, eicosanoids and tissue factor. All of these factors are involved in the progression of atherosclerosis and plaque destabilization (see below). The importance of macrophage function in atherogenesis can be illustrated by the observation that hypercholesterolaemic *Op/Op* (*Csf1*^{-/-}) mice lacking differentiated macrophages in tissues due to a mutation in the M-CSF gene (*Csf1*) develop only few atherosclerotic lesions [14].

Adaptive immunity then takes over, with T-cell activation by interaction with antigens presented by macrophages expressing MHC class II molecules (oxLDL, Hsp etc.). Lymphocytes within atherosclerotic lesions are mainly CD4⁺ lymphocytes and most of them are $\alpha\beta$ T-cells with a small proportion of $\gamma\delta$ T-cells. The importance of lymphocytes in atherosclerosis development has been clearly demonstrated in atherosclerotic mice. *LDLr*^{-/-} mice crossbred with lymphocyte-deficient *Rag1*^{-/-} (recombination activating gene 1) mice have a dramatic reduction in fatty streak lesions [15]. Likewise, immunodeficient *ApoE*^{-/-}/*scid-scid* mice have reduced atherosclerotic lesions compared with *ApoE*^{-/-} mice. Transfer of CD4⁺ T-cells in these immunodeficient mice not only reverses this protection, but also dramatically induces atherosclerosis [16]. Previous studies have demonstrated that the Th1 subset of CD4⁺ is the predominant type of lymphocytes found in atherosclerotic lesions, probably owing to local production of IL-12, IL-15 or IL-18 [17,18]. Th1 lymphocytes have a pro-atherogenic effect associated with their production of IFN- γ , as it has been shown that *ApoE*^{-/-}/*IFN- γ* ^{-/-} mice have smaller lesions than those observed in *ApoE*^{-/-} mice [19]. Production of IFN- γ and TNF- α (tumour necrosis factor- α) by T-cells induces macrophage activation, production of proteases and other pro-inflammatory mediators, EC activation, an increase in adhesion molecule expression, and inhibition of SMC

proliferation and collagen production. Moreover, the anti-atherogenic effect of IL-10 [20–22], known to regulate Th1 and Th2 responses by limiting T-cell activation and differentiation in lymph nodes as well as suppressing pro-inflammatory responses in tissues, reinforces the importance of T-cells in the development of atherosclerosis [23]. The role of Th2-related responses in atherosclerosis is still controversial and there is no evidence to conclude that the Th2 response is invariably protective against atherosclerosis progression [18,24]. A novel functionally distinct subpopulation of T-cells, called regulatory T-cells, has been shown to exert important regulatory functions in atherosclerosis. Ait-Oufella et al. [25] showed that naturally arising CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cells are powerful inhibitors of atherosclerosis in several mouse models. Thus, although T-cells are not abundant, they appear to strongly modulate lesion initiation and the early progression of atherosclerosis [15], and to contribute to the regulation of plaque stability.

It has been shown recently that MCs also participate in the development of atherosclerosis [5]. Indeed, MC-deficient mice (*LDLr*^{-/-} \times *Kit*^{W^{sh}/W^{sh}) had decreases in lesion size, lipid deposition, T-cell and macrophage numbers, cell proliferation and apoptosis, but increased collagen content. Kovanen et al. [26] have proposed many roles for MCs in atherogenesis, such as modification of endothelial permeability or an involvement in foam cell formation. The chemokines mainly responsible for recruitment of MC progenitors into the intima are SCF (stem cell factor) and eotaxin or CCL11, a CC chemokine overexpressed in atherosclerotic lesions [27]. Once in the intima, MCs undergo degranulation and release TNF- α , heparin, histamine and the serine proteases tryptase and chymase. Histamine from MC granules may locally induce enhanced endothelial permeability, leading to increased plasma lipoprotein infiltration. Moreover, heparin proteoglycans released from MC granules bind LDL particles which undergo proteolysis by chymase. These LDL particles fuse into larger lipid droplets that are phagocytosed by macrophages leading to foam cell formation [28]. In addition, MC chymase and tryptase can actively degrade HDL (high-density lipoprotein) and poorly lipidated HDL (pre β -HDL), thereby inhibiting cholesterol efflux from macrophage foam cells [26]. Therefore MCs may both stimulate cholesterol uptake and inhibit cholesterol efflux, leading to intimal foam cell and fatty streak lesion formation.}

Inflammation in advanced and complicated atherosclerotic lesions

Fatty streaks can progress into mature atherosclerotic plaques (Figure 1B) that contain more complex lesions characterized by a lipid-rich core covered by a fibrous cap and a large number of activated inflammatory cells, particularly T-cells and macrophages. Other cell types are present such as dendritic cells, MCs, a few B-cells and

natural killer T-cells. These immune cells are in an activated state and produce pro-inflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF- α .

Macrophages play major roles in plaque destabilization through the production of various enzymes, activators, inhibitors and bioactive mediators. For example, macrophages express and release MMPs, which digest the plaque's matrix and thus impair its stability. This destabilization can also result from the induction of SMC apoptosis by macrophages requiring direct cell-cell contact or proximity and partly due to Fas/Fas-ligand interactions [29]. On the other hand, apoptosis of macrophages themselves induces necrotic core formation, reinforcing plaque fragility [30].

In addition to macrophages, T-cells localize at sites of plaque rupture. Th1 cytokines (IFN- γ and TNF- α) inhibit the proliferation of SMCs and the production of collagen by SMCs, thereby reducing stability of the plaque. Moreover, pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 or TNF- α , can stimulate MMP activity and their production by SMCs [31,32]. IFN- γ inhibits SMC proliferation and can also, together with TNF- α and IL-1, promote apoptosis of SMCs [33], increasing the risk of plaque rupture.

MCs have also been identified in advanced atherosclerotic lesions and at the sites of plaque rupture or erosion [34]. The number of degranulated MCs is especially pronounced in the shoulder regions of atheroma, the predilection sites for atheromatous rupture. Moreover, the number of MCs tends to increase with the clinical severity of coronary syndromes [26]. These findings argue for the possibility that MC degranulation contributes to the vulnerability of plaques [35]. MCs may also participate in plaque erosion by inducing apoptosis of ECs via the secretion pro-apoptotic factors, such as TNF- α , thereby inducing the detachment of ECs from the cap. Moreover, MCs can contribute to matrix degradation by secreting proteases (chymase and tryptase) that activate MMPs, promoting collagen degradation and plaque destabilization. For example, studies have shown that human chymase and tryptase activate pro-MMP-1 [36] and pro-MMP-3 [37] respectively. In addition, chymase could act directly on SMC function by inhibiting collagen synthesis [38] or by inducing their apoptosis [39]. These effects would weaken the cap and predispose the plaque to rupture.

Recent findings have shown an accumulation of neutrophils in atherosclerotic lesions [7,8]. Their role in atherogenesis was clearly demonstrated in neutrophil-depleted ApoE^{-/-} mice which develop reduced atherosclerotic lesions [8]. Moreover, analysis of neutrophils in human atherosclerotic plaques showed a high number of NEP (neutral endopeptidase)-positive neutrophils in ruptured plaques compared with eroded plaques, suggesting a role for this cell type in plaque destabilization [40].

The most important consequences of atherosclerosis, such as myocardial infarction and stroke, are caused by

thrombosis. Thrombus formation is driven by plaque rupture or erosion and, in human coronary atheroma, the numbers of macrophages, activated T-cells and MCs are increased at these sites of rupture or erosion [34,41]. This trio of pro-inflammatory cells work together, supporting a link between immunity and thrombosis in atherogenesis.

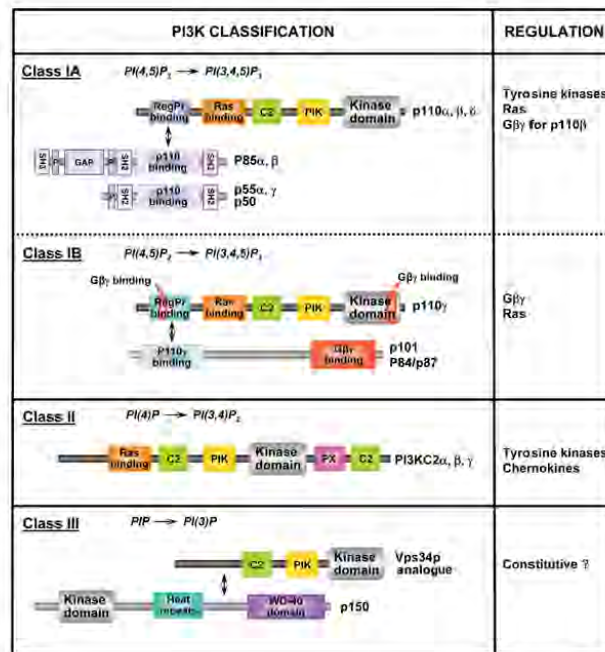
Thrombus formation starts with the coagulation cascade, which involves activated platelets and thrombin formation. In fact, inflammation processes stimulate tissue factor expression on cells within the plaque core (macrophages and SMCs), and rupture of the fibrous cap exposes the thrombogenic core to circulating platelets, leading to the aggregation process and subsequent artery occlusion. In addition to its well-recognized role as an effector of the coagulation cascade, thrombin is also linked to inflammatory pathways of atherosclerosis by directly activating vascular cells such as ECs, SMCs and macrophages [42]. Thus thrombotic processes could amplify inflammation, and inflammation promotes further thrombosis, creating an amplification loop that could maintain atherogenic signals.

FAMILY OF PI3Ks (PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASES)

Inflammatory processes are relayed by a broad range of receptors at the cell surface, such as cytokine receptors, chemokine receptors and other growth factor receptors, but their activation could lead to common pathways of intracellular signalling. Among these shared intracellular events, activation of the family of PI3Ks has been described downstream of a large variety of immune receptors. Members of this family, producing 3-phosphoinositides and especially PtdIns(3,4,5)P₃, are key enzymes of intracellular signalling involved in many biological effects, such as proliferation, migration, metabolic homeostasis and cell survival, implicating PI3K in different pathologies including inflammatory and cardiovascular diseases. On the basis of their structural characteristics and substrate specificity, PI3K are divided in three classes referred to as class I, II and III (Figure 2) [43,44].

The class I PI3K family, the sole members of which are able to produce PtdIns(3,4,5)P₃, is divided in two subclasses. Class IA is characterized by a p110 (α , β or δ) catalytic subunit and a p85 regulatory subunit, whereas class IB is constituted by a single protein (p110 γ or PI3K γ) that could be linked to an adaptor protein (p101 or p84/p87) [45,46].

Each member of the class I PI3K family is activated by distinct pathways based on the cell type and the cell-surface receptor. The p85 subunit of class IA possesses the distinctiveness to bind consensus YXXM motifs when they are phosphorylated on tyrosine residues. This motif is found on the intracytoplasmic tail of tyrosine



COLOUR

Figure 2 PI3K family

Schematic domain structure of the catalytic and regulatory subunits of different classes of PI3K comprising *in vivo* substrate specificity and activation pathways. PI3Ks are classified into three groups based on their structural homology and substrate specificity. Class IA PI3Ks are heterodimers composed of a p110α, p110β or p110δ catalytic subunit that contain a specific domain (RegPI binding) to bind to the regulatory p50/p55 or p85 subunit, a Ras-binding domain (Ras binding), a C2 domain and a PIK (PI3K accessory domain). The sole member of class IB is composed of a catalytic p110γ subunit that contains two domains specifically for its binding to the Gβγ subunit of GPCRs (Gβγ binding) and a regulatory p101 or p84/p87 subunit. Class II PI3K (PI3K-C2α, PI3K-C2β and PI3K-C2γ) do not possess a regulatory binding-protein domain, but have a PX domain and an additional C2 domain at the C-terminus. The catalytic subunit of class III PI3Ks is composed of the mammalian homologue of the yeast Vps34, which binds to a p150 kinase adaptor protein. SH3, Src homology 3 domain; GAP, GTPase-activating protein homology region; p, proline-rich region; Heat, huntingtin, elongation factor 3; the PR65/A subunit of protein phosphatase 2A and the lipid kinase Ior.

kinase receptors or adaptor molecules conferring to class IA PI3Ks an involvement downstream of tyrosine kinase receptor activation or tyrosine-kinase-associated receptor activation. Thus class IA PI3Ks are activated downstream of tyrosine kinase receptor stimulation, such as EGFR (epidermal growth factor receptor) [47], PDGFR (PDGF receptor) [48], FGFR (FGF receptor) [49], GHR (growth hormone receptor) [50,51], IGFR (insulin-like growth factor receptor) [52], insulin receptor [53] and different IL receptors [54]. In immune cells, this class is recruited after TCR (T-cell receptor), BCR (B-cell receptor), natural killer cell stimulatory receptors, Fc receptors and TLR activation [55]. Cross-linking of the immunoreceptor leads to activation of tyrosine kinases that are responsible for the phosphorylation of ITAMs (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs). SH2 (Src homology 2)-containing tyrosine kinases recruited to this motif then create PI3K-docking sites on

co-stimulatory receptors, such as CD28 on T-cells and CD19 on B-cells, or on adaptor molecules interacting with LAT (linker for activation of T-cells) [56].

Nevertheless, there is an exception concerning PI3Kβ activity. Although the structure of this isoform predicted to be activated downstream of tyrosine kinase receptors, recent results from mouse mutants expressing a catalytically inactive PI3Kβ showed a more effective activation of PI3Kβ by GPCRs (G-protein-coupled receptors) than by tyrosine kinases [57–59]. The insulin receptor appears to be the sole tyrosine kinase receptor to involve PI3Kβ in maintaining long-term signalling [58].

PI3Kγ, the sole member of class IB, is activated by the direct binding of the catalytic and regulatory subunits of PI3Kγ to the βγ subunits of heterotrimeric G-proteins that could be potentiated by Ras-GTP. This distinctiveness confers to the protein an involvement downstream of GPCRs, such as chemokine receptors.

COLOUR

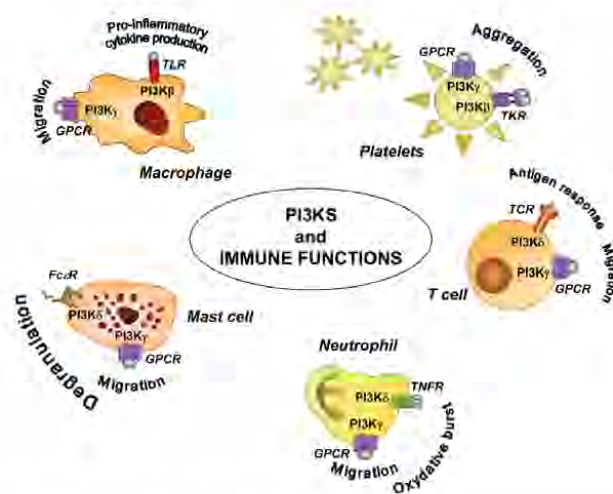


Figure 3 Major PI3K functions in immune cells involved in atherosclerosis

The PI3K γ isoform plays multiple functions in all haemopoietic cells involved in atherosclerosis, especially in the recruitment of immune cells, but it also has specific functions, such as in MC degranulation, platelet aggregation, the neutrophil oxidative burst and T-cell functions. The major effects of PI3K δ are found in MC and T-cell functions and, to a lesser extent, in the neutrophil oxidative burst. The PI3K β isoform plays a major role in platelet aggregation, but could also be involved in the negative regulation of inflammatory processes. Although the PI3K ϵ isoform is expressed ubiquitously, no immune function has been described for this isoform.

Class II PI3Ks contain a C2 domain, which gives their name (PI3K-C2) to the members of this class of PI3K, and a PX domain (Phox homology domain). This domain is able to bind the two lipid products of PI3K-C2 PtdIns(3)P and PtdIns(3,4)P₂ to localize these PI3K to the plasma membrane [60]. Class III PI3Ks contain a single member that is the homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Vps34 that generates only PtdIns(3)P [61].

The physiological function of individual isoforms of PI3K have been demonstrated by the generation of genetically modified mice. The ubiquitous pattern of expression of PI3K α or PI3K β leads to embryonic lethality of mice lacking catalytic subunits p110 α [62] or p110 β [63], demonstrating that both isoforms are necessary for development. By contrast, mice lacking p110 γ or p110 δ are viable and fertile with no apparent specific phenotype [64–67]. Indeed, these two isoforms are essentially expressed in the haemopoietic system and are restricted to more specialized functions. Thus PI3K γ and PI3K δ , positively involved in the control of inflammatory responses, represent interesting targets in pharmacology.

FUNCTIONS OF PI3K IN INFLAMMATION (Figure 3)

PI3K and inflammatory cell recruitment

Leucocytes accumulate at the site of inflammation by directional migration called chemotaxis generated by dif-

ferent types of molecules. Experiments of microinjection of specific antibodies directed against PI3K have demonstrated the involvement of the β and δ isoforms in migration induced by CSF [68]. *In vitro* experiments have also shown a role for PI3K δ in controlling the directional movement of neutrophils [69]. Nevertheless, *in vivo* experiments appear to indicate that PI3K γ is preferentially involved in leucocyte migration. In PI3K γ -deficient mice, recruitment of neutrophils and macrophages is reduced in a mouse model of peritonitis induced by bacterial injection [64]. Furthermore, a selective inhibitor directed against PI3K γ decreased neutrophil recruitment in a mouse model of peritoneal chemotaxis towards RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed and secreted) [70].

PI3K γ has also been shown at a lower level in ECs, where it plays an important role in supporting neutrophil interaction with the inflamed vessel wall. Using PI3K γ ^{-/-} (PI3K γ -deficient) mice reconstituted with wt (wild-type) neutrophils, Puri et al. [71] demonstrated a 45% reduction in the accumulation of neutrophils in an acute lung injury model. This appears to be due to a perturbation of selectin-mediated adhesion since, in PI3K γ ^{-/-} microvessels, wt neutrophil attachment was reduced by approx. 70% in response to TNF- α . This modification in adhesion was increased by a deficiency in p110 δ , suggesting that both PI3K class IA and PI3K class IB are required for efficient neutrophil recruitment by endothelium in response to cytokine stimulation [71].

PI3K activity is also involved in T-cell migration, but the isoform involved is still controversial. Indeed, *in vitro* studies have demonstrated that the migration of PI3K γ -deficient CD4⁺ and CD8⁺ T-cells to CCL19 and CXCL12, and to low doses of CCL21, was reduced by 30–65%, whereas p110 δ activity appeared to be dispensable [72,73].

In contrast, recent observations using multi-photon intravital microscopy revealed that a lack of PI3K γ had negligible effects on migration velocities, but resulted in increased turning angles of T-cells [74]. Moreover, systemic lupus induced by an enhanced activation of PI3K class IA in T-cells was ameliorated by PI3K γ -deficiency without any effects on T-cell invasion, suggesting that PI3K class IA, but not PI3K class IB, was involved in T-cell migration *in vivo* [75]. More recently, two groups have shown a role of p110 δ in T-cell trafficking [76,77]. Indeed, it has been proposed that PI3K δ activation mediates antigen-receptor-induced and cytokine-induced down-regulation of CD62L (L-selectin). This adhesion molecule regulates lymphocyte re-circulation. A kinase-inactive mutant of p110 δ and PI3K inhibitors prevented both the proteolytic cleavage pathway and transcriptional mechanisms that control CD62L expression in activated T-cells [76]. Moreover, Jarmin et al. [77] have shown that T-cells from mice expressing catalytically inactive p110 δ lost susceptibility to TCR-induced migration and failed to localize efficiently to antigenic tissues. These results indicate that p110 δ is involved in T-cell trafficking and that pharmacological inhibition of this kinase could decrease T-cell-mediated inflammation.

PI3K in T-cell function

In addition to its role in T-cell migration, PI3K has also been involved in lymphocyte function. Lymphocytes respond to antigen by a direct binding through BCRs and TCRs or by interaction with Fc region of immunoglobulins through the Fc receptor family. Class I PI3Ks could be activated by all of these receptors. In T-cells, activation of PI3K occurs after TCR cross-linking. This activity is enhanced by CD28 or IL-2 co-stimulation. However, the isoform involved in this process is controversial. Alcazar et al. [78] have demonstrated that, after TCR ligation, PI3K γ interacts with G α / q , tyrosine kinases and ζ -associated proteins to produce 3-phosphorylated polyphosphoinositides at the immunological synapse. On the contrary, using an imaging approach to visualize PI3K signalling in single T-cells, Garcon et al. [79] have shown that PI3K γ is not required for antigen-dependent PI3K activity and did not observe any defects in proliferation or cytokine secretion in p110 γ ^{-/-} CD4⁺ T-cells, as demonstrated by Sasaki et al. [59]. They showed that PI3K activity at the T-cell-antigen-presenting cell contact area was dependent on the p110 δ isoform. CD28 enhanced PtdIns(3,4,5)P₃ production at this site independently of its YNMN motif

required to interact with the p85/p110 heterodimer, suggesting that the heterodimer interacts with CD28 by another way. Nonetheless, PI3K δ and PI3K γ are involved together in thymocyte selection, where the combined activities of the two catalytic subunits were required for normal T-cell development [65,80].

PI3K and activation of microbicidal activity

After recruitment to the inflamed site, neutrophils and macrophages generate ROS by activation of NADPH oxidase [81]. These ROS are involved not only in the killing process combating bacterial and fungal infections directly through the damaging actions of oxygen radicals, but also through the activation of phagosomal proteases. The PI3K γ isoform plays an important role in this process, since the production of ROS induced by fMLP (*N*-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine) in primed neutrophils was dramatically reduced in the absence of PI3K γ [64–66]. The use of pharmacological inhibitors directed against different isoforms of PI3K has permitted the demonstration that ROS production is under the dependence of the sequential activation of different isoforms of PI3K. Stimulation of TNF- α -primed human neutrophils with fMLP results in the biphasic activation of PI3K. The first phase is strictly dependent on PI3K γ , whereas the second one, which is entirely dependent on the first, requires activation of PI3K δ and partially PI3K α and PI3K β [82].

Regulation of pro-inflammatory cytokine secretion by PI3K

Even if most of the events recruiting PI3K activity in immune cells are involved in pro-inflammatory process, in certain cases PI3K activity could regulate cytokine secretion to act as a limiting factor in inflammation. Upon bacterial infection, antigen-presenting cells, such as macrophages and dendritic cells, recognize PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) using cell-surface TLRs. The PI3K pathway has been shown to be activated by various TLR ligands and can function as a positive or negative regulator of TLR responses depending on the cell type and the TLR used [83]. In sepsis, one of the most potent inflammatory agents LPS, a component of Gram-negative bacteria membranes, induces the production of inflammatory mediators and cytokines, such as IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α , via the activation of TLR-4 and the transcription factors Egr-1, AP-1 (activator protein-1) and NF- κ B (nuclear factor κ B) [84]. TLR-4 triggering induces the concomitant activation of PI3K, which is able to negatively regulate the production of inflammatory mediators in dendritic cells and human monocytes [83,85,86]. This negative regulation of inflammatory processes by PI3K has also been observed in mouse resident peritoneal macrophages stimulated

with LPS. In this model, chronic administration of E2 (17 β -oestradiol) to ovariectomized mice increases the expression of IL1- β , IL-6 and IL-12p40 in resident peritoneal macrophages in response to LPS *ex vivo* by altering the TLR-4 pathway. E2 treatment results in the inhibition of PI3K activity in LPS-activated macrophages, whereas NF- κ B p65 transcriptional activity was concomitantly increased [87]. These results suggest that PI3K could modulate TLR signalling, having a role in the gate-keeping system to prevent excessive innate immune response. This function is probably mediated by a class IA PI3K as introduction of a vector producing short hairpin RNA targeting the p110 β catalytic subunit in the mouse macrophage cell line Raw264.7 also enhanced the TLR-mediated response [88].

Activation of MCs and eosinophils by PI3K

MCs and eosinophils are, in addition to neutrophils and macrophages, essential in fighting against infections and parasites and could participate in the development of inflammatory pathologies, such as atherosclerosis, by releasing histamine-containing granules and immune mediators. MCs are activated by cross-linking of the IgE-receptor-induced allergen-IgE complex. This event leads to the activation of tyrosine kinases that phosphorylate ITAMs as well as Gab2 [Grb2 (growth-factor-receptor-bound protein 2)-associated binder 2] [89], creating docking sites for class I PI3Ks. PtdIns(3,4,5) P_3 production in this context is necessary for Btk (Bruton tyrosine kinase) and PLC γ (phospholipase C γ) activation, causing the opening of Ca²⁺ channels and granule release [90,91]. It is now proposed that p110 δ and p110 γ could be recruited in this pathway. p110 δ could be recruited by the docking site mentioned above and could be responsible for a first wave of PtdIns(3,4,5) P_3 production [92], and p110 γ , recruited by an autocrine mechanism involving the secretion of GPCR agonists, such as adenosine, could be necessary to obtain a full response in MC degranulation [94]. Consistent with these findings, inhibition of PI3K δ [92,94] or PI3K γ [93,95] *in vivo* induces a decrease in the anaphylactic allergic response in mice; however, recent studies using PI3K γ - and PI3K δ -isoform-specific inhibitors, as well as PI3K γ - or PI3K δ -deficient mice, have shown that PI3K δ , but not PI3K γ , was involved in the allergen-induced allergic response *in vivo* [96]. One explanation for the discrepancies between the studies could be the differences in the sensitization protocol. Although Laffargue et al. [93] used intravenous IgE and antigen injection, Ali et al. [92] performed local intradermal administration of IgE and antigen. We suggest that the dose of antigen in tissue differs between the two protocols and that the high dose used in the intradermal protocol masks the potentiation of the response induced by GPCR agonists.

Moreover, PI3K γ activity appears to be responsible for the maintenance of eosinophilic inflammation *in vivo*

[97], reinforcing the central role of this isoform in allergic pathology.

Control of platelet function by PI3K

Platelets play critical roles in thrombosis by adhering to and aggregating at sites of vascular injury. These two mechanisms are controlled by intracellular pathways, with growing evidence suggesting a major role for PI3K in these processes. Although all PI3K isoforms are expressed in platelets, only the PI3K β and PI3K γ appear to play important roles in platelet activation. Indeed, p85-deficient mice, which have a large decrease in p110 α , p110 β and p110 δ expression levels [98–100], have no defects in platelet aggregation in response to soluble agonists, such as ADP, TXA₂ (thromboxane A₂), thrombin or vWF (von Willebrand factor), suggesting a compensation by PI3K γ [98]. Nevertheless, platelet aggregation was modified in response to collagen, suggesting a role of class IA PI3Ks in GPVI (glycoprotein VI) signalling [98]. Consistent with these findings, p110 δ -deficient platelets had only a slight decrease in platelet aggregation in response to low concentration of CRP (C-reactive protein), without any modification in response to the other classical stimuli [101].

The absence of a model with a specific deletion of p110 α or p110 β in a megakaryocyte lineage does not allow the role played by these two isoforms in platelet function to be dissected. To investigate the role of PI3K β , Jackson et al. [102] used a specific p110 β inhibitor and demonstrated that this activity was necessary to sustain integrin α IIb β 3 activation and aggregation upon ADP stimulation and in response to low levels of other soluble agonists. Moreover, the PI3K β inhibitor prevented the formation of stable integrin adhesion contacts, leading to defective platelet thrombus formation. Interestingly, PI3K γ -deficient mice have a defect in platelet aggregation in response to ADP and to threshold concentrations of collagen [103,104]. Studies of the molecular mechanisms showed a decrease in PKB (protein kinase B)/Akt phosphorylation and α IIb β 3 fibrinogen receptor activation in the absence of PI3K γ downstream of P2Y₁₂ receptor activation. These events did not modify bleeding time, but protected mice against thromboembolism induced by ADP. These studies suggest a role for multiple PI3Ks in this pathway and place PI3K β and PI3K γ as potential pharmacological targets in antithrombotic therapy.

TARGETING A PI3K ISOFORM IN ATHEROSCLEROSIS?

Many drugs used in cardiovascular therapy have anti-inflammatory properties in addition to their targeting actions on modifying risk factors, such as hypertension and hyperlipidaemia [105]. Among them, ACEIs (angiotensin-converting enzyme inhibitors), ARBs (angiotensin

II type 1 receptor blockers), calcium channel blockers, the antiplatelet agent clopidogrel, and PPAR (peroxisome-proliferator-activated receptor)- α and PPAR- γ activators appear to be involved in inflammatory pathways, but the clinical benefits of these effects remain unclear in cardiovascular diseases. In the same manner, atheroprotective action of statins, mainly used for their cholesterol-lowering effect, could also be attributed to their anti-inflammatory properties [106–109].

At the present time, great efforts are engaged in identifying novel and innovative drugs targeting inflammatory proteins for the treatment of atherosclerosis. Potential inflammatory targets are factors involved in the recruitment of leucocytes, including P-selectin, E-selectin, L-selectin, adhesion molecules, NF- κ B, leucocyte integrins, cytokines (IL-1, IL-2, IL-6 and IL-18), and chemokines [MCP-1, RANTES, MIF (macrophage migration inhibitory factor), SDF-1 (stromal-derived factor-1)] and their receptors. Coagulation, fibrinolytic and complement activation cascades constitute other pro-inflammatory mediators that could be targeted for treating atherosclerosis. Other potentially interesting targets include the CB₂ (cannabinoid 2) receptor that is expressed on macrophages and T-cells within atherosclerotic lesions. Treatment with a CB₂ receptor agonist blocks atherosclerosis progression, probably by inhibiting the Th1 response and macrophage chemotaxis [110]. Interestingly, most of the PI3K isoforms are involved in these inflammatory processes.

Several pharmaceutical companies have developed PI3K inhibitors. Since the early 1990s, two pan-PI3K inhibitors, wortmannin and LY294002, have been largely used in many studies to analyse PI3K function. Wortmannin is a fungal metabolite initially isolated from *Penicillium wortmanni* [111] which inhibits all PI3Ks at nanomolar concentrations. By contrast, LY294002 is a synthetic compound [112] active at micromolar levels. These two compounds do not allow the discrimination between different PI3K classes, but have been useful tools to aid research and development of a new generation of compounds. Thus a panel of isoform-specific PI3K inhibitors has started to appear, and their structures have been recently reviewed by Marone et al. [113]. A series of compounds (AS-252424, AS-605240 and AS-604850) produced by Merck-Serono have been described that selectively inhibit PI3K γ [114–117].

Initial studies have proposed that PI3K γ -selective inhibitors possess immunomodulatory potentials, suggesting that PI3K γ is a good candidate for drug development in chronic inflammation and autoimmune diseases [116]. In mouse models of rheumatoid arthritis, oral administration of selective PI3K γ inhibitors successfully prevented the progression of joint inflammation and neutrophil accumulation [114]. Moreover, it has been demonstrated that intraperitoneal administration of a PI3K γ inhibitor in a mouse model of systemic lupus

erythematosus led to a reduction in pathogenic CD4⁺ memory cells, resulting in a blockade of glomerulonephritis and extended lifespan [115].

Recently, the role of PI3K γ in atherosclerosis development has been demonstrated *in vivo* in mice by using different approaches [118,119]. Intraperitoneal administration of a specific PI3K γ inhibitor (AS-605240; 10 mg/kg of body weight daily) significantly decreased early atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice, as well as more advanced plaques in LDLR^{-/-} mice fed a hypercholesterolaemic diet [119]. These results are in accordance with those reported by Chang et al. [118] showing that PI3K γ ^{-/-}/ApoE^{-/-} double-knockout mice have decreased lesion size compared with PI3K γ ^{+/+}/ApoE^{-/-}. PI3K γ expression and activity are elevated in both human and mouse atherosclerotic lesions, especially in macrophage- and T-cell-rich regions. Moreover, deletion of the p110 γ gene abrogates all detectable PKB/Akt activation as well as the PI3K-dependent phosphorylation of the downstream effector molecules FKHR [forkhead homologue in rhabdosarcoma; a member of the FOXO (forkhead box O) family of transcription factors], AFX (another member of the FOXO family of transcription factors), GSK3 (glycogen synthase kinase 3), p70 S6 kinase, S6 ribosomal protein and PKC θ (protein kinase C θ) in atherosclerotic plaque macrophage/foam cells from ApoE^{-/-} mice [118]. The involvement of PI3K γ in inflammatory processes of atherogenesis has been demonstrated in chimaeric mice lacking PI3K γ exclusively in immune cells with a decrease in the size of lesions (approx. 50%) [119]. Analysis of plaque cellular composition showed that the absence of immune cell PI3K γ reduces macrophage (30%) and T-cell (50%) infiltration within atherosclerotic lesions as well as an increase in SMC and collagen content, suggesting a beneficial effect on plaque stability [119]. Taken together, these results clearly demonstrate that PI3K γ has the potential to modulate inflammatory processes in the vascular wall responsible for multiple stages of atherosclerosis, such as fatty streak formation and plaque stability. The relative contribution of PI3K γ from different immune cells could be interesting to dissect. The importance of PI3K γ in T-cells and in eosinophils/MCs and the essential role of these two cell types in the initiation and progression of the pathology has led us to speculate that PI3K γ from these two cell types is essential in atherosclerosis.

In addition to its immune functions, PI3K γ has important functions in cardiovascular system. Previous studies have demonstrated low levels of PI3K γ in SMCs and in cardiomyocytes, where it controls vascular smooth muscle tone [120] and cardiac cell contractility [121,122]. Moreover, TargeGen has designed a new interesting compound, named TG100-115, able to inhibit both PI3K γ and PI3K δ . Studies using this inhibitor have demonstrated that PI3K γ and PI3K δ regulated infarct size after ischaemia/reperfusion injury [123]. TG100-115 has

entered clinical trials (phases I and II) for acute myocardial infarction [124]. Other PI3K inhibitors targeting all class I PI3K isoforms are entering phase I/II trials in cancer treatment (reviewed in [113]), but their potential side effects, especially on metabolism, could be a trade-off for their efficacy in the treatment of cardiovascular diseases.

CONCLUSIONS

Current therapies used in cardiovascular diseases target inflammation as secondary part of their action. Advances in our understanding of the involvement of PI3K, in particular PI3K γ , in inflammation have led to a much interest in the development of specific inhibitors of each class I PI3K isoform. The next decade will see trials of agents that specifically target inflammation in the treatment of atherosclerosis. Inhibitors of specific class I PI3K isoforms could be one of these potential anti-inflammatory drugs useful not only in the treatment of atherosclerosis, but also in other chronic inflammatory diseases.

FUNDINGS

The authors' work is supported by Fondation de France [grants numbers 2004004845, 2007001907]. A.F. is supported by Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

- Ross, R. (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu. Rev. Physiol.* **57**, 791–804
- Ross, R. (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115–126
- Libby, P. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature* **420**, 868–874
- Hansson, G. K., Libby, P., Schönbeck, U. and Yan, Z. Q. (2002) Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ. Res.* **91**, 281–291
- Sun, J., Sukhova, G. K., Wolters, P. J., Yang, M., Kitamoto, S., Libby, P., MacFarlane, L. A., Mallen-St Clair, J. and Shi, G. P. (2007) Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat. Med.* **13**, 719–724
- Napoli, C., de Nigris, F. and Palinski, W. (2001) Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J. Cell. Biochem.* **82**, 674–682
- van Leeuwen, M., Gijbels, M. J., Duijvestijn, A., Smook, M., van de Gaar, M. J., Heeringa, P., de Winther, M. P. and Tervaert, J. W. (2008) Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 84–89
- Zernecke, A., Bot, I., Djalali-Talab, Y., Shagdarsuren, E., Bidzhekov, K., Meiler, S., Krohn, R., Schober, A., Sperandio, M., Soehnlein, O. et al. (2008) Protective role of CXCR4/CXCR4 ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis. *Circ. Res.* **102**, 209–217
- Jawien, J., Nastalek, P. and Korbut, R. (2004) Mouse models of experimental atherosclerosis. *J. Physiol. Pharmacol.* **55**, 503–517
- Zadelaar, S., Kleemann, R., Verschuren, L., de Vries-Van der Weij, J., van der Hoorn, J., Princen, H. M. and Kooistra, T. (2007) Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 1706–1721
- Gu, L., Okada, Y., Clinton, S. K., Gerard, C., Sukhova, G. K., Libby, P. and Rollins, B. J. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol. Cell* **2**, 275–281
- Boring, L., Gosling, J., Cleary, M. and Charo, I. F. (1998) Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **394**, 894–897
- Glass, C. K. and Witztum, J. L. (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* **104**, 503–516
- Smith, J. D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J. and Miyata, M. (1995) Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 8264–8268
- Song, L., Leung, C. and Schindler, C. (2001) Lymphocytes are important in early atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* **108**, 251–259
- Zhou, X., Nicoletti, A., Elhage, R. and Hansson, G. K. (2000) Transfer of CD4⁺ T cells aggravates atherosclerosis in immunodeficient apolipoprotein E knockout mice. *Circulation* **102**, 2919–2922
- Frostegard, J., Ulfgren, A. K., Nyberg, P., Hedin, U., Swedenborg, J., Andersson, U. and Hansson, G. K. (1999) Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis* **145**, 33–43
- Hansson, G. K. and Libby, P. (2006) The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 508–519
- Gupta, S., Pablo, A. M., Jiang, X., Wang, N., Tall, A. R. and Schindler, C. (1997) IFN- γ potentiates atherosclerosis in ApoE knock-out mice. *J. Clin. Invest.* **99**, 2752–2761
- Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M. F., Soubrier, E., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C. et al. (1999) Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ. Res.* **85**, e17–e24
- Pinderski Oslund, L. J., Hedrick, C. C., Olvera, T., Hagenbaugh, A., Territo, M., Berliner, J. A. and Fyfe, A. I. (1999) Interleukin-10 blocks atherosclerotic events *in vitro* and *in vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**, 2847–2853
- Daugherty, A. and Rateri, D. L. (2002) T lymphocytes in atherosclerosis: the yin-yang of Th1 and Th2 influence on lesion formation. *Circ. Res.* **90**, 1039–1040
- Couper, K. N., Blount, D. G. and Riley, E. M. (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J. Immunol.* **180**, 5771–5777
- Mallat, Z., Ait-Oufella, H. and Tedgui, A. (2007) Regulatory T-cell immunity in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc. Med.* **17**, 113–118
- Ait-Oufella, H., Salomon, B. L., Poteaux, S., Robertson, A. K., Gourdy, P., Zoll, J., Merval, R., Esposito, B., Cohen, J. L., Fisson, S. et al. (2006) Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice. *Nat. Med.* **12**, 178–180
- Kovanen, P. T. (2007) Mast cells: multipotent local effector cells in atherothrombosis. *Immunol. Rev.* **217**, 105–122
- Haley, K. J., Lilly, C. M., Yang, J. H., Feng, Y., Kennedy, S. P., Turi, T. G., Thompson, J. E., Sukhova, G. H., Libby, P. and Lee, R. T. (2000) Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation. *Circulation* **102**, 2185–2189
- Kokkonen, J. O. (1989) Stimulation of rat peritoneal mast cells enhances uptake of low density lipoproteins by rat peritoneal macrophages *in vivo*. *Atherosclerosis* **79**, 213–223
- Boyle, J. J., Bowyer, D. E., Weissberg, P. L. and Bennett, M. R. (2001) Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-ligand/Fas interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1402–1407

- 30 Kolodgie, F. D., Narula, J., Burke, A. P., Haider, N., Farb, A., Hui-Liang, Y., Smialek, J. and Virmani, R. (2000) Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am. J. Pathol.* **157**, 1259–1268
- 31 Lee, E., Grodzinsky, A. J., Libby, P., Clinton, S. K., Lark, M. W. and Lee, R. T. (1995) Human vascular smooth muscle cell-monocyte interactions and metalloproteinase secretion in culture. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **12**, 2284–2289
- 32 Galis, Z. S., Muszynski, M., Sukhova, G. K., Simon-Morrissey, E., Unemori, E. N., Lark, M. W., Amento, E. and Libby, P. (1994) Cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ. Res.* **75**, 181–189
- 33 Geng, Y. J., Wu, Q., Muszynski, M., Hansson, G. K. and Libby, P. (1996) Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by *in vitro* stimulation with interferon- γ , tumor necrosis factor- α , and interleukin-1 β . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 19–27
- 34 Kovanen, P. T., Kaartinen, M. and Paavonen, T. (1995) Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atherosclerotic erosion or rupture in myocardial infarction. *Circulation* **92**, 1084–1088
- 35 Lindstedt, K. A. and Kovanen, P. T. (2004) Mast cells in vulnerable coronary plaques: potential mechanisms linking mast cell activation to plaque erosion and rupture. *Curr. Opin. Lipidol.* **15**, 567–573
- 36 Saارينen, J., Kalkkinen, N., Welgus, H. G. and Kovanen, P. T. (1994) Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *J. Biol. Chem.* **269**, 18134–18140
- 37 Gruber, B. L., Marchese, M. J., Suzuki, K., Schwartz, L. B., Okada, Y., Nagase, H. and Ramamurthy, N. S. (1989) Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J. Clin. Invest.* **84**, 1657–1662
- 38 Wang, Y., Shiota, N., Leskinen, M. J., Lindstedt, K. A. and Kovanen, P. T. (2001) Mast cell chymase inhibits smooth muscle cell growth and collagen expression *in vitro*: transforming growth factor- β 1-dependent and -independent effects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **21**, 1928–1933
- 39 Leskinen, M. J., Kovanen, P. T. and Lindstedt, K. A. (2003) Regulation of smooth muscle cell growth, function and death in vitro by activated mast cells: a potential mechanism for the weakening and rupture of atherosclerotic plaques. *Biochem. Pharmacol.* **66**, 1493–1498
- 40 Naruko, T., Ueda, M., Haze, K., van der Wal, A. C., van der Loos, C. M., Itoh, A., Komatsu, R., Ikura, Y., Ogami, M., Shimada, Y. et al. (2002) Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* **106**, 2894–2900
- 41 van der Wal, A. C., Becker, A. E., van der Loos, C. M. and Das, P. K. (1994) Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* **89**, 36–44
- 42 Croce, K. and Libby, P. (2007) Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr. Opin. Hematol.* **14**, 55–61
- 43 Wymann, M. P. and Pirola, L. (1998) Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochem. Biophys. Acta* **1436**, 127–150
- 44 Vanhaesebroeck, B., Leeyers, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J. and Waterfield, M. D. (2001) Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 535–602
- 45 Suire, S., Coadwell, J., Ferguson, G. J., Davidson, K., Hawkins, P. and Stephens, L. (2005) p84, a new G $\beta\gamma$ -activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110 γ . *Curr. Biol.* **15**, 566–570
- 46 Voigt, P., Dörner, M. B. and Schaefer, M. (2006) Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase γ that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J. Biol. Chem.* **281**, 9977–9986
- 47 Yart, A., Laffargue, M., Mayeux, P., Chretien, S., Peres, C., Tonks, N., Roche, S., Payrastrre, B., Chap, H. and Raynal, P. (2001) A critical role for phosphoinositide 3-kinase upstream of Gab1 and SHP2 in the activation of ras and mitogen-activated protein kinases by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 8856–8864
- 48 Kazlauskas, A. and Cooper, J. A. (1990) Phosphorylation of the PDGF receptor β subunit creates a tight binding site for phosphatidylinositol 3-kinase. *EMBO J.* **9**, 3279–3286
- 49 Kanda, S., Hodgkin, M. N., Woodfield, R. J., Wakelam, M. J., Thomas, G. and Claesson-Welsh, L. (1997) Phosphatidylinositol 3'-kinase-independent p70 S6 kinase activation by fibroblast growth factor receptor-1 is important for proliferation but not differentiation of endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 23347–23353
- 50 Campbell, G. S. (1997) Growth-hormone signal transduction. *J. Pediatr.* **131**, S42–S44
- 51 Argetsinger, L. S., Hsu, G. W., Myers, Jr, M. G., Billestrup, N., White, M. F. and Carter-Su, C. (1995) Growth hormone, interferon- γ , and leukemia inhibitory factor promoted tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *J. Biol. Chem.* **270**, 14685–14692
- 52 Yamamoto, K., Lapetina, E. G. and Moxham, C. P. (1992) Association of phosphorylated insulin-like growth factor-I receptor with the SH2 domains of phosphatidylinositol 3-kinase p85. *J. Biol. Chem.* **267**, 11337–11343
- 53 Backer, J. M., Myers, Jr, M. G., Shoelson, S. E., Chin, D. J., Sun, X. J., Miralpeix, M., Hu, P., Margolis, B., Skolnik, E. Y., Schlessinger, J. and White, M. F. (1992) Phosphatidylinositol 3'-kinase is activated by association with IRS-1 during insulin stimulation. *EMBO J.* **11**, 3469–3479
- 54 Wymann, M. P., Zvelebil, M. and Laffargue, M. (2003) Phosphoinositide 3-kinase signalling: which way to target? *Trends Pharmacol. Sci.* **24**, 366–376
- 55 Chen, K. Q., Iribarren, P., Gong, W. H. and Wang, J. M. (2005) The Essential role of phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) in regulating pro-inflammatory responses and the progression of cancer. *Cell. Mol. Immunol.* **2**, 241–252
- 56 Fruman, D. A. (2004) Phosphoinositide 3-kinase and its targets in B-cell and T-cell signaling. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 314–320
- 57 Guillermet-Guibert, J., Björklof, K., Salpekar, A., Gonella, C., Ramadani, F., Bilancio, A., Meek, S., Smith, A. J., Okkenhaug, K. and Vanhaesebroeck, B. (2008) The p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 γ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 8292–8297
- 58 Ciraolo, E., Iezzi, M., Marone, R., Marengo, S., Curcio, C., Costa, C., Azzolino, O., Gonella, C., Rubinetto, C., Wu, H. et al. (2008) Phosphoinositide 3-kinase p110 β activity: key role in metabolism and mammary gland cancer but not development. *Sci. Signal.* **1**, ra3
- 59 Jia, S., Liu, Z., Zhang, S., Liu, P., Zhang, L., Lee, S. H., Zhang, J., Signoretti, S., Loda, M., Roberts, T. M. and Zhao, J. J. (2008) Essential roles of PI3K-p110 β in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature* **454**, 776–779
- 60 Maffucci, T. and Falasca, M. (2007) Phosphoinositide 3-kinase-dependent regulation of phospholipase C γ . *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 229–230
- 61 Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D. and Emr, S. D. (1993) Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting. *Science* **260**, 88–91
- 62 Bi, L., Okabe, I., Bernard, D. J., Wynshaw-Boris, A. and Nussbaum, R. L. (1999) Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 10963–10968

- 63 Bi, L., Okabe, I., Bernard, D. J. and Nussbaum, R. L. (2002) Early embryonic lethality in mice deficient in the p110 β catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mamm. Genome* **13**, 169–172
- 64 Hirsch, E., Katanaev, V. L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F. and Wymann, M. P. (2000) Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase γ in inflammation. *Science* **287**, 1049–1053
- 65 Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Jones, R. G., Oliveira-dos-Santos, A. J., Stanford, W. L., Bolon, B., Wakeham, A., Itie, A., Bouchard, D., Kozieradzki, I. et al. (2000) Function of PI3K γ in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science* **287**, 1040–1046
- 66 Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A. V. and Wu, D. (2000) Roles of PLC- β 2 and - β 3 and PI3K γ in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* **287**, 1046–1049
- 67 Okkenhaug, K., Bilancio, A. and Farjot, G. (2002) Impaired B and T cell antigen receptor signaling in p110 δ PI 3-kinase mutant mice. *Science* **297**, 1031–1034
- 68 Vanhaesebroeck, B., Jones, G. E., Allen, W. E., Zicha, D., Hooshmand-Rad, R., Sawyer, C., Wells, C., Waterfield, M. D. and Ridley, A. J. (1999) Distinct PI3Ks mediate mitogenic signalling and cell migration in macrophages. *Nat. Cell Biol.* **1**, 69–71
- 69 Sadhu, C., Masinovskiy, B., Dick, K., Sowell, C. G. and and Staunton, D. E. (2003) Essential role of phosphoinositide 3-kinase δ in neutrophil directional movement. *J. Immunol.* **170**, 2647–2654
- 70 Ferrandi, C., Ardisson, V., Ferro, P., Rückle, T., Zaratini, P., Ammannati, E., Hauben, E., Rommel, C. and Cirillo, R. (2007) Phosphoinositide 3-kinase γ inhibition plays a crucial role in early steps of inflammation by blocking neutrophil recruitment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **322**, 923–930
- 71 Puri, K. D., Doggett, T. A., Huang, C. Y., Douangpanya, J., Hayflick, J. S., Turner, M., Penninger, J. and Diacovo, T. G. (2005) The role of endothelial PI3K γ activity in neutrophil trafficking. *Blood* **106**, 150–157
- 72 Nombela-Arrieta, C., Lacalle, R. A., Montoya, M. C., Kunisaki, Y., Megias, D., Marqués, M., Carrera, A. C., Mañes, S., Fukui, Y., Martínez-A, C. and Stein, J. V. (2004) Differential requirements for DOCK2 and phosphoinositide-3-kinase γ during T and B lymphocyte homing. *Immunity* **21**, 429–441
- 73 Reif, K., Okkenhaug, K., Sasaki, T., Penninger, J. M., Vanhaesebroeck, B. and Cyster, J. G. (2004) Cutting edge: differential roles for phosphoinositide 3-kinases, p110 γ and p110 δ , in lymphocyte chemotaxis and homing. *J. Immunol.* **173**, 2236–2240
- 74 Nombela-Arrieta, C., Mempel, T. R., Soriano, S. F., Mazo, I., Wymann, M. P., Hirsch, E., Martínez-A, C., Fukui, Y., von Andrian, U. H. and Stein, J. V. (2007) A central role for DOCK2 during interstitial lymphocyte motility and sphingosine-1-phosphate-mediated egress. *J. Exp. Med.* **204**, 497–510
- 75 Barber, D. F., Bartolomé, A., Hernandez, C., Flores, J. M., Fernandez-Arias, C., Rodríguez-Borlado, L., Hirsch, E., Wymann, M., Balomenos, D. and Carrera, A. C. (2006) Class IB-phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) deficiency ameliorates IA-PI3K-induced systemic lupus but not T cell invasion. *J. Immunol.* **176**, 589–593
- 76 Sinclair, L. V., Finlay, D., Feijoo, C., Cornish, G. H., Gray, A., Ager, A., Okkenhaug, K., Hagenbeek, T. J., Spits, H. and Cantrell, D. A. (2008) Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nat. Immunol.* **9**, 513–521
- 77 Jarmin, S. J., David, R., Ma, L., Chai, J. G., Dewchand, H., Takesono, A., Ridley, A. J., Okkenhaug, K. and Marelli-Berg, F. M. (2008) T cell receptor-induced phosphoinositide-3-kinase p110 δ activity is required for T cell localization to antigenic tissue in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 1154–1164
- 78 Alcázar, I., Marqués, M., Kumar, A., Hirsch, E., Wymann, M., Carrera, A. C. and Barber, D. F. (2007) Phosphoinositide 3-kinase γ participates in T cell receptor-induced T cell activation. *J. Exp. Med.* **204**, 2977–2987
- 79 Garçon, F., Patton, D. T., Emery, J. L., Hirsch, E., Rottapel, R., Sasaki, T. and Okkenhaug, K. (2008) CD28 provides T-cell costimulation and enhances PI3K activity at the immune synapse independently of its capacity to interact with the p85/p110 heterodimer. *Blood* **111**, 1464–1471
- 80 Webb, L. M., Vigorito, E., Wymann, M. P., Hirsch, E. and Turner, M. (2005) T cell development requires the combined activities of the p110 γ and p110 δ catalytic isoforms of phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Immunol.* **175**, 2783–2787
- 81 Decoursey, T. E. and Ligeti, E. (2005) Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2173–2193
- 82 Condliffe, A. M., Davidson, K., Anderson, K. E., Ellson, C. D., Crabbe, T., Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B., Turner, M., Webb, L., Wymann, M. P. et al. (2005) Sequential activation of class IB and class IA PI3K is important for the primed respiratory burst of human but not murine neutrophils. *Blood* **106**, 1432–1440
- 83 Fukao, T., Tanabe, M., Terachi, Y., Ota, T., Matsuda, S., Asano, T., Kadowaki, T., Takeuchi, T. and Koyasu, S. (2002) PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. *Nat. Immunol.* **3**, 875–881
- 84 Akira, S. and Takeda, K. (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 499–511
- 85 Fukao, T. and Koyasu, S. (2003) PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol.* **24**, 358–363
- 86 Guha, M. and Mackman, N. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 32124–32132
- 87 Calippe, B., Douin-Echinard, V., Laffargue, M., Laurell, H., Rana-Poussine, V., Pipy, B., Guéry, J. C., Bayard, F., Arnal, J. F. and Gourdy, P. (2008) Chronic estradiol administration *in vivo* promotes the proinflammatory response of macrophages to TLR4 activation: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Immunol.* **180**, 7980–7988
- 88 Hazeki, K., Kinoshita, S., Matsumura, T., Nigorikawa, K., Kubo, H. and Hazeki, O. (2006) Opposite effects of wortmannin and 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride on toll-like receptor-mediated nitric oxide production: negative regulation of nuclear factor- κ B by phosphoinositide 3-kinase. *Mol. Pharmacol.* **69**, 1717–1724
- 89 Gu, H., Saito, K., Klamann, L. D., Shen, J., Fleming, T., Wang, Y., Pratt, J. C., Lin, G., Lim, B., Kinet, J. P. and Neel, B. G. (2001) Essential role for Gab2 in the allergic response. *Nature* **412**, 186–190
- 90 Luskova, P. and Draber, P. (2004) Modulation of the Fc ϵ receptor I signaling by tyrosine kinase inhibitors: search for therapeutic targets of inflammatory and allergy diseases. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1727–1737
- 91 Kraft, S. and Kinet, J. P. (2007) New developments in Fc ϵ RI regulation, function and inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 365–378
- 92 Ali, K., Bilancio, A., Thomas, M., Pearce, W., Gilfillan, A. M., Tkaczyk, C., Kuehn, N., Gray, A., Giddings, J., Peskett, E. et al. (2004) Essential role for the p110 δ phosphoinositide 3-kinase in the allergic response. *Nature* **431**, 1007–1011
- 93 Laffargue, M., Calvez, R., Finan, P., Trifilieff, A., Barbier, M., Altruda, F., Hirsch, E. and Wymann, M. P. (2002) Phosphoinositide 3-kinase γ is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity* **16**, 441–451
- 94 Lee, K. S., Lee, H. K., Hayflick, J. S., Lee, Y. C. and Puri, K. D. (2006) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase δ attenuates allergic airway inflammation and hyperresponsiveness in murine asthma model. *FASEB J.* **20**, 455–465

- 95 Wymann, M. P., Björklöf, K., Calvez, R., Finau, E., Thomast, M., Trifilieff, A., Barbier, M., Altruda, E., Hirsch, E. and Laffargue, M. (2003) Phosphoinositide 3-kinase γ : a key modulator in inflammation and allergy. *Biochem. Soc. Trans.* **31**, 275–280.
- 96 Ali, K., Camps, M., Pearce, W. P., Ji, H., Rückle, T., Kuehn, N., Pasquali, C., Chabert, C., Rommel, C. and Vanhaesebroeck, B. (2008) Isoform-specific functions of phosphoinositide 3-kinases: p110 δ but not p110 γ promotes optimal allergic responses *in vivo*. *J. Immunol.* **180**, 2538–2544.
- 97 Pinho, V., Souza, D. G., Barsante, M. M., Hamer, F. P., De Freitas, M. S., Rossi, A. G. and Teixeira, M. M. (2005) Phosphoinositide-3 kinases critically regulate the recruitment and survival of eosinophils *in vivo*: importance for the resolution of allergic inflammation. *J. Leukocyte Biol.* **77**, 800–810.
- 98 Watanabe, N., Nakajima, H., Suzuki, H., Oda, A., Matsubara, Y., Moroi, M., Terauchi, Y., Kadowaki, T., Suzuki, H., Koyasu, S. et al. (2003) Functional phenotype of phosphoinositide 3-kinase p85 α -null platelets characterized by an impaired response to GPVI stimulation. *Blood* **102**, 541–548.
- 99 Terauchi, Y., Tsuji, Y., Satoh, S., Mizoura, H., Murakami, K., Okuno, A., Inukai, K., Asano, T., Kaburagi, Y., Ueki, K. et al. (1999) Increased insulin sensitivity and hypoglycaemia in mice lacking the p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Nat. Genet.* **21**, 230–235.
- 100 Suzuki, H., Terauchi, Y., Fujiwara, M., Aizawa, S., Yazaki, Y., Kadowaki, T. and Koyasu, S. (1999) Xid-like immunodeficiency in mice with disruption of the p85 α subunit of phosphoinositide 3-kinase. *Science* **283**, 390–392.
- 101 Senis, Y. A., Atkinson, B. T., Pearce, A. C., Wonerow, P., Auger, J. M., Okkenhaug, K., Pearce, W., Vigorito, E., Vanhaesebroeck, B., Turner, M. and Watson, S. P. (2005) Role of the p110 β PI 3-kinase in integrin and ITAM receptor signalling in platelets. *Platelets* **16**, 191–202.
- 102 Jackson, S. P., Schoenwaelder, S. M., Goncalves, L., Nesbitt, W. S., Yap, C. L., Wright, C. E., Kenche, V., Anderson, K. E., Dopheide, S. M., Yuan, Y. et al. (2005) PI 3-kinase p110 β : a new target for antithrombotic therapy. *Nat. Med.* **11**, 507–514.
- 103 Hirsch, E., Bosco, O., Tropel, P., Laffargue, M., Calvez, R., Altruda, E., Wymann, M. and Montrucchio, G. (2001) Resistance to thromboembolism in PI3K γ -deficient mice. *FASEB J.* **15**, 2019–2021.
- 104 Lian, L., Wang, Y., Draznin, J., Eskin, D., Bennett, J. S., Poncz, M., Wu, D. and Abrams, C. S. (2005) The relative role of PLC β and PI3K γ in platelet activation. *Blood* **106**, 110–117.
- 105 Moubayed, S. P., Heinonen, T. M. and Tardif, J. C. (2007) Anti-inflammatory drugs and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* **18**, 638–644.
- 106 Nissen, S. E., Tuzcu, E. M., Schoenhagen, P., Crowe, T., Sasiela, W. J., Tsai, J., Orszulak, J., Magorien, R. D., O'Shaughnessy, C. and Ganz, P. (2005) Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* **352**, 29–38.
- 107 Ridker, P. M., Cannon, C. P., Morrow, D., Rifai, N., Rose, L. M., McCabe, C. H., Pfeffer, M. A. and Braunwald, E. (2005) C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. *N. Engl. J. Med.* **352**, 20–28.
- 108 Mach, F. (2004) Statins as immunomodulatory agents. *Circulation* **109**, 15–17.
- 109 Schramm, R., Menger, M. D., Harder, Y., Schmits, R., Adam, O., Weitz, Schmidt, G. and Schäfers, H. J. (2007) Statins inhibit lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *Immunology* **120**, 315–324.
- 110 Steffens, S., Veillard, N. R., Arnaud, C., Pelli, G., Burger, F., Staub, C., Karsak, M., Zimmer, A., Frossard, J. L. and Mach, F. (2005) Low dose oral cannabinoid therapy reduces progression of atherosclerosis in mice. *Nature* **434**, 782–786.
- 111 Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M. M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W. F., Dodge, J., Grindey, G. and Vlahos, C. J. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res.* **54**, 2419–2423.
- 112 Vlahos, C. J., Matter, W. F., Huu, K. Y. and Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* **269**, 5241–5248.
- 113 Marone, R., Cmiljanovic, V., Giese, B. and Wymann, M. P. (2008) Targeting phosphoinositide 3-kinase: moving towards therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**, 159–185.
- 114 Camps, M., Rückle, T., Ji, H., Ardisson, V., Rintelen, E., Shaw, J., Ferrandi, C., Chabert, C., Gillieron, C., Françon, B. et al. (2005) Blockade of PI3K γ suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* **9**, 936–943.
- 115 Barber, D. E., Bartolomé, A., Hernández, C., Flores, J. M., Redondo, C., Fernández-Arias, C., Camps, M., Rückle, T., Schwarz, M. K., Rodríguez, S. et al. (2005) PI3K γ inhibition blocks glomerulonephritis and extends lifespan in a mouse model of systemic lupus. *Nat. Med.* **9**, 933–935.
- 116 Rückle, T., Schwarz, M. K. and Rommel, C. (2006) PI3K γ inhibition: towards an aspirin of the 21st century? *Nat. Rev. Drug Discovery* **5**, 903–918.
- 117 Pomel, V., Klicic, J., Govini, D., Church, D. D., Shaw, J. P., Roulin, K., Burgar-Charvillat, E., Valognes, D., Camps, M., Chabert, C. et al. (2006) Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent, and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase γ . *J. Med. Chem.* **49**, 3857–3871.
- 118 Chang, J. D., Sukhova, G. K., Libby, P., Schwartz, E., Lichtenstein, A. H., Field, S. J., Kennedy, C., Madhavarapu, S., Luo, J., Wu, D. and Candeo, L. C. (2007) Deletion of the phosphoinositide 3-kinase p110 γ gene attenuates murine atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 8077–8082.
- 119 Fougerat, A., Gayral, S., Gourdy, P., Schambourg, A., Rückle, T., Schwarz, M. K., Rommel, C., Hirsch, E., Arnal, J. F., Salles, J. P. et al. (2008) Genetic and pharmacological targeting of phosphoinositide 3-kinase γ reduces atherosclerosis and favors plaque stability by modulating inflammatory processes. *Circulation* **117**, 1310–1317.
- 120 Vecchione, C., Patrucco, E., Marino, G., Barberis, L., Poulet, R., Aretini, A., Maffei, A., Gentile, M. T., Storto, M., Azzolino, O. et al. (2005) Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3K γ . *J. Exp. Med.* **201**, 1217–1228.
- 121 Crackower, M. A., Oudit, G. Y., Kozieradzki, I., Sarao, R., Sun, H., Sasaki, T., Hirsch, E., Suzuki, A., Shioi, T., Irie-Sasaki, J. et al. (2002) Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K/PITEN signaling pathways. *Cell* **110**, 737–749.
- 122 Patrucco, E., Notte, A., Barberis, L., Selvetella, G., Maffei, A., Brancaccio, M., Marengo, S., Russo, G., Azzolino, O., Rybalkin, S. D. et al. (2004) PI3K γ modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell* **118**, 375–387.
- 123 Doukas, J., Wrasidlo, W., Noronha, G., Dneprovskaia, I., Fine, R., Weis, S., Hood, J., Demaria, A., Soll, R. and Cheresch, D. (2006) Phosphoinositide 3-kinase $\gamma/5$ inhibition limits infarct size after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 19866–19871.
- 124 Doukas, J., Wrasidlo, W., Noronha, G., Dneprovskaia, I., Hood, J. and Soll, R. (2007) Isoform-selective PI3K inhibitors as novel therapeutics for the treatment of acute myocardial infarction. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 204–206.

Received 23 October 2008/8 January 2009; accepted 26 January 2009
Published on the Internet XX XX 2009; doi:10.1042/CS20080549

Anne FOUGERAT

Directeur de thèse : Dr Muriel Laffargue

UNIVERSITE PAUL SABATIER, LE 29 SEPTEMBRE 2010

**ROLE DE LA PHOSPHOINOSITIDE 3-KINASE γ DANS LA PAROI ARTERIELLE : UNE CIBLE
THERAPEUTIQUE DANS LE TRAITEMENT DE L'ATHEROSCLEROSE ET DE SES
COMPLICATIONS ?**

Le rôle de l'inflammation dans le développement des maladies cardiovasculaires reste un domaine majeur d'investigation dans la recherche de nouvelles thérapies. En effet, l'inflammation constitue un élément essentiel de la pathologie de l'athérosclérose mais également de la resténose, complication majeure du traitement par angioplastie de l'athérosclérose. Les cellules inflammatoires ainsi que les médiateurs immuns sont impliqués dans toutes les étapes du développement de l'athérosclérose. Elles participent également à la modulation phénotypique des cellules musculaires lisses (CML) qui vont acquérir un phénotype migratoire et prolifératif aboutissant à l'hyperplasie intimale, celle-ci constituant le mécanisme majeure de la resténose.

L'isoforme gamma des phosphoinositide 3-kinases (PI3K γ) a fait l'objet d'un intérêt croissant ces dernières années dans les pathologies inflammatoires. Ces kinases appartiennent à la classe I des PI3K capables de générer du phosphatidylinositol 3,4,5-*tris*phosphate (PIP₃) impliqués dans la régulation d'un grand nombre de processus biologiques. La classe I des PI3K est divisée en deux sous-classes, la classe IA (p110 α , β et δ) classiquement activée par les tyrosine kinases, et la classe IB (p110 γ) activée par les récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques. La génération de souris invalidées pour la PI3K γ a permis de montrer que les voies de signalisation impliquant cette kinase modulaient des fonctions immunitaires plaçant la PI3K γ comme un bon candidat dans la recherche de cibles thérapeutiques pour le traitement de pathologies auto-immunes. De plus, des études récentes ont montré un profil d'expression complexe de la PI3K γ incluant de faibles taux d'expression de cette kinase dans différents types cellulaires du système cardiovasculaire notamment dans les CML. L'ensemble de ces données a permis de poser l'hypothèse d'un rôle possible de la PI3K γ dans l'athérogénèse et ses complications.

Ainsi dans une première partie, nous nous sommes intéressés au rôle de la PI3K γ dans le développement de l'athérosclérose. L'administration intrapéritonéale d'un inhibiteur pharmacologique spécifique de la PI3K γ conduit à une diminution du développement de lésions athéromateuses précoces mais aussi de plaques plus avancées dans deux modèles murins d'athérosclérose. De plus, à l'aide de souris chimères dépourvues de la PI3K γ dans le système immunitaire, nous avons démontré le rôle central de la PI3K γ dans les processus inflammatoires de la paroi artérielle conduisant au développement de la plaque d'athérome et participant à sa déstabilisation.

La deuxième partie de ce travail s'est intéressée aux fonctions de la PI3K γ dans les cellules composant la paroi artérielle et plus particulièrement les CML. Ce travail réalisé *in vitro* a permis de mettre en évidence l'implication de la PI3K γ dans la migration des CML stimulées par la chimiokine MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1). De plus, nous avons montré que la PI3K γ pouvait servir d'amplificateur de la réponse au PDGF par un mécanisme autocrine/paracrine faisant intervenir le complexe MCP-1/CCR2 (MCP-1 receptor).

L'ensemble des propriétés de la PI3K γ dans la paroi artérielle que nous avons démontré placent cette kinase comme une cible thérapeutique de choix dans le traitement de l'athérosclérose et de ses complications.

Mots clés : Phosphoinositide 3-kinase γ ; Athérosclérose ; Inflammation ; Cellules musculaires lisses aortiques ; Migration

Discipline : Physiopathologie : des approches expérimentales aux nouvelles thérapeutiques

Ecole doctorale : Biologie – Santé – Biotechnologie

Unité de recherche : INSERM U563, Département LML, CPTP, CHU Purpan, Toulouse, France