



HAL
open science

Les peptides mimétiques de la Thiorédoxine-1 : nouvelle stratégie thérapeutique pour les maladies cardiovasculaires

Fanny Canesi

► **To cite this version:**

Fanny Canesi. Les peptides mimétiques de la Thiorédoxine-1 : nouvelle stratégie thérapeutique pour les maladies cardiovasculaires. Médecine humaine et pathologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS500 . tel-02613771

HAL Id: tel-02613771

<https://theses.hal.science/tel-02613771>

Submitted on 20 May 2020

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

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



**Thèse de Doctorat
De
Sorbonne Université**

Faculté des Sciences et Ingénierie
Campus Pierre et Marie Curie



Présentée par
Fanny CANESI

Pour obtenir le grade de
Docteur de Sorbonne Université
Spécialité Physiologie, physiopathologie et thérapeutique - ED 394

**Les peptides mimétiques de la Thiorédoxine-1 :
nouvelle stratégie thérapeutique pour les maladies cardiovasculaires**

Soutenue publiquement le vendredi 23 novembre 2018

*Institut de Biologie Paris Seine
UMR 8256 SU-CNRS, ERL INSERM U-1164
Unité « Adaptation biologique et vieillissement »
Équipe "Vieillesse cellulaire intégrée et inflammation"*

Membres du jury

Président du jury

Bruno Fève

PU-PH, Hôpital Saint-Antoine, UMR_S938 INSERM, Paris

Rapporteurs

Patrick Duriez

PU, Université de Lille 2 Droit et santé, Lille

Angela Sutton

MCU-PH, Hôpital Jean Verdier, Université Paris 13, INSERM U1148, Bobigny

Examineurs

Hanna Hlawaty

MCU, Université Paris 13, INSERM U1148, Bobigny

Claire Jacques-Attali

MCU, Hôpital Saint-Antoine, UMR_S938 INSERM, Paris

Membre invité

Khadija El Hadri

PU, Sorbonne Université, UMR 8256, Paris - Directrice de thèse

Je dédie ma thèse

À ma maman,

À mon papa,

À ma petite sœur adorée,

À ma chère Lysiane,

Et

À mon amour

Dédicaces

~ ~ ~ ~

Merci à ma famille, grâce à qui j'en suis arrivée jusque-là aujourd'hui. Vous avez toujours eu foi en moi et m'avez comblée par votre amour inconditionnel. Vous avez tous contribué, chacun à votre manière, à ce long parcours et vous n'avez jamais cessé de me soutenir dans mes choix. Je vous dois à tous, ma réussite. Je suis fière d'être, aujourd'hui, ce que je suis, grâce à vous tous. On forme une sacrée belle famille. Je vous aime.

Un grand Merci,

À ma Maman, qui m'a consacré beaucoup de son temps libre, particulièrement, entre deux cours ou pendant la récréation, à réviser dans sa petite saxo pour que je réussisse mes contrôles. Tu m'as merveilleusement bien accompagnée tout au long de ma scolarité. Merci d'avoir été à mes côtés. Merci aussi, d'avoir veillé à approvisionner notre appartement parisien en denrées alimentaires faites maisons, pour tous les bons plats que tu nous as concoctés et surtout les sorties entre filles. Tu es une super traductrice de charabia, une super conseillère, toujours présente pour m'écouter et me chouchouter, tu es tout simplement ... une SUPER-MAMAN !

À mon Papa, toujours présent quand j'ai besoin de toi -ce qui arrive plus souvent que ce qu'on pourrait croire- et prêt à se mettre en quatre pour ses filles chéries. Le dernier en date, lorsqu'Office m'a lâchée à quelques semaines de la fin... une sacrée frayeur !! Tu me sauves de toutes les situations possibles et inimaginables. Tu t'es constamment rendu disponible pour moi et a toujours été de bons conseils. Merci infiniment papa pour ton aide précieuse !

À ma très chère Lysiane, toujours prête à défendre les causes justes. Tu m'as vu m'épanouir au fil des années, avec mon handicap, sans cesser de croire en moi. Tu as constamment donné le meilleur de toi, dans la bonne humeur et ce, à mon rythme, pour me préparer à affronter « ce monde d'entendant », sans jamais baisser les bras. Quelques lignes ne seront pas suffisantes, ni dignes pour partager toute la gratitude que j'ai envers toi. Je te remercie profondément pour tout le travail que l'on a accompli ensemble, pour ton accompagnement et d'avoir grandement participé à ma réussite.

A ma Bichette, ma très chère petite sœur adorée de m'avoir toujours encouragée à être juste moi-même : une vraie folle. Merci tout simplement d'être ma sœur et ma meilleure amie. Pendant ma thèse tu es devenue une aventurière : Liège, Banyuls, Villefranche, Bondy, Marseille, Gif-sur-Yvette, Monaco, l'Indonésie et même Paris eheh ;) ! Tu as trouvé ta vocation et j'en suis heureuse. L'année 2018 sera pour nous, mémorable car c'est NOTRE belle année chargée en péripéties, émotions et réussites. Je suis fière de ce que tu es devenue et te félicite d'avoir (presque) terminé tes études avec succès. C'est une nouvelle aventure que tu démarres quand je finis la mienne... Nous aurons été doctorantes toutes les deux pendant 2 mois, chose la plus invraisemblable du monde ! Merci pour tout le temps passé ensemble et aux nombreux à venir encore, maintenant que c'est ton tour ;) Je te souhaite une belle thèse et bon courage. PS : Je garde quand même ma tasse fétiche d'astérixouuu

A mon très cher Raphaël, pour ton soutien moral quotidien et pour tout l'amour qui a rempli notre petit cocon parisien. Merci à toi, mon amour, d'avoir été à mes côtés, de m'avoir chouchouté et d'avoir réussi à me supporter, surtout ces derniers mois... Merci pour ta présence quotidienne indéfectible et aussi pour tes encouragements à l'égard de mes travaux. Merci d'avoir suivi mon rythme jusque tard dans la nuit pour m'encourager dans la rédaction aux moments les plus durs, ce sont vraiment les moments les plus adorables. Tu es vraiment le pilier de tous mes efforts. Je sais que ça n'a pas toujours été facile pour toi non plus. Nos prochaines vacances seront bien méritées ! Je suis heureuse d'avoir partagé cette sacrée aventure en ta présence et j'ai hâte d'en partager encore de nouvelles à tes côtés car l'ennui n'existe pas auprès de toi ! ❤️

Vous aurez toujours une place particulière dans mon cœur. Je vous exprime à tous, ici, ma profonde reconnaissance et gratitude en vous dédiant ce mémoire.

Remerciements

C'est au terme d'un voyage qui aura duré presque quatre ans que je souhaite ici adresser tous mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, en espérant n'avoir oublié personne ...

Tout d'abord, je remercie tous les membres du jury d'avoir accepté mon invitation et de s'être déplacé pour mon grand oral. Merci à Patrick Duriez et à Angela Sutton d'avoir évalué mon manuscrit. Merci à Hanna Hlawaty et à Claire Jacques-Attali d'avoir accepté d'être mes examinateurs. Enfin, merci à Bruno Fève d'avoir accepté de présider le jury.

Je remercie également Xavier guilloneau et Sonia Karabina, de m'avoir fait l'honneur de suivre mes travaux au cours de cette thèse et d'avoir fait partie de mon comité de mi-thèse.

Merci Khadija pour ton accueil au sein de ton équipe, pour ta disponibilité, ton encadrement tout au long de cette thèse et ce jusqu'au dernier jour de la rédaction de ce manuscrit. Pour ta confiance ainsi que l'ensemble de tes précieux conseils et remarques. C'est grâce à toi que j'ai eu l'opportunité de réaliser tous ces travaux, grâce auxquels j'ai pu m'épanouir au travail et qui m'ont apporté une « véritable » première expérience dans le monde de la recherche.

Merci Mustapha pour ta bienveillance, tes conseils avisés ainsi que tes encouragements tout au long de ma thèse qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Merci d'avoir partagé tes précieuses connaissances. Ça a été un vrai privilège d'échanger nos points de vue. Je te souhaite une bonne retraite. :)

Merci Hilaire pour ton éternelle bonne humeur. Nos chamailleries me manqueront sans aucun doute !

Merci à Dominique pour ta disponibilité car je sais également que sans toi mes RT-qPCR n'auraient pas vu le beau jour. Merci à toi également pour ta relecture finale méticuleuse de chacun de mes chapitres.

Merci à Julie Knoertzy d'avoir pris soin de nos petites souris !

Merci à Christophe, toi qui m'as vu évoluer de stages en stages jusqu'à la thèse et d'avoir fait naître mes peptides !

Merci à Martine pour tes bons conseils et ton aide tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir dépanné pour mes nombreuses manips de dernière minute.

Merci à mon équipe, à l'ensemble de l'UMR 8256, de l'IBPS et toutes les personnes qui ont rendu ces années de thèse riches en expériences, évènements, échanges, opportunités et rencontres : Bertrand Friguet, Aurore L'Honoré, Isabelle Petropoulos, Vimala Diderot, Sylvia Soares, Ysander Von Boxberg, Fatiha Nothias, Anne Negre-Salvayre, Véronique Matéo, Christine Balducci, Nadir Bensliman, Audrey Goulian, Lei Tian, Zhenli Li, Jean-Francois Decaux, Johanne De Marchi, Phillipe Leballeur, Aurélie Prats, Monique Gareil, Claire Monne, Janek Hyzewicz, Martin Baraibar, Andréa Cavagnino, Michel Raymondjean, Onick Agbulut, Alexandre Simon, Margaret Ahmad, Mégane Babiak, Florence Ladouce, Ségolène Pretat, Feryel Soualmia, Chahrazade El Amri, Valérie Lefort, Marie-Thérèse Daher, Abdelhakif Hafdi, Kadiatou, Josette et Julietta.

Merci à mes collègues d'enseignements, Éric Duplus, Nicole Blanchouin, Valérie Messent, Sandrine Betuing, Sophie Louvet, Sandrine Castella, Dominique Boucher, Véréne Stierle, Carole Saintomé, Laurence Le Callonnec, Najat Takvorian, Pauline Vaur, Cécile Anne, Julien Jarroux, Eleonore Toufektchan, Romane Durand, Héloïse Dalle, Lucie Danet, Affaf Aliouat pour cette super expérience enrichissante.

Merci à la Team jeune : Rym (Que vas-tu faire sans moi et mes réserves de mars ? ;), Sofia (Attends moi, j'arrive à Porto !), Audrey, Yara, Sabrina et Marie-Paule. Nos papotages dans la bonne humeur et enfantins me manqueront ainsi que nos pauses café !

Merci à mes amis Rong, Tony, Caroline, Gaëtan, Morane, Maxime, Loïc, Marc, JB avec qui j'ai passé de superbes vacances ou des sorties inoubliables.

Merci à mes grand-parents : Palou, Manou, Pépé et Lulu parce que ça fait du bien d'avoir été chouchoutée pendant mes passages dans le sud. Le grand air marin et les belles balades ont été ressourçants.

Merci à la famille Thuillet et à mes cousines, petites cousines, tantes et grand-tantes, et tous les autres membres de ma famille, sans exception pour les moments que nous avons partagés, tous ensemble, pendant les fêtes ou les vacances qui ont été les périodes les plus douces.

Merci à Elodie ! Je suis ravie de t'avoir rencontrée pendant mon master et ça a été un véritable plaisir de faire la formation animale et surtout de l'enseignement avec toi. On a pu partager nos galères d'enseignantes. Je me souviendrai de nos préparations de dernières minutes et la montée croissante de la panique en voyant la charge de travail, suivi des fous rires en se disant « tant pis, on se lance ». Nous avons été super pro ! :D Merci, surtout pour ta disponibilité continue, ton sens de la dédramatisation pour les moments durs qu'on a rencontrés. Nos moments de partage m'ont beaucoup aidé à avancer. Merci pour tous ces fous rires et ces galères en tous genres durant la rédaction de nos manuscrits que je n'ai pas été seule à affronter.

Ma Rachel, tout d'abord merci d'avoir réussi ton concours afin d'avoir ensuite pu partager mon bureau :D Nous étions destinées à devenir amies. Plus sérieusement, merci d'avoir pris soin de moi durant cette thèse. Ma réserve alimentaire aura été notre réconfort pendant les pauses capuccino, thé, café, coca-colaaa. Ton soutien inconditionnel a été un baume au cœur. Merci pour tous ces moments de joie partagés. Le seul regret que j'aurai est de ne plus avoir ta présence quotidiennement au travail... mais nous avons encore Harry Potter à finir et même une série à commencer... ouf tant de choses nous attendent après ma thèse donc prépare toi à ce que je ressorte à nouveau pour faire des marathons cinéphiles ;)

Durant ce long travail j'ai fait de merveilleuses rencontres, certaines m'auront marquées, d'autres dureront ou encore me manqueront. Sincères remerciements à vous tous, pour ces merveilleuses expériences, votre partage, et les souvenirs que je n'oublierai jamais.

Enfin, un énormissime merci à mon Raphou, mon Papa, ma Maman, ma Mimi, Elodie, Rachel, Dominique, Mustapha et enfin Khadija de m'avoir aidée dans la rédaction, les corrections, la relecture et le fignotage de mon mémoire de thèse.

Table des matières

<i>Dédicaces</i>	p.03
<i>Remerciements</i>	p.06
<i>Valorisation scientifique</i>	p.14
<i>Liste des abréviations</i>	p.16
<i>Liste des figures</i>	p.20
<i>Introduction</i>	p.22
<u>Préambule</u>	p.23
<u>Chapitre 1 : L'athérosclérose, pathologie inflammatoire</u>	p.24
1) <u>Structure d'une paroi artérielle saine</u>	p.24
2) <u>La genèse de la plaque d'athérosclérose</u>	p.26
2-1) Activation et perméabilisation de l'endothélium	p.27
2-2) Infiltration de l'intima par les lipoprotéines de base densité (LDL)	p.28
2-3) Recrutement et différenciation des macrophages	p.28
2-4) Transformation des macrophages en cellules spumeuses	p.29
2-5) Formation de la chape fibreuse et les complications de la plaque d'athérosclérose	p.29
2-6) Classification des lésions athéromateuses	p.30
<u>Chapitre 2 : Les ROS, de la physiologie à la physiopathologie</u>	p.32
1) <u>Les ROS : de l'homéostasie redox au stress oxydatif</u>	p.32
2) <u>Les sources de ROS dans la paroi vasculaire</u>	p.33
2-1) Principale source de production des ROS : la mitochondriale	p.33
2-2) Autres sources de production de ROS : les enzymes	p.34
2-2-1) La NADPH oxydase membranaire	p.35
2-2-2) La Xanthine oxydase	p.35
2-2-3) L'oxyde nitrique synthase	p.36
3) <u>Rôle physiologique des ROS au sein de la paroi vasculaire</u>	p.37
4) <u>Les systèmes de défense antioxydants</u>	p.38
4-1) La superoxyde dismutase	p.39
4-2) Le système glutathion	p.39

4-3) Le système de la thiorédoxine	p.40
5) <u>Rôle physiopathologique des ROS, implication dans l'athérosclérose</u>	p.41
Chapitre 3 : Les macrophages, acteurs majeurs de l'inflammation	p.43
1) <u>Plasticité phénotypique des macrophages dans l'athérosclérose</u>	p.43
1-1) Les phénotypes conventionnels	p.44
1-1-1) Le phénotype M1 : profil pro-inflammatoire	p.44
1-1-2) Le phénotype M2 : profil anti-inflammatoire	p.45
1-2) Les autres phénotypes de macrophages	p.46
2) <u>Plasticité métabolique des macrophages</u>	p.47
2-1) Profil métabolique des macrophages M1	p.47
2-2) Profil métabolique des macrophages M2	p.49
3) <u>Les macrophages et la genèse de l'inflammation au sein de la plaque d'athérosclérose</u>	p.51
Chapitre 4 : La Thiorédoxine-1, un antioxydant majeur	p.53
1) <u>La Trx-1 : du gène à la protéine</u>	p.53
2) <u>La Trx-1 : les fonctions cellulaires</u>	p.55
2-1) La Trx-1 : rôle majeur dans le maintien de l'équilibre redox	p.55
2-1-1) Le mécanisme redox de la Trx-1	p.56
2-1-2) Régénération de la Trx-1 par la TrxR	p.56
2-1-3) Détoxification des ROS par la Trx-1	p.57
2-2) La Trx-1, autres fonctions cellulaires	p.58
2-2-1) Trx-1, effets sur la signalisation cellulaire	p.58
2-2-2) Trx-1, effets nucléaires	p.59
2-2-3) Régulation des fonctions cellulaires de la Trx-1	p.60
3) <u>La Trx-1, le clivage et la genèse de la Trx-80</u>	p.61
4) <u>La Trx-1, implication dans les maladies cardiovasculaires</u>	p.62
4-1) Implication bénéfique de la Trx-1 dans les maladies cardiovasculaires	p.62
4-2) Le clivage de la Trx-1, perte du bénéfice cardiovasculaire	p.64

<i>Projet de thèse</i>	p.66
1) Objectifs	p.67
2) Méthodes	p.69
<i>Résultats</i>	p.70
<i>Résultats supplémentaires</i>	p.82
<i>Discussion</i>	p.102
<i>Conclusion</i>	p.110
<i>Perspectives</i>	p.113
<i>Bibliographie</i>	p.115
<i>Annexe</i>	p.133

Valorisation scientifique

◆ Communications

- Mai 2018** Canesi F., Couchie D., Rouis M., El Hadri K. *Thioredoxin-mimetic peptides : New promising therapeutic strategy for the treatment of cardiovascular diseases.* **JED19th - ED394, Paris.** Oral sur présentation de poster.
- Avril 2017** Canesi F., Couchie D., Rouis M., El Hadri K. *Thioredoxin-mimetic peptides : New promising therapeutic strategy for the treatment of cardiovascular diseases.* **JED18th - ED394, Paris.** Oral sur présentation de poster.
- Juin 2016** Canesi F., Couchie D., Diderot V., Rouis M., El Hadri K. *Thioredoxin-mimetic peptides : New promising therapeutic strategy for the treatment of cardiovascular diseases.* **Congrès NSFA, Biarritz.** Oral sur présentation de poster.
- Mai 2016** Canesi F., Couchie D., Diderot V., Rouis M., El Hadri K. *Thioredoxin-mimetic peptides : New promising therapeutic strategy for the treatment of cardiovascular diseases.* **JED17th - ED394, Paris.** Oral sur présentation de poster - **Prix poster.**

◆ Publications

- 2018** Canesi F., Mateo V., Couchie D., Karabina S., Nègre-Salvayre A., Rouis M., El Hadri K. *A thioredoxin-mimetic peptide exerts potent anti-inflammatory, anti-oxidant, and atheroprotective effects in ApoE2.Ki mice fed high fat diet.* **Cardiovascular Research** (IF : 5,878). 2018 Jul 13.
- 2017** Couchie D., Vaisman B., Abderrazak A., Mahmood DFD., Hamza MM., Canesi F., Diderot V., El Hadri K., Nègre-Salvayre A., Le Page A., Fulop T., Remaley AT., Rouis M. *Human plasma Thioredoxin-80 increases with age and in ApoE^{-/-} mice induces inflammation, angiogenesis, and atherosclerosis.* **Circulation** (IF : 19,309). 2017 Aug 1 ;136(5):464-475.

Liste des abréviations

A

α -KG : Alpha-ketoglutaric acid
AcetylCoA : Acétyl-coenzyme A
ADAM-10/17: A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10/17
ALAT : Alanine aminotransférase
Ang II : Angiotensine II
AP-1 : Activator protein-1
APEX-1 : Apurinic/Apyrimidinic Endodeoxyribonuclease 1
ApoA : Apolipoprotéine A
ApoE : Apolipoprotéine E
ARG-1 : Arginase-1
ASAT : Aspartate aminotransférase
ASK-1 : Apoptosis signal-regulating kinase 1
ATF-1 : Activating transcription factor 1
AVC : Accident vasculaire cérébral

B

BAEC : Bovine aortic endothelial cell
BH4 : Tétrahydrobioptérine

C

CARKL : Sedoheptulose kinase
CAT : Catalase
CFU-GEMM : Colony forming unit-granulocyte, erythrocytes, monocytes and megakaryocyte
CFU-GM : Colony forming unit-granulocyte, monocytes
CFU-M : Colony forming unit-monocytes, macrophages
CML : Cellule musculaire lisse
CPT-1A : Carnitine Palmitoyltransferase 1A

D

DCF-DA : 2',7' -dichlorofluorescein diacetate
DTT : Dithiothréitol

E

ECT : Chaîne de transport d'électrons
ER : Estrogen receptor

F

FAO : fatty acid oxidation (ou oxydation des acides gras)

G

G6P : Glucose-6-Phosphate
GPx : Glutathion peroxidase
GR : Glucocorticoid receptor

H

HCAEC : Human coronary artery endothelial cell
HFD : High fat diet
HIF-1 α : Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HMDM : Human monocyte-derived macrophage
HMOX1 : Heme oxygenase 1
hTrx-1 : Thiorédoxine-1 humaine

I

ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule 1
IFN- γ : Interféron gamma
IGF-1 : Insulin-like growth factor-1
IL : Interleukine

J

JNK : C-Jun N-terminal kinases

L

LDLox : Oxidized low-density lipoprotein (ou lipoprotéine de basse densité oxydée)
LPS : Lipopolysaccharides

M

M-CSF : Macrophage colony-stimulating factor
MAPK : Mitogen activated protein kinase
MAPK : Mitogen-activated protein kinases
MCP-1 : Monocytes chemoattractant protein-1
MCV : Maladies cardiovasculaires
MERTK : Myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase
MMP : Matrix metalloproteinases (ou métalloprotéases matricielles)
Msr : Methionine sulfoxide reductase

N

NAC : N-acétylcystéine
NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B : Nuclear factor-kappa B
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3
NO : Nitric oxide (ou oxyde nitrique)
NOS : Nitric oxide synthase (ou oxyde nitrique synthase)
NOX : NADPH oxydase
NRF-1 : Nuclear respiratory factor-1

O

OAA : Acide oxaloacétique
OMS : Organisation mondiale de la santé

OXPHOS : Mitochondrial oxidative phosphorylation system

P

PDGF : Platelet-derived growth factor

PKB : Proteine kinase B (ou Akt)

PPAR- γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

PPP : Voie des pentoses phosphates

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

R

RNR : Ribonucléoside réductase

ROS : reactive oxygen species (ou espèce réactive de l'oxygène)

S

SOD : Superoxyde dismutase

SR-A : Scavenger receptor A

T

TBP-2 : Thioredoxin-binding protein-2

TCA : Tricarboxylic acid cycle (Cycle de krebs ou cycle de l'acide citrique)

TGF- β : Transforming growth factor-beta

TLR : Toll-like receptor

TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha

TRPC5 : Transient receptor potential channel 5

Trx-1 : Thiorédoxine-1

Trx-80 : Thiorédoxine-80

TrxR : Thiorédoxine réductase

TxMP : Thioredoxin-mimetic peptide

TxNIP : Thioredoxin-interacting protein (ou TBP-2 ou VDUP1)

V

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule 1

VDUP1 : Vitamin D3 up regulated protein1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

X

XO : Xanthine oxidase

Liste des figures

Figure 1. Structure d'une artère humaine saine.	p.25
Figure 2. Représentation des différentes étapes de l'athérogenèse.	p.27
Figure 3. Les principales sources cellulaires de ROS.	p.37
Figure 4. Aperçu des différentes sous-populations de macrophages existantes au sein de la plaque d'athérosclérose.	p.46
Figure 5. Schéma représentant les voies métaboliques impliquées dans les macrophages pro-inflammatoires de phénotype M1.	p.49
Figure 6. Schéma représentant les voies métaboliques impliquées dans les macrophages anti-inflammatoires de phénotype M2.....	p.51
Figure 7. Séquence représentant la région promotrice de la hTrx-1.	p.54
Figure 8. Séquence et structure de la hTrx-1.	p.54
Figure 9. Le système de la Trx-1.	p.55
Figure 10. Mécanisme de réduction d'une protéine oxydée sous l'action de la Trx-1. ...	p.56
Figure 11. Réaction de réduction de la Trx-1 par la TrxR.	p.57
Figure 12. Effets cellulaires de la Trx-1.	p.62
Figure 13. Rôles protecteurs de la Trx dans les maladies cardiovasculaires.	p.64
Figure 14. Structures tridimensionnelles simulées de la Trx-1 et du peptide mimétique de la Trx-1.	p.67
Figure 15. Effets anti-inflammatoires et antiathérogènes du CB3.	p.109

Introduction

Préambule

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), environ 56,9 millions de décès ont été recensés dans le monde en 2016, toutes causes de maladie confondues (âge, sexe, revenus), parmi les 7,5 milliards d'individus que compte la planète. Parmi ces décès, les maladies cardiovasculaires (MCV) représentent à elles seules 31,5% de la mortalité mondiale devant les maladies pulmonaires obstructives chroniques (5,3%) et les infections respiratoires (5,2%) (Global health estimates 2016 summary tables : Global deaths by cause, age and sex, 2000-2016. Geneva, Switzerland : World Health Organization). Les deux maladies cardiovasculaires les plus courantes sont les cardiopathies ischémiques (16,6%) et les accidents vasculaires cérébraux (AVC) (10,2%) (World Health Organization Report : Cardiovascular diseases, May 2017).

Il est bien établi que la principale caractéristique pathologique sous-jacente de toutes ces maladies cardiovasculaires est l'athérosclérose. Aujourd'hui, les études cliniques réalisées chez l'homme et les nombreuses expériences réalisées sur des modèles animaux (essentiellement murins) ont permis une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques avec la mise en place de nombreuses stratégies thérapeutiques et chirurgicales chez l'homme. Cependant, malgré ces découvertes et ces avancées prometteuses, la mortalité par maladies cardiovasculaires prédomine toujours. Ces pathologies sont devenues, aujourd'hui, un enjeu de santé publique de par la croissance démographique et l'allongement de la durée de vie de la population mondiale. Il est devenu urgent et capital de prévenir ces pathologies et de mettre en place des stratégies thérapeutiques innovantes et efficaces.

Mon travail de thèse porte sur la caractérisation et la validation, *in vitro* et *in vivo*, d'une nouvelle stratégie pour la prévention et/ou le traitement de l'athérosclérose.

Chapitre 1

L'athérosclérose, pathologie inflammatoire

L'athérosclérose est une pathologie très ancienne puisque dès 1911, le médecin Marc Armand Ruffer a mis en évidence les premières traces de plaques d'athérome sur de vieilles momies égyptiennes datant de 1580 avant J.C à 525 après J.C (Ruffer, 1911).

Sur le plan anatomopathologique, l'OMS a défini en 1957, l'athérosclérose comme une "association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre, consistant en une accumulation focale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la média" (WHO Study Group, 1958). C'est une pathologie qui débute dès le plus jeune âge, touchant tous les individus, et qui évolue de manière lente. Les symptômes de l'athérosclérose se manifestent seulement au bout de plusieurs années après l'apparition des premières lésions athéromateuses au niveau de la paroi artérielle.

1) Structure d'une paroi artérielle saine

La paroi artérielle est constituée de trois couches concentriques superposées les unes par rapport aux autres, de l'extérieur vers l'intérieur du vaisseau, appelées respectivement l'adventice, la média et l'intima (Figure 1) (Libby, 2002).

L'adventice est composée d'un tissu conjonctif riche en collagène, en fibres élastiques et en fibroblastes. L'ensemble est entouré d'une enveloppe qui assure l'ancrage des artères et des vaisseaux aux tissus. Cette tunique est irriguée par des *vasa vasorum* qui ont pour rôle de nourrir l'adventice et la média externe. Des nerfs du système nerveux autonome sont également présents dans l'adventice : ils contrôlent la contractilité de la média.

La média est le constituant principal de l'artère. De structure épaisse, elle est composée essentiellement de cellules musculaires lisses (CML), disposées perpendiculairement à l'axe du vaisseau, qui peuvent synthétiser et sécréter une matrice extracellulaire constituée notamment de collagène et d'élastine et de muco-polysaccharides. Sa fonction principale est d'assurer les fonctions hémodynamiques de contraction et de dilatation de l'artère. Cette deuxième couche est délimitée par deux limitantes élastiques, l'une externe (LEE) et l'autre interne (LEI).

Enfin, l'intima est la couche la plus interne. Elle est composée d'un endothélium formé par une monocouche de cellules endothéliales directement en contact avec le sang et d'un tissu conjonctif fibro-élastique sous-jacent. Les cellules endothéliales ont plusieurs rôles essentiels au maintien de l'homéostasie des vaisseaux. Elles sont en contact avec le sang, régulent le passage de constituants sanguins et répondent aux différents stimuli inflammatoires et immuns en sécrétant de nombreuses molécules d'adhésion, des facteurs de croissance tels que le PDGF, des facteurs anti-thrombotiques (prostaglandine I₂, antithrombine III, α 2-macroglobuline, activateur tissulaire du plasminogène), des molécules de la matrice extracellulaire (collagène de type IV, protéoglycanes) ou des cytokines multifonctionnelles (Krishnaswamy et al., 1999; Lusis, 2000).

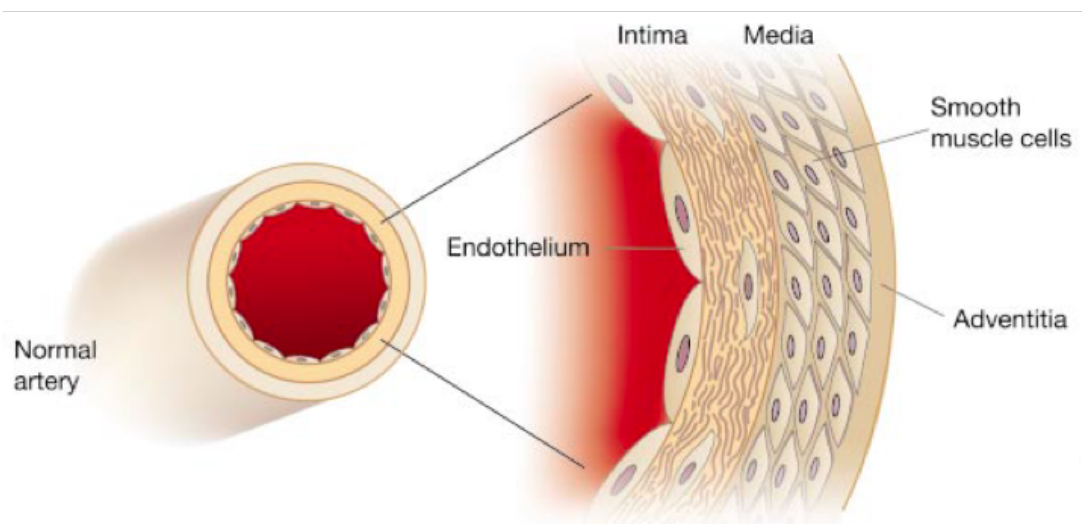


Figure 1. Structure d'une artère humaine saine. L'artère humaine possède une structure trilaminarienne typique. La monocouche de cellules endothéliales (endothélium) en contact avec le sang dans la lumière artérielle forme une barrière naturelle entre la lumière vasculaire et l'intima. La média, constituée essentiellement de CML, est délimitée par une lame d'élastine interne (LEI) et externe (LEE). La dernière couche, appelée adventice, permet de fixer les vaisseaux aux tissus environnants (Libby, 2002).

2) La genèse de la plaque d'athérosclérose

Aujourd'hui, il est bien établi que l'âge, l'hypertension, le tabagisme, le surpoids ou encore l'hypercholestérolémie sont considérés comme les principaux facteurs de risque pouvant entraîner le remaniement de la paroi artérielle et donc participer au développement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (Lusis, 2000). La suppression ou l'amélioration de certains facteurs de risque comme le tabac, l'hypercholestérolémie, le diabète, l'hypertension artérielle ou l'obésité (un régime alimentaire équilibré et une pratique d'une activité physique régulière et adaptée) permet de limiter la progression de la plaque d'athérome au niveau vasculaire. En revanche, d'autres facteurs de risque, comme l'âge ou le sexe, ne sont pas modulables.

L'intima est le siège de l'athérosclérose qui est donc une maladie inflammatoire chronique des artères de moyen et gros calibre (Ross, 1999). Cette couche vasculaire va progressivement être remaniée en fonction du stade de développement du processus athérogénique.

Deux grands courants de pensée sur les premières manifestations cliniques ont longtemps dominé : l'un considère que l'infiltration lipidique est le facteur déclenchant la formation de la plaque (Anitschkow and Chalutow, 1983; Konstantinov et al., 2006) ; l'autre suppose que le processus de dégénérescence, de rupture ou de desquamation endothéliale peut provoquer l'initiation de l'athérogenèse (Ross and Glomset, 1976). Selon Steinberg, le changement de perméabilité des cellules endothéliales (dysfonction endothéliale) ainsi que l'infiltration des lipides et leur oxydation au sein de l'intima de la paroi vasculaire seraient le *primum movens* de l'athérosclérose (Steinberg, 1997).

Au cours de l'athérogenèse, des événements pathologiques se mettent en place de façon séquentielle et progressive (Figure 2).

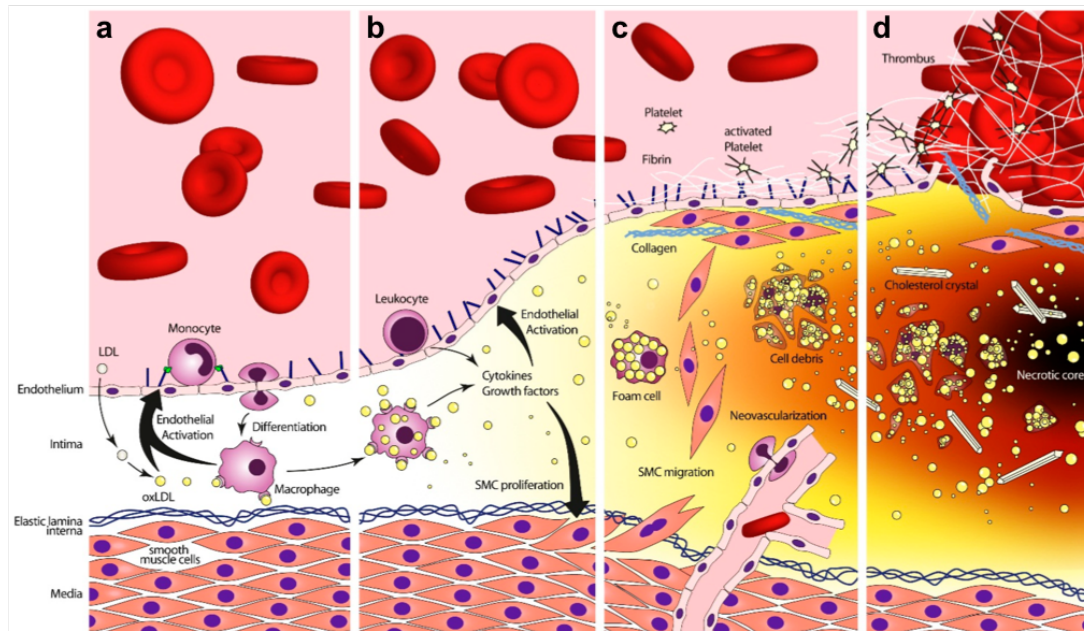


Figure 2. Représentation des différentes étapes de l'athérogenèse. (a) Dans les zones de flux sanguin non-laminaire, et sous l'effet d'autres facteurs, la dysfonction endothéliale permet l'infiltration de lipoprotéines de basse densité (LDL) dans l'intima vasculaire. Les LDL subissent des modifications oxydatives pour devenir des LDL oxydées (LDLox). Les LDLox activent les cellules endothéliales et les cellules immunitaires résidentes, entraînant l'expression de chimiokines (IL-8, MCP-1) et de molécules d'adhésion (VCAM-1, P-sélectine). Ces facteurs conduisent les monocytes circulants à envahir l'intima. **(b)** Une fois dans l'intima, les monocytes se différencient en macrophages et "ingèrent" des LDLox pour devenir des cellules spumeuses. Elles activent les cellules endothéliales et contribuent au recrutement des leucocytes via la sécrétion de MCP-1. **(c)** L'augmentation du volume de la plaque favorise la néovascularisation. Après leur dédifférenciation, les CML vont migrer de la média vers l'intima et y proliférer afin de stabiliser la plaque naissante. Un milieu pro-thrombotique commence à se former **(d)** Les cellules spumeuses meurent dans l'intima par apoptose. Si elles ne sont pas éliminées rapidement, elles deviennent nécrotiques. Ce processus conduit progressivement à la formation d'un noyau nécrotique thrombogène et pro-inflammatoire. Les macrophages alimentent davantage l'inflammation des lésions par la sécrétion de cytokines et de métalloprotéases (MMP) ayant une activité protéolytique capable de dégrader la matrice extracellulaire et de favoriser la déstabilisation et la rupture de la plaque. Cela mène à l'athérothrombose et aux événements ischémiques associés tels que l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral (Steinl and Kaufmann, 2015).

2-1) Activation et perméabilisation de l'endothélium

Plusieurs facteurs chimiques (cytokines, produits de glycation, oxydation) ou physiques (force de cisaillement) agissent de concert pour activer et perméabiliser l'endothélium et initier ainsi la formation de la plaque d'athérome. Les sites privilégiés de survenue des dysfonctions endothéliales sont les zones de bifurcations artérielles,

caractérisées par de faibles forces de cisaillement et de fortes turbulences du flux sanguin (Chatzizisis et al., 2007; Gimbrone et al., 2000). Par ailleurs, exposées à des niveaux trop élevés de LDL oxydées circulantes, les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhésion fixant les monocytes circulants. L'activation et la perméabilisation de l'endothélium permettent ainsi le passage des lipoprotéines et des cellules immunitaires vers l'intima (Figure 2a).

2-2) Infiltration de l'intima par les lipoprotéines de base densité (LDL)

Les LDL, principaux transporteurs de cholestérol chez l'homme, peuvent traverser la barrière endothéliale activée pour atteindre l'intima de la paroi vasculaire. Dans l'espace sous-endothélial, les lipoprotéines subissent des modifications telles que l'oxydation, la protéolyse, la lipolyse et l'agrégation. Parmi ces modifications, l'oxydation semble être la plus importante et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par différents types cellulaires comme les cellules endothéliales et les macrophages, jouent un rôle important (Libby et al., 2002). De nombreuses publications ont montré qu'un taux plasmatique élevé de LDL oxydées (LDLox) est athérogène et que leur diminution réduit le risque de maladie coronaire chez des modèles animaux hypercholestérolémiques développant de l'athérosclérose. Ainsi, les LDLox semblent constituer un facteur majeur impliqué dans la genèse de l'athérosclérose (Steinberg et al., 1989) (Figure 2a).

2-3) Recrutement et différenciation des macrophages

L'accumulation intimale des LDLox active les cellules endothéliales et entraîne la production de nombreuses molécules comme les molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, sélectine P et sélectine E), le facteur de croissance M-CSF (*Macrophages-colony stimulating factor*) et les chimiokines (MCP-1, CX3CL1, ...). Le relargage de ces chimiokines permet, entre autres, l'activation des intégrines ($\alpha 4\beta 1$, PSGL-1) présentes à la surface des leucocytes circulants (monocytes, granulocytes, lymphocytes) ayant une forte affinité pour les molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium (Napoli et al., 1997). Les monocytes adhèrent à la barrière endothéliale, la traversent en migrant vers l'intima par diapédèse, sous l'effet de facteurs chimiotactiques comme le MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) et l'IL-8 (Interleukine-8) (Libby et al., 2002). Une fois dans l'intima, les monocytes qui ne sont plus en

suspension se différencient en macrophages grâce à leur adhérence sur la matrice extracellulaire (Figure 2a). De plus, les monocytes peuvent proliférer et se différencier en présence du M-CSF produit par les cellules endothéliales, les CML et les macrophages (Valledor et al., 1998; Glass and Witztum, 2001; Lulis, 2000; Sumpio et al., 2002; Tabas, 2010). Une étude montre que la lésion vasculaire est fortement diminuée dans un modèle murin d'athérosclérose (souris ApoE^{-/-}) déficient en M-CSF (Smith et al., 1995). Cela signifie, par conséquent, que la différenciation des monocytes en macrophages joue un rôle majeur dans le développement de la plaque d'athérosclérose.

2-4) Transformation des macrophages en cellules spumeuses

Les macrophages, comme toutes les cellules de l'immunité innée, ont à leur surface des récepteurs de reconnaissance appelés récepteurs scavengers (SR-A, LOX-1, TLR-4, ...) qui permettent l'internalisation des LDLox reconnues comme "signal de dommage" (Plüddemann et al., 2007). Les macrophages se gorgent de LDLox et se transforment en cellules spumeuses caractérisées par la présence de gouttelettes lipidiques (formées d'ester de cholestérol) au niveau du cytoplasme. L'accumulation des cellules spumeuses constitue le corps lipidique de la plaque d'athérome (Figures 2b et 2c) (Glass and Witztum, 2001; Lulis, 2000; Sumpio et al., 2002; Tabas, 2010).

2-5) Formation de la chape fibreuse et les complications de la plaque d'athérosclérose

Au cours de l'athérosclérose, la persistance des stimuli inflammatoires associées à une déficience des mécanismes de résolution de l'inflammation conduit à la progression de la plaque d'athérosclérose. Les facteurs de croissance PDGF et TGF- β , sécrétés par les macrophages, entraînent l'activation et donc la dédifférenciation des CML (Ross, 1993; Stiko-Rahm et al., 1992). Les CML migrent de la média vers l'intima, synthétisent et sécrètent en abondance des protéines de la matrice extracellulaire contribuant ainsi à la formation de la chape fibreuse qui recouvre le corps lipidique de la plaque (Libby et al., 2011) (Figure 2c). Par ailleurs, les CML intimaux peuvent, non seulement phagocyter les lipides *via* les récepteurs scavengers et se transformer en cellules spumeuses, mais également exprimer des marqueurs macrophagiques (Allahverdian et al., 2018). Au sein de la plaque, beaucoup de macrophages

et de CML spumeux meurent par apoptose, libérant leur contenu lipidique dans l'espace extracellulaire et contribuant à l'accumulation des débris cellulaires qui sont très athérogènes (Figure 2c) (Grootaert et al., 2018; Raines and Ross, 1993). La clairance inefficace de ces cellules apoptotiques par efferocytose, entraîne l'accumulation des corps nécrotiques (Figure 2d) (Tabas, 2010). Comme les macrophages, les CML de la chape fibreuse sont également sensibles à l'apoptose, ce qui pourrait expliquer l'instabilité de certaines plaques (Libby et al., 2011). L'athérosclérose peut aboutir à des lésions qui, à terme, peuvent obstruer la lumière des vaisseaux directement ou *via* des complications thrombotiques. Cette obstruction peut provoquer des accidents vasculaires aigus et mortels comme l'infarctus du myocarde et les AVC (Figure 2d) (Mann and Davies, 1996; Ross, 1999).

2-6) Classification des lésions athéromateuses

En 1994, Stary a proposé une classification histologique reconnaissant six types de lésions successives, classées par niveau de gravité. Les deux premiers stades de lésion (Types I, II) sont des lésions minimales où les stries lipidiques (composées de macrophages, cellules spumeuses, CML, lipides extracellulaires, lymphocytes T) apparaissent dès l'enfance. C'est une structure réversible mais qui peut évoluer cliniquement vers une lésion de type III où la strie lipidique forme un centre lipidique entouré d'une chape fibreuse (riche en collagène, CML et matrice extracellulaire). Le volume de la plaque commence à augmenter et un remodelage de l'artère s'impose pour retarder la survenue des sténoses. La lumière artérielle se réduit progressivement. Ce stade silencieux peut basculer vers une lésion avancée et compliquée de type IV, V et VI. La sténose, l'angor instable, l'infarctus du myocarde, les hémorragies intra-plaques ou la mort subite coronaire sont des lésions liées à une athérosclérose compliquée (Stary et al., 1994, 1995). Chaque type de lésion présente aussi les caractéristiques du type précédant de lésion. L'athérosclérose est donc une pathologie évolutive et chronique pouvant se transformer en une lésion compliquée potentiellement fatale (Libby et al., 2002).

Le stress oxydatif est associé à tous les facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Un grand nombre d'arguments sous-tend son implication dans différents processus responsables de la formation de la plaque d'athérome (Drummond et al., 2011; Hulsmans and Holvoet, 2010; Madamanchi et al., 2005a). Le stress oxydatif représente donc

le lien entre les facteurs de risque cardiovasculaires et l'athérosclérose, faisant de ce déséquilibre redox une cible thérapeutique majeure.

Chapitre 2

Les ROS, de la physiologie à la physiopathologie

1) Les ROS : de l'homéostasie redox au stress oxydatif

Les ROS représentent un groupe de radicaux libres dérivés de l'oxygène moléculaire. La présence de radicaux libres dans les matériaux biologiques a été découverte en 1954 par Commoner (Commoner et al., 1954). Les radicaux libres sont, par définition, de petites molécules ou des atomes comportant un électron célibataire sur leur couche périphérique (Halliwell and Gutteridge, 1990). La présence de cet électron libre leur confère un fort degré de réactivité et la possibilité d'oxyder ou de réduire de nombreux composés afin de stabiliser leur orbite externe. Les radicaux libres ainsi générés sont régulés en fonction de leur taux de production et d'élimination orchestrée par des défenses antioxydantes. Dans un état physiologique stable, la balance pro-oxydants/antioxydants est à l'équilibre. Pour désigner cette idée générale de stabilité ajustée et adaptative au sein de l'organisme, le physiologiste Walter Bradford Cannon a proposé en 1926 le terme d'homéostasie, popularisé seulement en 1932 (Cannon, 1926, 1929; Davies, 2016). Cette homéostasie redox est essentielle puisqu'à des concentrations physiologiques, les ROS régulent plusieurs fonctions cellulaires au niveau vasculaire comme, la croissance, la prolifération, la migration des cellules endothéliales et des CML, l'angiogenèse, l'apoptose ou encore le tonus vasculaire (Freed and Gutterman, 2013; Vara and Pula, 2014). Cependant, cet équilibre redox peut être perturbé par plusieurs facteurs comme le mode de vie (le tabagisme), l'environnement (la pollution, les UV) ou encore les mécanismes biochimiques (l'inflammation) auxquels est exposé l'organisme (Haleng et al., 2007; Phaniendra et al., 2015; Silva and Coutinho, 2010).

Une production excessive des ROS associée à une insuffisance et/ou défaillance des défenses antioxydantes perturbe l'homéostasie redox. On parle alors de stress oxydatif, terme formulé pour la première fois par Helmut Sies en 1985 (Sies and Cadenas, 1985; Madamanchi et al., 2005a; Sies et al., 2017). Le stress oxydatif est un des mécanismes pathogènes provoqués par les principaux facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. En effet, des niveaux élevés de ROS entraînent des dommages cellulaires oxydatifs au sein de la paroi vasculaire. De plus, le recrutement de cellules inflammatoires, la prolifération des CML, la peroxydation des lipides, l'activation des métallo-protéinases et le dépôt de la matrice

cellulaire conduisent à un remodelage pathologique vasculaire (Madamanchi et al., 2005a; Stocker and Keane, 2004). En effet, un grand nombre de travaux a montré que les ROS sont impliqués dans l'initiation et la progression de l'athérosclérose dans le cadre du stress oxydatif (Chen et al., 2018).

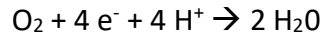
2) Les sources de ROS dans la paroi vasculaire

Les ROS peuvent être produites par tous les types de cellules vasculaires, y compris les cellules endothéliales, les CML, les fibroblastes adventitiels et les macrophages. La formation des ROS dépend à la fois de voies enzymatiques et non-enzymatiques. Les voies enzymatiques comme la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, l'oxyde nitrique synthase sont les sources les plus importantes de ROS au niveau vasculaire. La myéloperoxydase, la lipoxigénase, la cyclo-oxygénase et de nombreuses autres amines oxydases sont également productrices de ROS. Par ailleurs, la chaîne de transport d'électrons mitochondriale est également une source majeure de ROS (Touyz and Briones, 2011) (Figure 3).

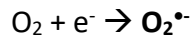
2-1) Principale source de production des ROS : la mitochondriale

Les mitochondries, organites cellulaires eucaryotes et carrefours des processus énergétiques, sont les plus gros consommateurs d'oxygène. La production d'énergie et la réduction de l'oxygène se font au niveau de la chaîne de transport d'électrons (ECT), appelée également chaîne mitochondriale. Elle est située au sein de la membrane interne de la mitochondrie. Elle est composée de quatre complexes protéiques : le complexe I (NADH ubiquinone réductase), le complexe II (succinate ubiquinone oxydoréductase), le complexe III (ubiquinone cytochrome C oxydoréductase) et le complexe IV (cytochrome C oxydase). Le catabolisme des nutriments pris en charge par les voies métaboliques telles que le cycle de Krebs, la β -oxydation des acides gras, ou encore la dégradation des acides aminés permet de générer, entre autres, du NADH (Nicotinamide adénine dinucléotide) et du FADH (Flavine adénine dinucléotide). Les électrons issus de ces équivalents réduits vont être transférés respectivement aux complexes I et II puis cheminer le long de la chaîne respiratoire. Ce flux d'électrons permet le pompage des protons par les complexes I, III et IV vers l'espace inter-membranaire créant ainsi un gradient électrochimique. Le retour des protons dans la matrice

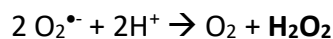
par la NADP synthase permet de coupler la synthèse d'énergie (ATP) et la réduction de l'oxygène respectivement au niveau des complexes V et IV :



Néanmoins, une partie de l'oxygène (< 4%) dissous dans le cytoplasme n'est pas réduite convenablement à cause des fuites d'électrons (Kim and Byzova, 2014). Les électrons s'échappant des complexes I et III de la chaîne respiratoire, interagissent directement avec l'oxygène et donnent naissance, en plusieurs étapes successives, à différents types de ROS (Kim and Byzova, 2014). Tout d'abord, l'oxygène va être réduit une première fois en radical superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$), une espèce chimique jouant à la fois le rôle d'oxydant et de réducteur au cours d'une réaction de dismutation :



La superoxyde dismutase (SOD), une métallo-enzyme, va ensuite catalyser la dismutation du $\text{O}_2^{\bullet-}$ en molécule d'eau et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) :



Ce dernier réagit avec le fer ferreux, par la réaction de Fenton, et donne naissance à la plus délétère des espèces radicalaires, le radical hydroxyle ($\bullet\text{OH}$) :



Le niveau d' H_2O_2 peut également être régulé par l'enzyme héminique catalase (CAT) ou par la glutathion peroxydase (GPx) pour respectivement accélérer sa dismutation ou réduire le glutathion et ainsi générer des molécules d'eau. L'oxygène peut également générer en cascade d'autres ROS secondaires comme les radicaux peroxydes (ROO^{\bullet}) qui, à leur tour, génèrent des hydroperoxydes (HOO^{\bullet}) puis des radicaux alkoxydes (RO^{\bullet}) (Figure 3) (Lee and Wei, 2007; Madamanchi and Runge, 2007).

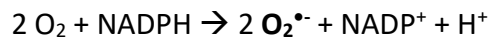
2-2) Autres sources de production de ROS : les enzymes

Il existe plusieurs enzymes productrices de ROS comme par exemple, les enzymes du réticulum endoplasmique (cytochromes P_{459}), les peroxyosomes, les lysosomes et les enzymes

du noyau (cytochromes oxydases). Seulement 3 enzymes, la NADPH oxydase membranaire, la xanthine oxydase et la NO synthase, jouent un rôle majeur dans la génération des ROS dans le système vasculaire.

2-2-1) La NADPH oxydase membranaire

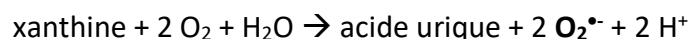
La NADPH oxydase membranaire, dite NOX, est une enzyme catalysant la réduction de l'O₂ en utilisant du NADPH comme donneur d'électron pour produire O₂^{•-} :



Sept isoformes ont été identifiées chez les mammifères parmi lesquelles NOX1, NOX2, NOX4 et NOX5, exprimées de manière variable dans le système vasculaire. Les NOX vasculaires sont exprimées dans les cellules endothéliales (NOX1, NOX2, NOX4 et NOX5), les CML (NOX1, NOX4, NOX5), les fibroblastes (NOX2, NOX4) et les monocytes, macrophages, neutrophiles ou cellules T (NOX2) (Drummond et al., 2011). L'activation des NOX peut survenir à la suite de divers stimuli tels que l'angiotensine II (Ang II), l'insuline, la thrombine, le TNF- α , les facteurs de croissance comme le PDGF ou encore le VEGF (Brandes and Kreuzer, 2005; Dikalov et al., 2008). Les stimuli pathologiques tels que l'hypertension, l'hypercholestérolémie et l'hyperglycémie, peuvent également activer les NOX (Ellulu et al., 2016; Loffredo et al., 2012; Santilli et al., 2015). L'ensemble de ces stimuli modifie l'activité ou l'expression des NOX, augmentant ainsi la production des ROS au niveau vasculaire (Guichard et al., 2006; Li et al., 2014; Migdal and Serres, 2011; Sumimoto, 2008).

2-2-2) La xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) est une autre source enzymatique de ROS, principalement identifiée dans les cellules endothéliales et le plasma (Guzik et al., 2006; Harrison et al., 2003). Elle intervient dans l'oxydation de la xanthine produisant ainsi de l'O₂^{•-} et de l'H₂O₂ (Harrison, 2004) :

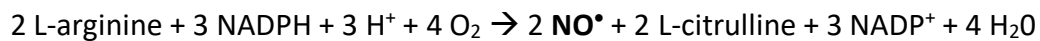


L'exposition des cellules endothéliales à la contrainte de cisaillement oscillatoire entraîne l'activation de la XO (McNally et al., 2003). L'activation de la XO est également stimulée en présence de l'Ang II ou de l'H₂O₂ dans les cellules endothéliales (Dikalov et al., 2008; Guzik et

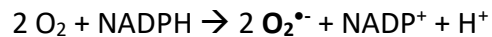
al., 2006; Landmesser and Drexler, 2007). Cette activation entraîne une production accrue de ROS.

2-2-3) L'oxyde nitrique synthase

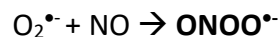
L'oxyde nitrique synthase (NOS) contribue également à la production des ROS. Il existe trois isoformes de NOS : neuronale (nNOS), endothéliale (eNOS) et inducible (iNOS). La eNOS est un homo-dimère actif constitué de deux oxygénases et de deux réductases. Chacun des dimères est relié par un cofacteur, BH4 (tétrahydrobioptérine), essentiel pour la synthèse du monoxyde d'azote. Le rôle de BH4 est d'assurer, en interagissant étroitement avec les deux sous-unités oxygénases, le bon transfert des électrons depuis le NADPH vers le site de fixation de la L-arginine. Cette interaction avec l'oxygène donne lieu à l'oxyde nitrique (NO•) et à la L-citrulline :



En cas de biodisponibilité faible ou d'absence de BH4 ou encore d'un faible apport en arginine, les deux sous-unités oxygénases de la eNOS fonctionnent de façon indépendante. Nous assistons alors à la production simultanée, d'une part du NO et d'une autre part du O₂•⁻ : on parle alors de découplage de la eNOS (Schmidt and Alp, 2007) :



Les molécules de NO• et O₂•⁻ ainsi formées réagissent ensemble pour former l'ion peroxydite (ONOO•), pro-oxydant très réactif et hautement athérogène (Figure 3) :



Par ailleurs, la forme inducible de NOS (iNOS), exprimée dans le système vasculaire dans des conditions d'infection ou d'inflammation, produit également du NO• en quantité importante (Vallance and Chan, 2001).

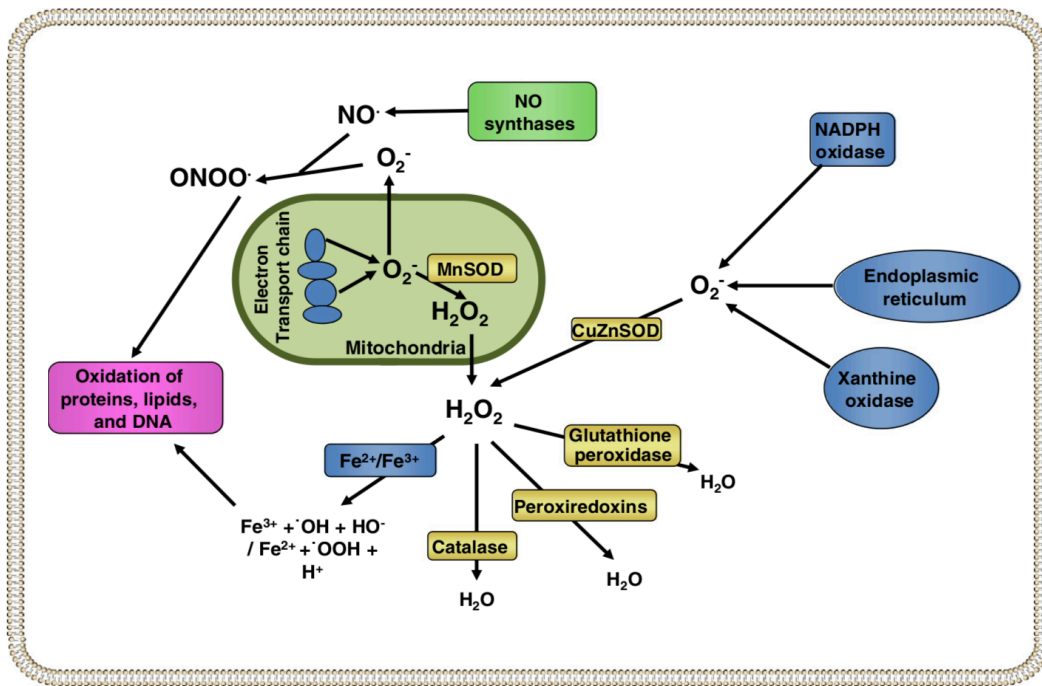


Figure 3. Les principales sources cellulaires de ROS. Le radical superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est essentiellement produit par la chaîne respiratoire mitochondriale, la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, le réticulum endoplasmique et la NOS découplée. La superoxyde dismutase (SOD) transforme le $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 qui sera détoxifié par la glutathion peroxydase, la peroxyrédoxine ou la catalase. NO^{\bullet} et $O_2^{\bullet-}$ réagissent ensemble pour former l'ion peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$). L' H_2O_2 , par la réaction de Fenton, donne naissance notamment à la plus délétère des espèces radicalaires, le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$) (Penney and Roy, 2013).

3) Rôle physiologique des ROS au sein de la paroi vasculaire

Dans des conditions d'homéostasie redox, les ROS sont produites et jouent un rôle de molécule signal capable de réguler des fonctions cellulaires aussi importantes que l'apoptose, l'angiogenèse, la croissance, la prolifération ou encore de moduler l'activité des facteurs de transcription (Freed and Gutterman, 2013).

Dans la paroi vasculaire, les cellules endothéliales sont exposées au flux sanguin, ce qui produit un stress mécanique essentiel au maintien de l'homéostasie de ces cellules. Le stress de cisaillement laminaire favorise la production d' $O_2^{\bullet-}$ et H_2O_2 induits par les NOX. Cela active par la suite les eNOS qui vont générer du NO, qui joue un rôle primordial dans l'homéostasie vasculaire en protégeant les cellules endothéliales (Bretón-Romero et al., 2012). Le NO^{\bullet} empêche l'adhésion et la migration des leucocytes, la prolifération des CML, l'adhésion et l'agrégation plaquettaires. Il possède une capacité antiathérogène globale et exerce des effets

vasoprotecteurs (Förstermann and Sessa, 2012; Sena et al., 2013). De plus, le NO[•] inhibe l'apoptose induite par l'Ang II en inhibant la voie des caspases, essentielle pour déclencher le programme de mort cellulaire (Dimmeler et al., 1997).

L'activation de NOX2 et NOX4 induite par le facteur de croissance VEGF entraîne une production de ROS dans les cellules endothéliales (Evangelista et al., 2012; Maraldi et al., 2010). Cette génération de ROS permet de stimuler les voies de signalisation, notamment Akt et ERK, contrôlées par le VEGF. La production VEGF-dépendante des ROS va donc, dans des conditions physiologiques, favoriser l'angiogenèse, la prolifération et la survie des cellules endothéliales (Colavitti et al., 2002; Ikeda et al., 2005; Kaplan et al., 2011; Yamaoka-Tojo et al., 2004).

A des doses physiologiques, les ROS jouent un rôle essentiel dans la signalisation et la régulation de fonctions fondamentales au niveau cellulaire. L'homéostasie redox, caractérisée par l'équilibre entre le niveau des ROS et les systèmes antioxydants, est garante du maintien de toutes les fonctions cellulaires dépendantes des ROS.

4) Les systèmes de défense antioxydants

Dans les cellules, plusieurs systèmes antioxydants, enzymatiques ou non, existent. Parmi les antioxydants non-enzymatiques, nous pouvons citer la vitamine C (acide ascorbique), la vitamine E (α -tocophérol), le glutathion (GSH), les caroténoïdes, les flavonoïdes, les polyphénols ou l'acide urique. Ce sont des composés de faible poids moléculaires, souvent apportés par l'alimentation, en particulier les fruits et légumes. A titre d'exemple, l'apport en vitamine C est nécessaire pour protéger le cofacteur BH4 contre l'oxydation et par conséquent, permet de stabiliser indirectement la eNOS afin de fournir des conditions optimales pour la synthèse du NO[•] dans les cellules endothéliales (Heller et al., 2001). Les oligoéléments comme le sélénium (présent dans les noix, les brocolis ou l'ail), le cuivre (présent dans le son, le seigle, le foie de veau) ou le zinc (présent dans la viande, le poisson, les céréales complètes et les légumes) agissent comme cofacteurs d'enzymes antioxydantes selon leur concentration (Arigony et al., 2013). Parmi les systèmes antioxydants majeurs, de nature enzymatique, nous pouvons citer la superoxyde dismutase (SOD), la

glutathion peroxydase (GPx), la catalase, la glutarédoxine, la thiorédoxine réductase (TrxR) et la thiorédoxine (Trx) (Valko et al., 2007).

4-1) La superoxyde dismutase

C'est une métalloprotéine représentant une des premières lignes de défense oxydante. Elle assure la transformation de l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 et en O_2 par une réaction de dismutation. Chez l'homme, il existe 3 isoformes de superoxyde dismutase (SOD). La SOD1 (Cu/Zn-SOD1) est une enzyme soluble du cytoplasme et de l'espace intermembranaire mitochondrial. La SOD2 (Mn-SOD2) existe dans la matrice mitochondriale alors que l'isoenzyme SOD3 (Cu/Zn-SOD3) est sécrétée, notamment par les macrophages et les CML (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). L'expression et la sécrétion de SOD3 sont induites par des facteurs vasoactifs comme l'Ang II ou l'histamine et inhibées par l'homocystéine. La diminution du taux d' $O_2^{\bullet-}$ par la SOD limite ainsi la transformation du NO^{\bullet} en $ONOO^{\bullet-}$ et préserve l'intégrité fonctionnelle des cellules endothéliales (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). Une activité élevée de SOD1 permet une protection contre les lésions vasculaires, particulièrement l'athérosclérose chez la souris (Liu et al., 2004; Tribble, 1999). Par ailleurs, une diminution de l'activité enzymatique de la SOD a été observée chez l'homme, lors d'une coronaropathie (Gupta et al., 2009). L'enzyme SOD2, en modulant le niveau des ROS mitochondriales, limite les dysfonctions endothéliales et l'apoptose et joue donc un rôle protecteur contre le développement de l'athérosclérose (Liu et al., 2004; Madamanchi and Runge, 2007; Madamanchi et al., 2005b; Papaharalambus and Griendling, 2007; Tribble, 1999).

4-2) Le système glutathion

Le glutathion est un tripeptide (Glu-Cys-Gly) présent sous forme réduite (GSH) et souvent retrouvé dans les agrumes. C'est un bon indicateur du niveau de peroxydation organique c'est à dire de l'état redox intracellulaire, puisque dans des conditions physiologiques, la forme réduite (GSH) prédomine par rapport à la forme oxydée (GSSG). Il possède des propriétés réductrices puisque le tripeptide est constitué d'un groupement thiol issu de la cystéine permettant de piéger facilement les ROS. C'est un substrat réagissant spécifiquement avec la glutathion peroxydase (GPx) pour réduire les molécules oxydées et

limiter les dommages oxydatifs au niveau cellulaire. La GPx est une enzyme cytosolique qui catalyse la réduction du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène, ainsi que la réduction des radicaux peroxyde en alcool et en oxygène. A l'issue de cette réaction, le glutathion est sous forme oxydée. Il est régénéré par la glutathion réductase qui fait appel à la NADPH provenant des mitochondries.

Plusieurs isoformes de la GPx sont connues dont l'isoforme prédominante, la GPx1. Des expériences ont révélé qu'un déficit en GPx1 entraîne une augmentation de la concentration des ROS dans la paroi aortique ainsi qu'une augmentation du stress oxydatif global. La carence en enzyme antioxydante GPx1 accélère et modifie également la progression des lésions athéroscléreuses chez les souris ApoE^{-/-} (Torzewski et al., 2007). L'absence de la GPx1 fonctionnelle accélère le processus athérogène associé au diabète par l'induction de marqueurs pro-inflammatoires et profibrotiques chez les souris ApoE^{-/-} rendues diabétiques avec la streptozotocine (Lewis et al., 2007). L'activité de la GPx1 est diminuée chez les patients atteints de coronaropathie (Blankenberg et al., 2003). De plus, des études ont montré que la surexpression de l'isoforme GPx4 protège les souris ApoE^{-/-} contre le développement de l'athérosclérose en diminuant la peroxydation lipidique et en inhibant la sensibilité des cellules vasculaires aux lipides oxydés (Guo et al., 2008).

4-3) Le système de la thiorédoxine

La thiorédoxine (Trx) est une protéine ubiquitaire à activité antioxydante. Elle se régénère sous l'action du NADPH et de la thiorédoxine réductase (TrxR) qui possède un groupement sélénocystéine dans son site actif. Elle intervient dans la dégradation des peroxydes lipidiques, du peroxyde d'hydrogène ainsi que dans la régénération du radical ascorbyl en acide ascorbique. La Trx exerce des actions antioxydantes directes et indirectes et joue un rôle vasoprotecteur. Cette protéine fera l'objet d'une description plus approfondie dans le chapitre 4.

En réponse à certains facteurs externes (traumatismes, UV, tabagisme...) ou internes (vieillesse, inflammation...) le niveau des ROS cellulaires augmente et dépasse les limites physiologiques. Un déséquilibre entre le niveau des ROS et les capacités antioxydantes s'installe, c'est le stress oxydatif. Les dommages oxydatifs touchant les macromolécules

(protéines, ADN, lipides...) entraînent des dysfonctions cellulaires impliquées dans l'installation et l'aggravation d'un grand nombre de pathologies, notamment l'athérosclérose.

5) Rôle physiopathologique des ROS, implication dans l'athérosclérose

Le stress oxydatif entraîne non seulement des dommages directs et irréversibles des macromolécules mais perturbe également toutes les voies de signalisation dépendantes de l'état redox au sein de la paroi artérielle (Münzel et al., 2017; Stocker and Keaney, 2004). L'exemple type de ces perturbations réside dans la voie de signalisation vasculo-protectrice dépendante du NO[•]. L'inactivation du NO[•], suite à sa réaction avec l'anion superoxyde et la formation de l'ion peroxynitrite (ONOO[•]), entraîne la perte des effets anti-inflammatoires et vasodilatateurs, deux fonctions majeures au sein de la paroi vasculaire. La diminution de la biodisponibilité du NO[•] est responsable du dysfonctionnement endothélial qui correspond à l'étape initiatrice du processus athérogène (Blough and Zafiriou, 1985; Gryglewski et al., 1986; Heitzer et al., 2001; Miller et al., 1998). De plus, le peroxynitrite déclenche l'oxydation de petites molécules antioxydantes comme le glutathion et le cofacteur BH4 (Szabó et al., 2007). La baisse de la biodisponibilité de ce cofacteur est responsable du découplage de la eNOS qui induit la production du superoxyde (O₂^{•-}) au détriment du NO[•], aggravant l'état d'oxydation au sein de la paroi artérielle (Harrison et al., 2010; Laursen et al., 2001). Par ailleurs, O₂^{•-} est le précurseur de l'H₂O₂ qui peut se convertir en OH⁻. En raison de sa forte réactivité, OH⁻ peut endommager la plupart des compartiments cellulaires et contribuer, avec l'H₂O₂, à l'oxydation des LDL dans la paroi vasculaire (Münzel et al., 2017; Peluso et al., 2012). Les LDLox sont cytotoxiques pour les cellules vasculaires et favorisent l'inflammation en augmentant l'infiltration des monocytes dans l'espace sous-endothélial contribuant par la suite à la formation des cellules spumeuses (Tsimikas and Miller, 2011).

Les macrophages, principaux constituants cellulaires des plaques d'athérosclérose, sont largement influencés par les ROS. Ces derniers et les LDLox augmentent la libération du facteur GM-CSF et de la chimiokine MCP-1, entraînant l'attraction et l'adhérence des monocytes à l'endothélium vasculaire (Garrido-Urbani et al., 2014; Hansson and Libby, 2006). L'augmentation des ROS peut également activer des facteurs de transcription sensibles à l'état redox (NF-κB, AP-1, HIF-1, IGF-1), stimuler la production des cytokines pro-inflammatoires

(TNF- α , IL-2, IL-1 β ...) et de protéines d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, MCP-1, Sélectine E). Ces facteurs favorisent l'installation de l'inflammation et les interactions endothélio-leucocytaires ou provoquent l'accumulation des macrophages et leur transformation en cellules spumeuses (composante lipidique de la plaque d'athérome).

L'impact biologique des ROS dépend non seulement de leur quantité mais aussi de leur nature chimique, leur localisation dans les tissus, leur taux de formation et de dégradation. L'ensemble de leurs perturbations induit un remodelage pathologique de la paroi artérielle et, dans ce contexte pro-oxydant, les macrophages jouent un rôle majeur à tous les stades de l'athérogenèse.

Chapitre 3

Les macrophages, acteurs majeurs de l'inflammation

L'initiation et la progression de l'athérosclérose dépendent de l'inflammation locale et de l'accumulation de lipides dans la paroi vasculaire. Bien que de nombreuses cellules soient impliquées dans le développement de cette pathologie, les macrophages dérivant du réservoir monocyttaire sanguin en sont les principaux contributeurs.

Les monocytes sont produits par la moelle osseuse. Ils sont les descendants des cellules souches hématopoïétiques, des progéniteurs myéloïdes (CFU-GEMM), des progéniteurs granulocytes/monocytes (CFU-GM) et enfin des progéniteurs monocytaires différenciés (CFU-M). Une fois différenciés en leucocytes, ils migrent dans la circulation sanguine où ils séjournent de quelques heures à quelques jours. En réponse à des signaux chimiques inflammatoires, ils migrent dans les tissus par diapédèse afin de se différencier en macrophages tissulaires. Les monocytes appartiennent au système des phagocytes mononuclés et jouent un rôle important dans l'immunité innée et acquise de l'organisme. Ils permettent le renouvellement continu des populations de macrophages et des cellules dendritiques afin de maintenir l'homéostasie cellulaire et d'assurer l'immunité innée et adaptative lors de l'inflammation.

Les macrophages participent à de nombreuses fonctions physiologiques et processus pathologiques. Ce sont des médiateurs de l'homéostasie et de la réparation tissulaires ainsi que des médiateurs de la réponse aux agents pathogènes et de la résolution du processus inflammatoire (Gilroy et al., 2004; Gordon, 2007; Lawrence et al., 2002). Ils jouent un rôle central à tous les stades de la maladie, depuis l'initiation de la lésion jusqu'à la rupture de la plaque artérielle (Smith et al., 1995).

1) Plasticité phénotypique des macrophages dans l'athérosclérose

La plaque d'athérosclérose est caractérisée par la présence de populations hétérogènes de macrophages. Exposés à des signaux micro-environnementaux spécifiques, les monocytes circulants se différencient en macrophages dans la paroi artérielle. Ces

derniers, sensibles à leur microenvironnement tissulaire, font face aux cytokines, aux lipides et aux facteurs de croissance (Wolfs et al., 2011). Les macrophages se polarisent et voient leur phénotype et leur fonction se modifier sous l'influence de ces facteurs. Ces cellules immunitaires, résidentes ou dérivant des monocytes circulants, sont dotées d'une grande plasticité phénotypique (Colin et al., 2014; De Paoli et al., 2014). Elle peut être évaluée à la fois par l'expression de nombreux marqueurs de surface et par leur sécrétome. Le concept de classification des macrophages a été établi dans les années 1960, lorsque le terme d'activation des macrophages (activation classique) a été introduit pour la première fois par Mackaness dans un contexte d'infection pour décrire l'activité microbicide des macrophages (Mackaness, 1962).

1-1) Les phénotypes conventionnels

Classiquement, le concept d'hétérogénéité des macrophages distingue deux phénotypes extrêmes, les macrophages M1 pro-inflammatoires et les macrophages M2 anti-inflammatoires. Ces deux types de macrophages sont les plus couramment étudiés par la communauté scientifique et sont considérés comme conventionnels.

1-1-1) Le phénotype M1 : profil pro-inflammatoire

Des facteurs, comme les cytokines inflammatoires $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$ ou les produits bactériens tels que les lipopolysaccharides (LPS), entraînent seuls ou en combinaison l'activation "classique" des macrophages vers un phénotype M1 (Mantovani et al., 2009) (Figure 4). Les lymphocytes T auxiliaires activés (Th1) sécrètent des facteurs, comme l'interféron-gamma ($IFN-\gamma$), qui activent également ces macrophages (Dalton et al., 1993). Les protéines $TNF-\alpha$ ou CD86 représentent les marqueurs caractéristiques des macrophages de type M1. Les macrophages M1 vont ainsi sécréter des cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines $IL-6$, $IL-1\beta$, $IL-12$ et $IL-23$ ainsi que le $TNF-\alpha$ (Mosser, 2003; Verreck et al., 2004). Ces sécrétions contribuent à l'installation d'une réponse inflammatoire au niveau tissulaire.

1-1-2) Le phénotype M2 : profil anti-inflammatoire

L'activation "alternative" des macrophages, par les cytokines anti-inflammatoires telles que IL-4, IL-13 et IL-10 sécrétées par les lymphocytes T auxiliaires (Th2), correspond au phénotype M2 (Gordon, 2003; Gordon and Martinez, 2010; Stein et al., 1992; Verreck et al., 2004) (Figure 4). Les macrophages M2 jouent un rôle majeur dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire. De plus, les équipes de Bouhleb *et al.* et Ohashi *et al.* démontrent que respectivement les récepteurs nucléaires PPAR- γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors gamma) et l'adiponectine orientent également les macrophages vers un phénotype M2 (Bouhleb et al., 2007; Lovren et al., 2010; Ohashi et al., 2010). Les récepteurs au mannose (MR ou CD206) représentent les marqueurs caractéristiques d'un macrophage de phénotype M2.

Mosser a classé ces macrophages en 4 sous-populations (M2a, M2b, M2c et M2d) (Mosser and Edwards, 2008). Les interleukines IL-4 et IL-13 orientent les macrophages vers un phénotype M2a. Ils expriment des taux élevés du récepteur du mannose (CD206) à leur surface et sécrètent des facteurs pro-fibrotiques tels que la fibronectine, les facteurs de croissance IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1) et TGF- β (Transforming Growth Factor bêta), contribuant à la réparation tissulaire (Lee et al., 2001). Les macrophages M2a sont ainsi nommés "macrophages cicatrisants". Les macrophages M2b sont induits par les complexes immuns (IC) en combinaison avec le LPS ou l'IL-1 β (Martinez et al., 2008) et les macrophages M2c sont induits par les glucocorticoïdes ou la combinaison entre le M-CSF et l'IL-10 ou le TGF- β (Zizzo and Cohen, 2013). Ce sont des macrophages appelés "macrophages régulateurs" car ils présentent des niveaux d'expression élevés de la tyrosine kinase MerTK (Myeloid-epithelial-reproductive Tyrosine Kinase) qui leur fournissent une capacité d'efferocytose élevée (Martinez et al., 2008; Zizzo et al., 2012). Ils phagocytent les macrophages M1 en apoptose, ce qui résout l'état inflammatoire. Les macrophages M2d sont induits par co-stimulation avec les ligands du récepteur Toll-like (TLR) et les agonistes du récepteur A_{2A} de l'adénosine (A_{2R}). La signalisation de l'adénosine supprime l'expression du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IFN- γ et confère un profil pro-angiogénique aux macrophages, induisant l'expression de l'interleukine IL-10 et du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Ferrante et al., 2013; Pinhal-Enfield et al., 2003).

Ainsi, l'accumulation des macrophages M2 réduit l'inflammation et induit le remodelage, la réparation tissulaire et un potentiel angiogénique *via* leur capacité d'efferocytose et la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et de facteurs de croissance (Jetten et al., 2014; Mantovani et al., 2004, 2009; Odegaard and Chawla, 2008; Stein et al., 1992).

1-2) Les autres phénotypes de macrophages

La polarisation des macrophages au sein de la plaque d'athérosclérose est plus complexe que ce que décrit le paradigme M1 et M2. Outre les macrophages de type M1 et M2, d'autres phénotypes de macrophages coexistent au sein de la plaque d'athérosclérose chez l'homme et la souris. Ces sous-populations de macrophages ont été identifiées et caractérisées : les macrophages Mhem, Mox, M4, HA-mac et M(Hb) (Figure 4). Dans notre étude, nous nous sommes uniquement intéressés aux deux phénotypes conventionnels.

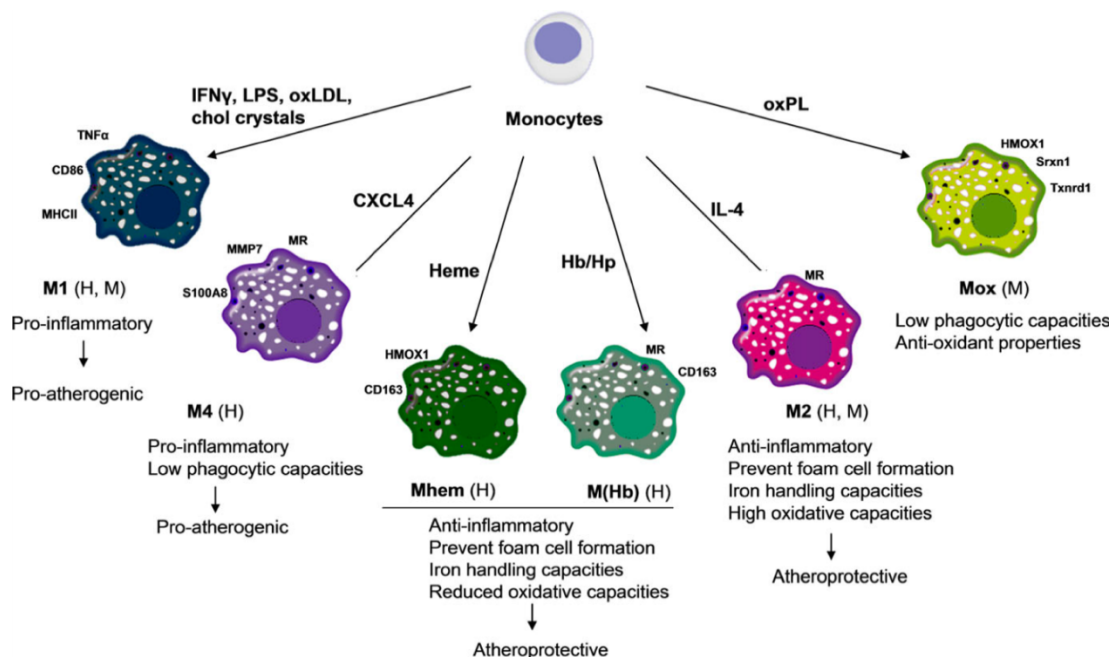


Figure 4. Aperçu des différentes sous-populations de macrophages existantes au sein de la plaque d'athérosclérose. Au niveau des lésions athérosclérotiques, les macrophages adoptent un phénotype distinct en réponse à différents stimuli spécifiques. Les macrophages M1 et M4 ont des propriétés pro-inflammatoires, pro-oxydantes, et pro-athérogènes, contrairement aux macrophages M2, Mhem, M(Hb) et Mox. Les différentes sous-populations peuvent être identifiées par des marqueurs apparentés (TNF- α , CD86, HMOX-1,...) (Colin et al., 2014).

Au cours des dernières années, les résultats dans le domaine de l'immuno-métabolisme ont établi un lien entre l'état du métabolisme énergétique des différents phénotypes de macrophages et leurs fonctions (O'Neill and Pearce, 2016).

2) Plasticité métabolique des macrophages

Les voies métaboliques jouent un rôle majeur dans la fonction des cellules immunitaires dont les macrophages. La glycolyse, le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA), la voie des pentoses phosphates (PPP), l'oxydation des acides gras (FAO), la synthèse des acides gras et le métabolisme des acides aminés sont des voies métaboliques formant un réseau de réactions biochimiques hautement interconnectées, requises pour générer des produits métaboliques (O'Neill et al., 2016). Les macrophages, en réponse à leur microenvironnement, adoptent un profil métabolique unique pour accomplir des fonctions spécifiques (inflammation, réparation, résolution de l'inflammation, efferocytose...) (Biswas and Mantovani, 2012).

2-1) Profil métabolique des macrophages M1

Dans les macrophages de type M1, des facteurs comme le LPS et l'IFN- γ déclenchent une surexpression du transporteur de glucose GLUT-1, ce qui entraîne une augmentation du transport du glucose extracellulaire (Freemerman et al., 2014) (Figure 5). Le glucose est ensuite phosphorylé par l'hexokinase en Glucose-6-Phosphate (G6P) qui est à son tour métabolisé *via* la glycolyse et la voie PPP pour être transformé en pyruvate. Ce métabolite est alors soit converti en lactate par la lactate déshydrogénase, soit introduit dans le cycle TCA.

La voie PPP est une branche oxydante qui produit du NADPH, un cofacteur nécessaire pour maintenir l'équilibre redox cellulaire. La synthèse accrue de NADPH est essentielle pour la régénération des antioxydants comme le glutathion ; elle alimente également les voies de production du NO et des ROS *via* respectivement iNOS et NOX (Ham et al., 2013). Le NADPH interagit étroitement avec le métabolisme des acides aminés qui module aussi les fonctions du macrophage puisque l'arginine est métabolisée par la NOS pour générer de l'oxyde nitrique (NO) et de la L-citrulline.

Dans les macrophages M1, le cycle TCA présente une double interruption, au niveau d'une part de la succinate déshydrogénase et d'autre part de l'isocitrate déshydrogénase

(Cordes et al., 2016; Lampropoulou et al., 2016) ; cela entraîne l'accumulation de deux métabolites, le citrate et le succinate. Le citrate, une fois exporté dans le cytoplasme, alimente la voie de biosynthèse des acides gras (la lipogénèse).

L'accumulation du succinate, également alimentée par le métabolisme de la glutamine, conduit à la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 α impliqué dans la transcription de gènes pro-inflammatoires et glycolytiques (Figure 5) (Geeraerts et al., 2017; Hayashi et al., 2004; Tannahill et al., 2013). Des études récentes ont montré que le succinate contribue également à l'induction de la production de ROS par la mitochondrie (Mills et al., 2016).

Enfin, dans le macrophage M1, étant donné que le cycle TCA est rompu et que la production de NO inhibe la chaîne respiratoire, la phosphorylation oxydative (OXPHOS) est fortement diminuée (Clementi et al., 1998). La perturbation de l'OXPHOS, démontrée par Van den Bossche, empêche la repolarisation du macrophage M1 vers un phénotype M2 (Van den Bossche et al., 2016).

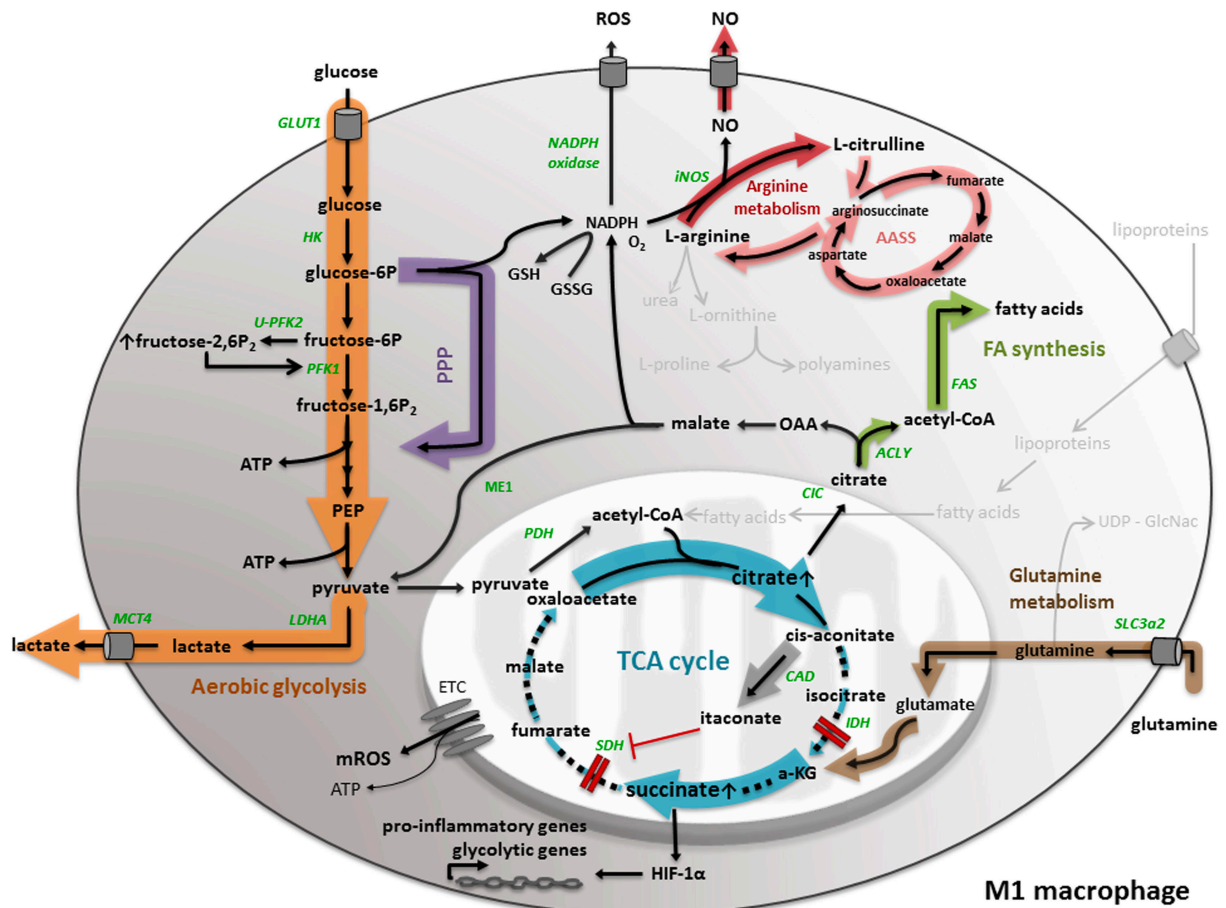


Figure 5. Schéma représentant les voies métaboliques impliquées dans les macrophages pro-inflammatoires de phénotype M1. Le métabolisme des macrophages M1 se caractérise par une glycolyse augmentée, un flux à travers la voie PPP accru, une synthèse d'acides gras et un cycle TCA interrompu entraînant une accumulation de succinate et de citrate. L'ensemble des métabolites ainsi générés participe et contribue aux fonctions pro-inflammatoires du macrophage (Geeraerts et al., 2017).

2-2) Profil métabolique des macrophages M2

Contrairement aux macrophages M1, les macrophages M2 produisent préférentiellement de l'ATP à partir du cycle TCA couplé à l'OXPHOS et ce, au détriment de la glycolyse (Galván-Peña and O'Neill, 2014) (Figure 6). De plus, des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-4, stimulent l'expression de la sedoheptulose kinase (CARKL). Cette kinase régule négativement la voie PPP. A l'inverse, CARKL est plutôt inhibée par les stimuli inflammatoires (LPS, ...) (Haschemi et al., 2012). Le métabolisme énergétique des macrophages M2 est orienté vers la β -oxydation des acides gras. Les lipoprotéines, telles que

les LDL ou les VLDL, sont les principales sources d'acides gras. Elles sont transportées *via* les récepteurs scavengers (CD36) présents à la surface des macrophages M2, puis acheminées vers les mitochondries à l'aide de la carnitine O-palmitoyltransférase 1A (CPT-1A) (Huang et al., 2014; Malandrino et al., 2015). Les acides gras transformés en acétyl-CoA vont entrer dans le cycle TCA également alimenté par le catabolisme de la glutamine (Jha et al., 2015; Vats et al., 2006). L'activité accrue du cycle TCA est couplée à une production de quantité élevée d'ATP suite à l'induction de l'OXPPOS.

Enfin, l'activité de l'arginase-1 (ARG-1) permet la synthèse de l'urée et de la L-ornithine et ensuite la production à la fois de L-proline et de polyamines. Les acides aminés L-proline sont essentiellement utilisés pour la synthèse du collagène contribuant à la réparation tissulaire, une des caractéristiques fonctionnelles du macrophage de phénotype M2 (Geeraerts et al., 2017; Koelwyn et al., 2018; Rath et al., 2014). De plus, le catabolisme accru des lipides réduit leur accumulation et contribue aux réponses anti-inflammatoires caractéristiques des macrophages de phénotype M2.

L'ensemble de ces données montre que le métabolisme énergétique des macrophages constituerait le lien entre le microenvironnement et l'orientation phénotype et fonctionnelle de ces cellules.

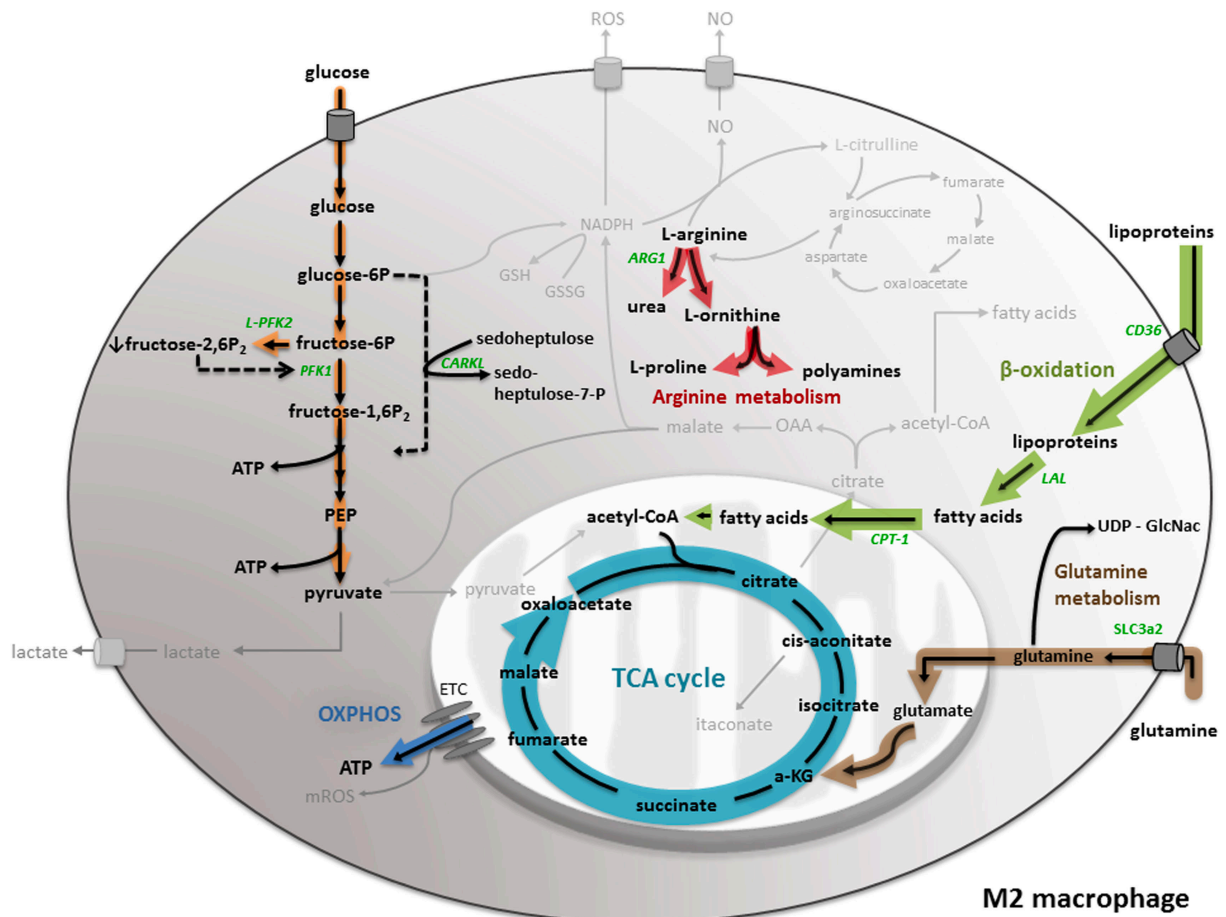


Figure 6. Schéma représentant les voies métaboliques impliquées dans les macrophages anti-inflammatoires de phénotype M2. Le métabolisme des macrophages M2 se caractérise par une glycolyse diminuée et une régulation négative de la voie PPP qui ralentissent le flux du glucose. Les macrophages M2 produisent principalement de l'ATP à travers le cycle TCA couplé à la phosphorylation oxydante (OXPHOS). Pour alimenter le cycle TCA, les macrophages M2 dépendent de l'oxydation des acides gras et du métabolisme de la glutamine. L'ensemble des métabolites ainsi générés participe et contribue au profil anti-inflammatoire du macrophage (Geeraerts et al., 2017).

3) Les macrophages et la genèse de l'inflammation au sein de la plaque d'athérosclérose

Des macrophages de phénotype différent coexistent au sein de la plaque d'athérosclérose caractérisée par un microenvironnement complexe où se retrouvent des réactions inflammatoires (cytokines, chimiokines...), des lipides (LDLox, cristaux de cholestérol, acide gras) (Adamson and Leitinger, 2011)) et des ROS. Ce microenvironnement favoriserait une polarisation des macrophages préférentiellement vers un phénotype dominant de type M1 (40% M1 et 20% M2) comme l'ont démontré Kadl *et al.* au sein de la

plaque d'athérome murine (Kadl et al., 2010). De même, des études récentes indiquent que les macrophages M1 prédominent dans les plaques symptomatiques humaines, en particulier dans des zones vulnérables (régions de "l'épaule" de la plaque), alors que les macrophages M2 dominent dans la coiffe fibreuse, riche en collagène. Les macrophages M1 et M2 coexistent donc au sein de la plaque et aujourd'hui, il est bien établi que si le rapport des macrophages M1/M2 est augmenté, basculant en faveur des macrophages M1 inflammatoires, ce déséquilibre signe l'aggravation et explique la vulnérabilité de la plaque d'athérosclérose humaine (Roma-Lavisse et al., 2015; Stöger et al., 2012).

De plus, les macrophages sont dotés de différents récepteurs présents à leur surface membranaire tels que les récepteurs TLR (Toll like receptor) et les récepteurs scavengers (CD36, SR-A, ...). Ces récepteurs respectivement activent l'expression de cytokines inflammatoires et captent massivement les LDLox pour se transformer en cellules spumeuses (Li and Sun, 2007; Steinberg, 2002). Ils stimulent la production de facteurs de croissance (GM-CSF, M-CSF) pour maintenir le développement, la prolifération et la survie du macrophage (Clinton et al., 1992; Smith et al., 1995). Les macrophages participent à l'angiogenèse et à la réparation tissulaire en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques (VEGF) (Ramos et al., 1998).

Enfin, les macrophages M1 produisent également des protéases comme les élastases et les métalloprotéases qui favorisent la dégradation de la matrice extracellulaire fragilisant ainsi les plaques d'athérosclérose dont la rupture conduit à la formation d'un thrombus artériel et aux accidents cardiovasculaires (Newby, 2008).

L'ensemble de ces résultats montre bien la contribution majeure des macrophages dans le processus athérogénique, par leur capacité à adapter leurs phénotypes métabolique et fonctionnel au microenvironnement complexe de la plaque d'athérome. A ce titre, au sein de la paroi artérielle, les conditions pro-oxydantes favoriseraient plutôt la polarisation des macrophages vers le phénotype inflammatoire M1, soulignant ainsi un défaut de résolution du processus inflammatoire nécessaire à la réparation tissulaire. L'une des problématiques majeures de l'athérosclérose résiderait donc dans la compréhension des mécanismes régissant la transition phénotypique des macrophages, permettant la résolution inflammatoire, la diminution du stress oxydatif et la réparation tissulaire.

Chapitre 4

La Thiorédoxine-1, un antioxydant majeur

Comme nous l'avons vu précédemment, pour se protéger des effets délétères des ROS, l'organisme dispose de systèmes de défenses antioxydantes comme la glutarédoxine, la catalase, la superoxyde dismutase ou encore la thiorédoxine (Valko et al., 2007). Nous nous focaliserons essentiellement sur l'un des systèmes antioxydants majeurs, le système de la thiorédoxine (Trx). Chez les mammifères, il existe 3 isoformes de Trx codées par trois gènes différents :

- la Trx-1, ubiquitaire et essentiellement cytosolique. Nous nous intéresserons plus particulièrement à cette isoforme dans ce chapitre.
- la Trx-2, localisée dans les mitochondries. Elle est ubiquitaire avec une expression particulièrement élevée dans le cerveau (Rybnikova et al., 2000). C'est une protéine de 18kDa ayant un rôle important dans le développement embryonnaire et dans la prévention du dysfonctionnement mitochondrial (Lowe and Galley, 2011; Nonn et al., 2003; Spyrou et al., 1997). Par ailleurs, la Trx-2 améliore la fonction des cellules endothéliales et réduit les lésions athéromateuses des souris ApoE^{-/-} (modèle d'athérosclérose). Ces effets passeraient par la réduction du stress oxydatif et l'amélioration de la biodisponibilité du NO (Zhang et al., 2007).
- la Trx-3, spécifiquement exprimée dans les testicules et plus particulièrement localisée dans l'appareil de Golgi des spermatoocytes et des spermatoïdes. Elle constitue un nouvel auto-antigène de sperme (Miranda-Vizueté et al., 2001, 2004).

1) La Trx-1 : du gène à la protéine

La Trx-1 a été isolée et caractérisée pour la première fois par l'équipe de Reichard en 1964 (Laurent et al., 1964). Le gène codant pour la Trx-1 humaine (hTrx-1), localisé sur le chromosome 9 sur plus de 13Kb, est organisé en 5 exons séparés par 4 introns (Figure 7). Le promoteur de la Trx-1 contient deux sites initiant la transcription dont le premier appelé TSS1 se trouve à -110pb par rapport au codon de départ ATG (Tonissen and Wells, 1991). La transcription du gène de la Trx-1 est améliorée par la présence de trois sites de liaison spécifique à la protéine 1 (SP1) qui se trouvent en amont de TSS1 (entre -244 et -183pb)

(Bloomfield et al., 2003). Le deuxième site d'initiation appelé TSS2 se trouve à -74pb et est bordé par une boîte TATA-box située à -102pb. La TATA-box se trouvant en aval de TSS1, le site d'initiation opérationnel du gène de la Trx-1 serait uniquement le TSS2 (Kaghad et al., 1994) (Figure7).

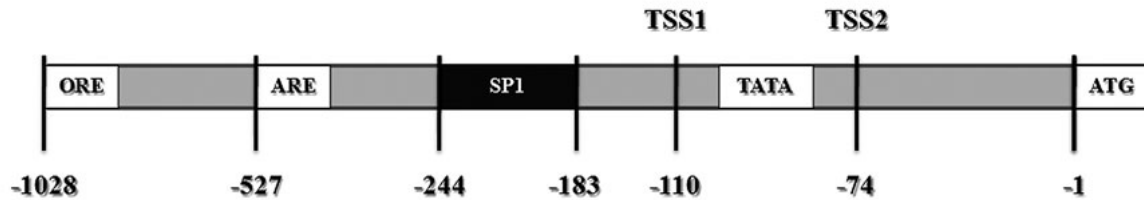


Figure 7. Séquence représentant la région promotrice de la hTrx-1. Le promoteur est composé de deux sites d'initiation TSS1 et TSS2, de 3 sites de liaison à la protéine SP1, d'une boîte TATA-box, d'un élément ORE (oxidative stress responsive element) et d'un élément ARE (antioxydant response element) permettant l'activation du gène hTrx-1 (Mahmood, 2014).

Pour tous les organismes vivants, la Trx-1 (12kDa) est très conservée et est structurée autour d'un noyau central de cinq feuillets β pliés, trois brins β parallèles et deux brins β antiparallèles, entourés de quatre hélices α (Figure 8). Cette disposition lui confère une structure globulaire compacte et stable à haute température (Aguado-Llera et al., 2011; Holmgren, 1985; Lee et al., 2013).

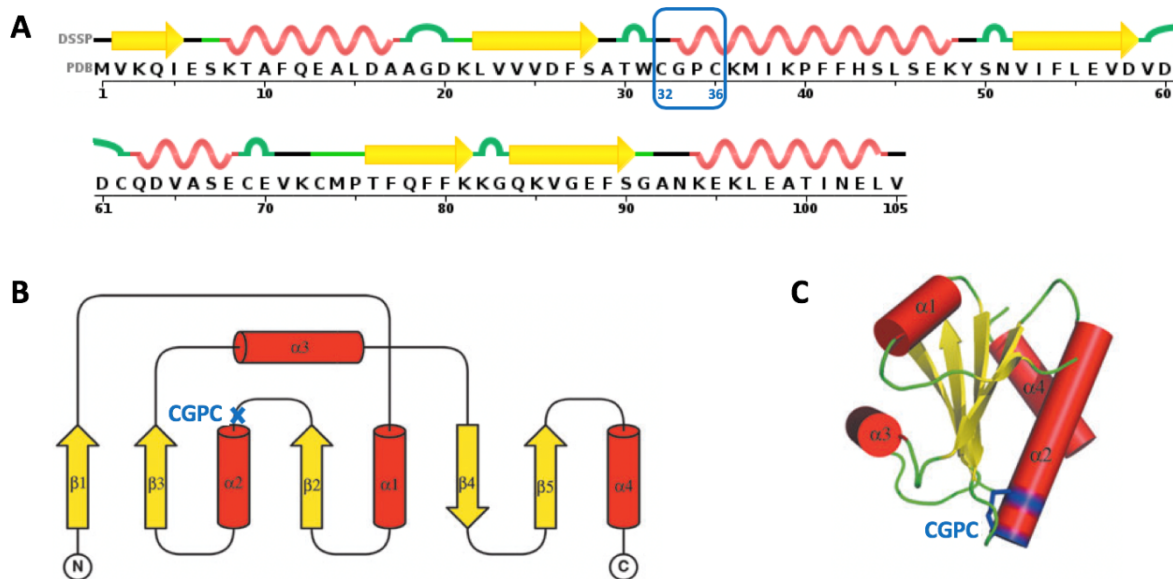


Figure 8. Séquence et structure de la hTrx-1. (A) Séquence de la Trx-1. (B) Représentation de la structure secondaire et (C) de la structure tridimensionnelle de la Trx-1. La structure se compose de 4 hélices α et d'un feuillet central à 5 brins β . Le motif $C^{32}XXC^{35}$ conservé est situé à l'extrémité N-

terminale de l'hélice $\alpha 2$. Les hélices α sont représentées en rouge, les brins β en jaune et le site actif ainsi que la liaison disulfure entre les deux cystéines en bleu (DSSP et PDB : code 1ERT) (Collet and Messens, 2010).

Un site actif au sein de cette protéine, localisé au début de la seconde hélice α (Figure 8), est composé de deux résidus cystéine (position 32 et 35) qui bordent de chaque côté la glycine et la proline (-Cys³²-Gly-Pro-Cys³⁵-). Cette séquence dithiol (C³²XXC³⁵), hautement conservée à travers les espèces, joue un rôle fondamental dans les fonctions cellulaires de la Trx-1 (Berndt et al., 2008; Holmgren, 1968; Lee et al., 2013; Mahmood, 2014).

2) La Trx-1 : les fonctions cellulaires

Depuis sa découverte en 1964, le nombre de publications au sujet de la Trx-1 est en croissance exponentielle, soulignant l'importance fonctionnelle de cette protéine. Non seulement elle joue un rôle majeur dans le maintien de l'équilibre redox mais assure également d'autres fonctions cellulaires aussi importantes que la différenciation ou l'apoptose (Lu and Holmgren, 2012). En témoigne la létalité de son invalidation chez la souris homozygote (Trx^{-/-}). (Matsui et al., 1996; Nonn et al., 2003)

2-1) La Trx-1 : rôle majeur dans le maintien de l'équilibre redox

La Trx-1 est une protéine capable, à l'état réduit, de maintenir l'équilibre redox au niveau cellulaire, *via* des réactions d'échange de thiol-disulfure. La Trx-1 oxydée est réduite de manière spécifique par la Trx réductase (TrxR) dont l'activité dépend du NADPH. Ainsi, le NADPH, la TrxR et la Trx-1 constituent le "système de la Trx-1" (Figure 9) (Mahmood, 2014).

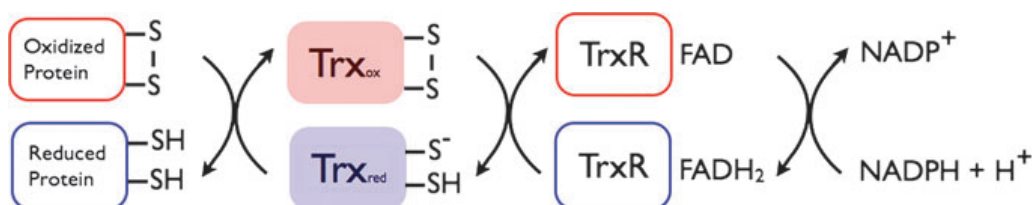


Figure 9. Le système de la Trx-1. La Trx-1 réduite contribue au maintien d'un environnement réducteur pour les protéines oxydées. Une fois oxydée, la Trx-1 est régénérée par la thiorédoxine réductase (TrxR) NADPH-dépendante (Collet and Messens, 2010).

2-1-1) Le mécanisme redox de la Trx-1

La Cys³² en N-terminale, de la Trx-1 réduite, est sous forme déprotonée et peut donc agir comme nucléophile en attaquant les ponts disulfures des protéines oxydées (S-S). La fonction redox de la Trx-1 dérive de cette attaque nucléophile où les électrons de la Cys³² vont être transférés vers la protéine cible. Cette attaque permet alors la formation d'un pont disulfure entre la Trx-1 et la protéine cible. Leurs thiols C-terminal respectifs ainsi libérés (-SH) vont ensuite être activés sous forme de thiolate (-S⁻) pour permettre la dissociation du complexe. Enfin, le thiolate porté par la Cys³⁵ C-terminale de la Trx-1 attaque directement la Cys³² N-terminale de la Trx-1 formant ainsi un nouveau pont disulfure entre les cystéines du site catalytique de la Trx-1. Par conséquent, la protéine réduite est dissociée de la Trx-1 oxydée. La TrxR NADPH-dépendante permet ensuite à la Trx-1 de retrouver sa forme réduite et de redémarrer un autre cycle de réduction (Figure 10) (Collet and Messens, 2010).

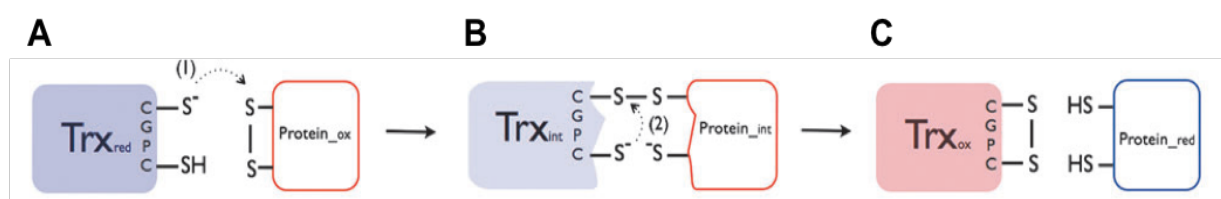


Figure 10. Mécanisme de réduction d'une protéine oxydée sous l'action de la Trx-1. (A) Le thiolate de la cystéine N-terminale nucléophile attaque le pont disulfure de la protéine oxydée. **(B)** Il en résulte un complexe intermédiaire disulfure mixte entre la Trx-1 et la protéine cible. **(C)** La protéine cible est ensuite réduite suite à une attaque nucléophile du thiolate C-terminal du motif C³²XXC³⁵ et la Trx-1 est oxydée (Collet and Messens, 2010).

2-1-2) Régénération de la Trx-1 par la TrxR

La TrxR est un homodimère antiparallèle possédant une coenzyme FAD. Ces deux sous-unités identiques contiennent deux sites actifs, l'un en N-terminal Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys et l'autre en C-terminal Gly-Cys-SeCys-Gly (il contient une sélénocystéine). Ces deux sites sont essentiels pour maintenir la Trx-1 à l'état réduit et donc dans un état actif. La première étape implique la réduction de la FAD par le NADPH provenant de la voie des pentoses. Les électrons provenant du FAD sont ensuite transférés sur le site actif Cys-Val-Asn-Val-Gly-Cys de la même sous-unité formant un motif dithiol (-SH). Ce motif n'interagit pas avec la protéine cible mais

réduit la sélénocystéine (-SH) du site Gly-Cys-SeCys-Gly présent dans la deuxième sous-unité de la TrxR. À partir de là, les électrons du sélénothiols interagissent avec les cystéines du site actif de la Trx-1 oxydée pour y réduire le pont disulfure (Figure 11) (Holmgren and Lu, 2010; Lee et al., 2013).

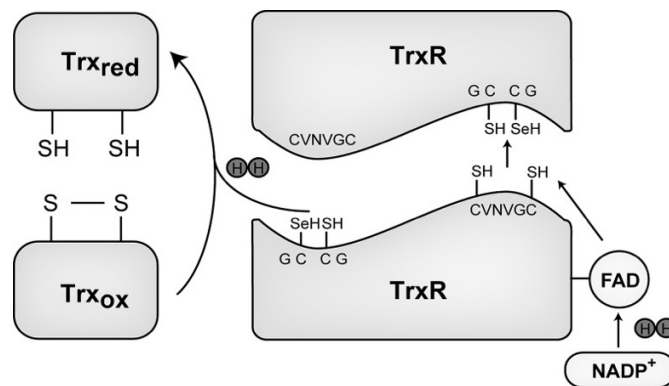


Figure 11. Réaction de réduction de la Trx-1 par la TrxR. Les électrons transférés du NADPH au FAD réduisent ce dernier. Les électrons sont ensuite transférés au pont disulfure actif N-terminal du site CVNVGC présent dans la même sous-unité de la TrxR pour former un motif dithiol. Ce motif dithiol réduit le motif sélényyle C-terminal en sélénothiol du site actif C-terminal GCSeCG de l'autre sous-unité de l'homodimère de la TrxR. Le motif de sélénothiol réduit peut ainsi à son tour réduire le pont disulfure du site actif de la Trx-1 (Lee et al., 2013).

2-1-3) Détoxification des ROS par la Trx-1

La Trx-1 a également un rôle indispensable dans la régénération des enzymes antioxydantes comme les peroxiredoxines (Prx) et les méthionines sulfoxydes réductases (Msr). Les Prx sont une famille de peroxydases réduisant les peroxydes tels que H_2O_2 , les peroxydes lipidiques et les peroxyxynitrites. Leur structure cristallographique a révélé que les Prx forment un homodimère antiparallèle. Les 2 domaines sont reliés par une liaison disulfure intermoléculaire entre la cys⁴⁷ C-terminale d'un monomère et la cys¹⁷⁰ C-terminale de l'autre monomère. Ces deux résidus hautement conservés attribuent à la Prx sa fonction antioxydante en établissant des cascades d'oxydoréduction éliminant ainsi les peroxydes. Sa forme oxydée est régénérée à son tour par la Trx-1 réduite. Il a été démontré que la fonction de la Prx est étroitement dépendante du pouvoir réducteur de la Trx-1. En effet, l'absence de régénération de la Prx par la Trx-1 conduit à une augmentation du niveau des ROS et à l'installation de certaines pathologies telles que l'athérosclérose (Lee et al., 2013; Rhee and

Woo, 2011). Par ailleurs, la Trx-1 réduit et régénère une autre réductase qui protège les cellules contre le stress oxydatif, la méthionine-sulfoxyde réductase (Lee et al., 2013).

Ainsi, la détoxification des ROS par les enzymes antioxydantes est fondamentale pour le maintien de l'homéostasie redox. Elle est assurée par des enzymes (Pxr et Msr) dont l'activité est étroitement dépendante du pouvoir réducteur de la Trx-1.

2-2) La Trx-1, autres fonctions cellulaires

La Trx-1 est localisée principalement dans le cytosol. Malgré l'absence de peptide signal, la Trx-1 peut également être sécrétée au niveau extracellulaire, par plusieurs types de cellules dont les macrophages. Elle y exerce des activités autocrines et/ou paracrines. La Trx-1 peut également être transloquée dans le noyau où elle agit sur l'état redox de plusieurs facteurs de transcription (NF- κ B, AP-1, Ref-1, Nrf-2, p53, récepteurs des glucocorticoïdes, ...), régulant ainsi l'expression d'un grand nombre de gènes. Les effets de la Trx-1 sont régis par des interactions protéine/protéine et les deux cystéines du site catalytique (Cys³² et Cys³⁵) jouent un rôle important. La localisation cellulaire ainsi que les partenaires spécifiques ciblés sont deux paramètres déterminants pour les implications fonctionnelles de la Trx-1 (Lee et al., 2013; Mahmood, 2014; Zschauer et al., 2013) (Figure 12).

2-2-1) Trx-1, effets sur la signalisation cellulaire

La Trx-1 interagit avec plusieurs protéines *via* des réactions d'échange de cystéine thiol-disulfure : elle module ainsi les fonctions des protéines dans le cytoplasme et interfère avec des voies de signalisation. Ainsi, la Trx-1 réduite forme un complexe avec la partie N-terminale d'ASK-1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase-1). Cette association permet de supprimer l'activité de ASK-1 en la dirigeant vers l'ubiquitination et la dégradation (Liu and Min, 2002). L'inactivation de ASK-1, via l'interaction avec la Trx-1, entraîne une inhibition de la cascade de signalisation menant à l'apoptose telles que les kinases JNK (c-Jun N-terminal Kinases) et p38-MAPK (Ichijo et al., 1997; Saitoh et al., 1998).

Par ailleurs, la Trx-1 peut également se lier à la phosphatase PTEN (Phosphatase and TENsin homology), inhibiteur de la voie de signalisation de la protéine Kinase B (PKB ou Akt) en cas de stress oxydatif (Lee et al., 2002). Par conséquent, la liaison entre la Trx-1 et PTEN entraîne l'activation de la signalisation Akt (Meuillet et al., 2004). Dans les macrophages, notre équipe a récemment démontré que la Trx-1 active, directement ou *via* l'inhibition de PTEN, la

voie Akt-2 et favorise la polarisation de ces cellules vers un phénotype M2 anti-inflammatoire (Couchie et al. Circ.2017).

Par ailleurs, la Trx-1 extracellulaire réduit le pont disulfure de la boucle extracellulaire du canal calcique homotétramérique, TRPC5. A l'état réduit, le canal active le flux entrant de Ca^{2+} , modulant ainsi la signalisation cellulaire dépendante du calcium (Xu et al., 2008).

2-2-2) Trx-1, effets nucléaires

Malgré l'absence du peptide de localisation nucléaire (Hirota et al., 1999), la Trx-1 peut transloquer vers le noyau et assurer la réduction de protéines nucléaires impliquées dans la synthèse et la réparation de l'ADN comme la ribonucleotide réductase (RNR) et la nucléase APEX-1 qui catalyse la conversion des ribonucléotides en désoxyribonucléotides (dNTP) (Lee et al., 2013). Par ailleurs, le maintien de l'équilibre redox au niveau du noyau par la Trx-1 conduit à la régulation de l'activité d'un grand nombre de facteurs de transcription contenant des cystéines, notamment dans leur domaine de liaison à l'ADN. C'est le cas pour les facteurs Ref-1 (Redox Factor-1), HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1), AP-1 (Activator Protein-1), Nrf-2 (Nuclear Factor Erythroid-2), Related Factor 2, ER (Estrogen Receptor) et GR (Glucocorticoid Receptor) (Hirota et al., 1997, 1999; Lillig and Holmgren, 2006; Mahmood, 2014).

La Trx-1 assure la réduction du facteur Ref-1 possédant une double activité : le maintien de l'équilibre redox et la réparation de l'ADN. En effet, Ref-1 a une localisation exclusivement nucléaire (Xanthoudakis and Curran, 1992). Son activité redox protège les résidus cystéine des facteurs de transcription à activité redox-dépendante (HIF-1 α , NF- κ B, p53, AP-1, Nrf-2, GR et ER) (Go and Jones, 2010; Schenk et al., 1994). Ref-1 est capable de moduler l'état redox des résidus cystéine portés par c-Fos et c-Jun, membres du facteur AP-1. La réduction de c-Fos et de c-Jun par Ref-1 stimule la liaison du facteur AP-1 à l'ADN et cet effet est induit en présence de la Trx-1 réduite (Abate et al., 1990).

Le facteur NF- κ B est un hétérodimère constitué de deux sous-unités, p50 et p65. La réduction du résidu cys⁶² de la p50 facilite la liaison de ce facteur à l'ADN. L'état redox est donc un facteur déterminant pour l'activation du facteur NF- κ B (Flohé et al., 1997). Le système de la Trx-1 régule l'activité du facteur NF- κ B par ce mécanisme (Hirota et al., 1999).

La Trx-1 joue également un rôle dans la restauration de la fonction des récepteurs des glucocorticoïdes en interagissant directement avec son domaine de liaison à l'ADN. La Trx-1 représente un médiateur clé intervenant dans l'interaction entre la signalisation redox

cellulaire et la transduction du signal médiée par les récepteurs nucléaires (Makino et al., 1999). Les glucocorticoïdes, effecteurs périphériques majeurs de l'axe hypothalamo-hypophyséo-surrénalien, jouent un rôle essentiel dans le rétablissement de l'homéostasie tissulaire chez l'homme. La liaison des glucocorticoïdes à son récepteur (GR) entraîne la translocation du dimère vers le noyau. La liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle dépendent étroitement de l'état redox des résidus cystéine des glucocorticoïdes (Chakraborti et al., 1992; Simons and Pratt, 1995). Grippo *et al.* ont démontré la séquestration de la Trx-1 ou la TrxR par un anticorps spécifique, inhibe la liaison des récepteurs des glucocorticoïdes à leur ligand. Ainsi, la Trx-1 est nécessaire pour maintenir une conformation "ligand-récepteur" optimale des GR (Grippo et al., 1985).

2-2-3) Régulation des fonctions cellulaires de la Trx-1

La Trx-1 est une protéine exerçant de multiples fonctions. Leur régulation peut être modulée à la fois positivement et négativement. Il a été démontré que les résidus cystéine de la Trx-1 peuvent subir des modifications post-traductionnelles telles que l'oxydation du thiol, la glutathionylation et la S-nitrosylation qui régulent l'activité de cette protéine. Des données montrent que l'action anti-apoptotique de la Trx-1 nécessite une S-nitrosylation de la Cys⁶⁹. Cette S-nitrosylation est nécessaire pour éliminer les ROS et pour préserver l'activité redox de la Trx-1. Elle intervient également dans le contrôle de l'inhibition de l'apoptose exercé par la Trx-1 en réduisant l'activité de la p38-MAPK. Ainsi, la Trx-1 améliore son effet cardioprotecteur, ses fonctions régulatrices et anti-apoptotiques redox lorsque la Cys⁶⁹ est S-nitrosylée (Haendeler et al., 2002; Tao et al., 2004). Il est intéressant de noter que les statines sont capables d'augmenter la nitrosylation de la Trx-1 et de réduire le stress oxydatif (Haendeler et al., 2004). De plus, il a été montré que la phosphorylation de la thréonine de la Trx-1 (T¹⁰⁰) joue un rôle important dans les effets cytoprotecteurs au niveau des cellules cancéreuses (Chen et al., 2010).

La protéine TXNIP (Thioredoxin Interacting Protein) également nommée TBP-2 (Trx-Binding Protein-2) ou VDUP1 (Vitamin D3 Up regulated Protein-1), régule négativement la fonction redox de la Trx-1. Le TXNIP se lie spécifiquement à la forme réduite de la Trx-1, inhibant ainsi ses effets réducteurs sur les protéines oxydées et également sur les autres enzymes anti-oxydantes (TxR et Msr). Une surexpression de TXNIP, en réponse à divers stimuli

du stress oxydatif, inhibe également l'interaction de la Trx1 avec ASK-1, entraînant l'activation de la cascade de signalisation apoptotique JNK/p38 Kinase. Une diminution de la prolifération cellulaire accompagnée d'une mort cellulaire apoptotique élevée est ainsi observée (Junn et al., 2000; Lillig and Holmgren, 2006). Le TXNIP fonctionne comme un médiateur du stress oxydatif en inhibant les fonctions cellulaires de la Trx-1. Par ailleurs, il contribue à la localisation nucléaire de la Trx-1 *via* sa capacité d'interaction avec l'importine α -1 qui appartient à la machinerie d'import du cytoplasme vers l'intérieur du noyau à travers les pores nucléaires (Nishinaka et al., 2004). Il est vraisemblable que dans le complexe TXNIP/Trx-1, le TXNIP jouerait le rôle de protéine d'échafaudage. Outre l'effet inhibiteur de cette interaction, le complexe pourrait jouer un rôle de signalisation important mais variable selon sa localisation subcellulaire.

3) La Trx-1, le clivage et la genèse de la Trx-80

A ce jour, la Trx-1 peut être clivée après une lysine autour des résidus 80-84 dans des conditions non encore clairement élucidées. La protéine tronquée de 10kDa ainsi générée est nommée Trx-80 (Pekkari and Holmgren, 2004). Le clivage a lieu essentiellement à la surface des membranes plasmiques des monocytes et des macrophages (Pekkari et al., 2000; Sahaf et al., 1997). C'est en 2012 que furent identifiées les premières protéases impliquées dans le clivage de la Trx-1, dans des lignées cellulaires lymphoblastique (U937) et neuronale (SH-SY5Y). Ces protéases, nommées ADAM-10 et ADAM-17, appartiennent à la famille des désintégrines et métalloprotéases et possèdent une activité de type α -sécrétase (Figure 12) (Gil-Bea et al., 2012; Vincent and Checler, 2012). Toutefois, le site de clivage de la Trx-1 qui conduit à la production de la Trx-80 n'a jamais été caractérisé avec précision et l'implication des seules protéases ADAM 10 et 17 dans le clivage de la Trx-1 reste à démontrer.

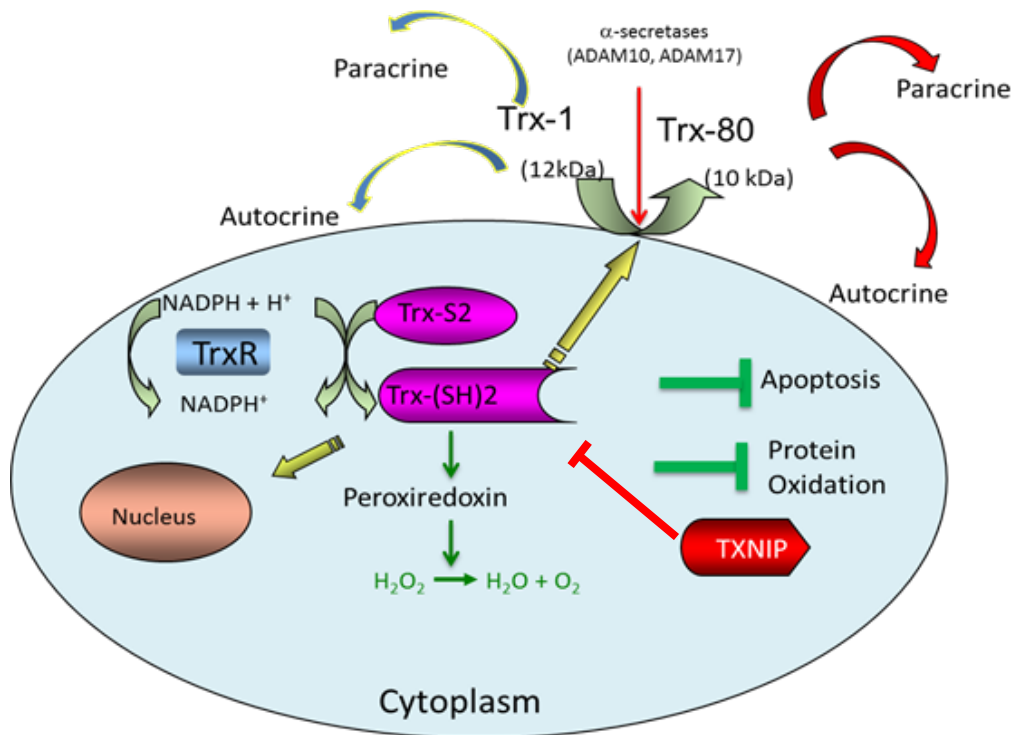


Figure 12. Effets cellulaires de la Trx-1. Sous forme réduite, la Trx-1 est impliquée dans la détoxification de l'hydrogène peroxyde (H_2O_2) par l'intermédiaire de la peroxyredoxine. Elle protège les protéines de l'oxydation et inhibe l'apoptose. Elle peut être transloquée dans le noyau et moduler l'activité de facteurs de transcription sensibles au stress oxydatif. La Trx-1 oxydée peut être régénérée à l'état réduit par la TrxR (Trx réductase). Ses fonctions cellulaires sont inhibées suite à son interaction avec son partenaire "séquestrateur", le TXNIP (Trx-Interacting Protein). La Trx-1 peut être sécrétée à l'extérieur des cellules, où elle exerce des effets auto/paracrines. Le clivage de la Trx-1, sous l'effet des α -sécrétases ADAM10 et 17, donne naissance à la forme tronquée, la Trx-80.

4) La Trx-1, implication dans les maladies cardiovasculaires

4-1) Implication bénéfique de la Trx-1 dans les maladies cardiovasculaires

Les rôles possibles de la Trx-1 dans la protection vasculaire et la défense antioxydante dans les maladies cardiovasculaires ont déjà été largement discutés (Shioji et al., 2003; Yamawaki et al., 2003) (Figure 13). La Trx-1 est une protéine inducible lors de la réponse adaptative au stress oxydatif. Elle est induite dans les cellules endothéliales traitées avec H_2O_2 (Nakamura et al., 1994), dans le plasma de patients souffrant d'une insuffisance cardiaque ou présentant un syndrome coronarien aigu et une myocardiopathie (Kishimoto et al., 2001) et

2005). Ces résultats révèlent une association possible entre la concentration de la Trx-1 et la gravité de l'insuffisance cardiaque, ce qui en fait un potentiel marqueur du stress oxydatif. La Trx-1 est exprimée dans les cellules endothéliales et les macrophages au sein de la plaque d'athérome (Takagi et al., 1998). La surexpression de la hTrx-1 chez des souris atténue la cardiotoxicité induite par l'adriamycine (Shioji et al., 2003). Après une ischémie, les cœurs de ces souris présentent une récupération ventriculaire significativement améliorée et une taille réduite de l'infarctus du myocarde par rapport aux cœurs de souris sauvages (Turoczi et al., 2003). De plus, l'administration de la hTrx-1 réduit les lésions du myocarde dans un modèle murin d'ischémie-reperfusion, par inhibition de l'activité p38-MAP Kinase de la voie apoptotique. Cet effet est potentialisé par la S-nitrosylation de la Cys⁶⁹ de la Trx-1 (Tao et al., 2004). L'équipe de Hilgers a démontré que la surexpression de la hTrx ou l'injection de la hTrx recombinante chez la souris provoque une diminution de la rigidité artérielle, une meilleure relaxation de l'endothélium, une production accrue de NO ainsi qu'une diminution de la production de O₂^{•-} (Hilgers et al., 2017).

Enfin, au sein de notre équipe, nous avons montré que la Trx-1 oriente les macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire, *in vitro* et au sein de la plaque d'athérome dans un modèle murin développant l'athérosclérose (souris ApoE2.Ki). La Trx-1 exerce également des effets anti-inflammatoires en réduisant la production de cytokines inflammatoires (El Hadri et al., 2012).

L'ensemble de ces résultats montre l'effet anti-inflammatoire, antioxydant et antiathérogène de la Trx-1 qui lui confère un rôle protecteur dans les maladies cardiovasculaires. Ainsi, les différentes fonctions biologiques qu'exerce la Trx-1 montrent son fort potentiel thérapeutique dans le cadre des maladies cardiovasculaires.

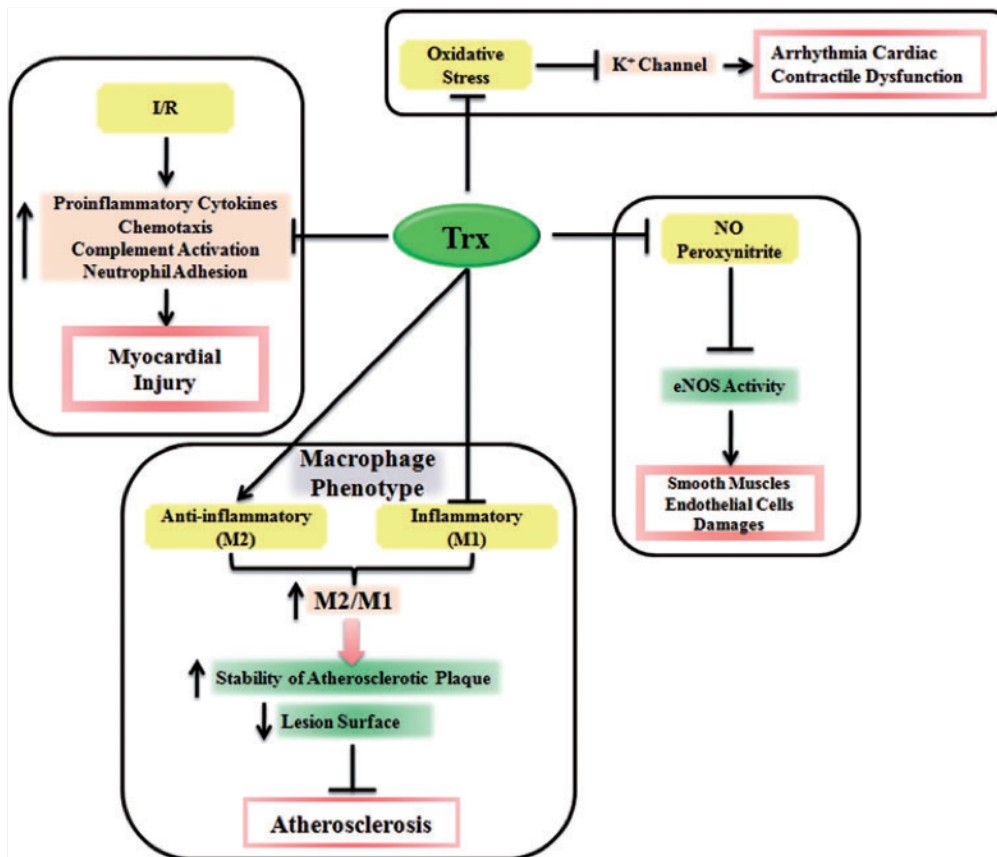


Figure 13. Rôles protecteurs de la Trx dans les maladies cardiovasculaires. La Trx peut prévenir l'arythmie mortelle et le dysfonctionnement contractile cardiaque en protégeant le canal K^+ et en inhibant l'instabilité électrique provoquée par les ROS. La Trx peut atténuer les lésions d'ischémie-reperfusion en inhibant l'expression des cytokines pro-inflammatoires, la chimiotaxie, l'activation du complément et l'adhérence des neutrophiles. La Trx peut aussi prévenir les dommages des CML et des cellules endothéliales en protégeant l'activité eNOS contre NO et le peroxy-nitrite. Enfin, la Trx peut potentialiser le phénotype anti-inflammatoire des macrophages, ce qui réduit considérablement l'athérogenèse (Mahmood, 2014).

4-2) Le clivage de la Trx-1, perte du bénéfice cardiovasculaire

Malgré la conservation du site catalytique $C^{32}XXC^{35}$, la Trx-80 est dépourvue d'activité redox. Son activité ne dépend pas des deux cystéines du site actif de la Trx-1 (Pekkari and Holmgren, 2004). Il a été montré, dans le cadre de la maladie d'Alzheimer, que la région peptidique 21-25 de la Trx-80 peut se lier à la région peptidique 16-20 de l'amyloïde- β , empêchant son l'agrégation. La Trx-80 contrecarre donc les effets toxiques de l'amyloïde β dans les cellules SH-SY5Y, lignée cellulaire neuronale humaine (Tjernberg et al., 1996). En cas de déficit de la Trx-80, la polymérisation et la toxicité du peptide amyloïde- β sont augmentées,

rendant les neurones plus vulnérables. Une diminution du taux de la Trx-80 provoque des pertes cognitives associées à la maladie d'Alzheimer (Gil-Bea et al., 2012). A l'encontre de ses effets bénéfiques centraux dans le cadre des maladies d'Alzheimer, la Trx-80 exerce des effets délétères au niveau périphérique, notamment dans le cadre des maladies cardiovasculaires. En effet, nous avons montré très récemment que la Trx-80 circulante augmente avec l'âge chez des volontaires sains (Couchie et al., 2017). Notre équipe a mis en évidence que, contrairement à la Trx-1, la forme tronquée exerce des effets pro-inflammatoires et pro-athérogènes. La Trx-80 oriente les macrophages murins vers un phénotype pro-inflammatoire M1 et bloque la polarisation anti-inflammatoire M2. Elle induit également l'expression de plusieurs facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α et le MCP-1 dans les macrophages. Cela contribue à la progression de l'inflammation et de la taille des plaques d'athérome chez les souris ApoE2.Ki. La capacité de la Trx-80 à promouvoir la différenciation des macrophages vers un phénotype pro-inflammatoire classique pourrait expliquer ses effets athérogènes dans les maladies cardiovasculaires (Mahmood et al., 2013). La Trx-80 colocalise avec les macrophages de phénotype M1 au sein de la plaque d'athérome humaine (Couchie et al., 2017). Enfin, la surexpression de la hTrx-80 dans les macrophages de souris transgéniques ApoE^{-/-} contribue à l'exacerbation de l'inflammation et des lésions vasculaires. L'effet pro-inflammatoire de la Trx-80 est dû, du moins en partie, à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Couchie et al., 2017). L'inflammasome NLRP3 est un complexe multiprotéique, composé d'une protéine Nlrp3, d'une protéine adaptatrice (Asc) et de la procaspase-1. En réponse à la Trx-80, son assemblage et donc son activation entraîne la maturation de la caspase-1 qui clive la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 pour libérer les cytokines IL-1 β et IL-18 biologiquement actives. Il est actuellement bien établi que l'activation de l'inflammasome NLRP3, particulièrement au niveau des macrophages, est impliquée dans le processus inflammatoire associé à l'athérosclérose (Abderrazak et al., 2015). L'ensemble des résultats obtenus au sein de notre laboratoire a montré que la Trx-80 et l'inflammasome NLRP3 sont impliqués dans la pathogénicité des maladies cardiovasculaires.

Projet de thèse

1) Objectifs

Comme nous l'avons vu, le stress oxydatif et l'inflammation sont deux processus hautement athérogènes. La thiorédoxine-1 (Trx-1), dont les fonctions cellulaires sont essentiellement liées à son site catalytique canonique, est une protéine antioxydante, anti-inflammatoire et athéroprotectrice. Cependant, le clivage de la Trx-1 en une protéine tronquée pro-inflammatoire, la Trx-80, compromet l'utilisation thérapeutique de la Trx-1. Pour contourner ce problème de clivage dont le mécanisme n'est pas encore élucidé, nous cherchons à caractériser et mettre en place une nouvelle stratégie thérapeutique dans le cadre de la pathologie de l'athérosclérose. La synthèse et l'utilisation d'un peptide mimétique de la Trx-1 (TxMP) reproduisant son site catalytique pourrait constituer une approche thérapeutique très prometteuse dans le cadre des maladies cardiovasculaires (Figure 14).

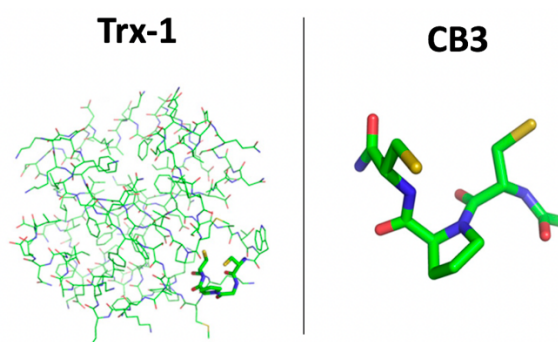


Figure 14. Structures tridimensionnelles simulées de la Trx-1 et du peptide mimétique de la Trx-1. À gauche, représentation de la Trx-1 avec le site catalytique C³²XXC³⁵. À droite, représentation du CB3. (Cohen-Kutner et al., 2013).

A ce jour, seule l'équipe de Daphné Atlas a utilisé des TxMP. Leurs travaux ont mis en évidence des effets antioxydants et anti-inflammatoires de ces peptides, *in vitro* sur des modèles de lignées cellulaires β -pancréatique (INS 832/13) et chromaffines et *in vivo* chez le rat sur un modèle d'inflammation des voies respiratoires. Cependant, l'utilisation de ces TxMP n'a jamais été décrite dans les macrophages et dans le contexte des MCV.

L'objectif de cette thèse est de synthétiser des TxMP, de les caractériser et de les valider fonctionnellement, *in vitro* et *in vivo*, pour leurs effets mimétiques de la Trx-1, à savoir les effets antioxydants, anti-inflammatoires et athéroprotecteurs. La conception et la validation fonctionnelle des TxMP représentent une approche thérapeutique innovante qui pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques prometteuses dans le traitement des pathologies inflammatoires en général et de l'athérosclérose en particulier.

2) Méthodes

Pour répondre à ces objectifs, nous avons synthétisé, dans un premier temps, un peptide de 3 acides aminés Cys-Pro-Cys, le **CB3**. Nous lui avons ajouté en C-terminal un acétyl et en N-terminal un amide afin de le stabiliser, de le protéger de la protéolyse et d'augmenter sa pénétrabilité dans les cellules.

Dans un deuxième temps, le peptide CB3 a été caractérisé *in vitro* sur un modèle cellulaire jouant un rôle majeur dans l'athérosclérose, les macrophages, issus du péritoine de souris C56Bl/6 et maintenus en culture primaire. Pour instaurer un état oxydatif et inflammatoire, nous avons cultivé les macrophages en présence de LPS (10ng/ml). Puis, après traitement avec le peptide CB3, nous avons mesuré le niveau du stress oxydatif (ROS totaux et H₂O₂) et de l'inflammation (marqueurs MCP-1, IL-1 β , IL-6 et TNF- α) ainsi que l'état d'activation d'une voie majeure de l'inflammation, la voie NF- κ B.

Dans un troisième temps, nous avons étudié les effets antioxydants, anti-inflammatoires et athéroprotecteurs du CB3 *in vivo*. Nous avons choisi les souris ApoE2.Ki. comme modèle d'athérosclérose, établi par Sullivan en 1997 (Sullivan et al., 1997). Les séquences codantes (exons 2-3-4) du gène ApoE murin ont été remplacées par le fragment codant pour l'ApoE humaine (exons 2'-3'-4'). L'isoforme humaine se fixe mal sur les récepteurs membranaires des LDL et est associée à une hyperlipoprotéïnémie de type III qui prédispose à une athérosclérose précoce sévère chez l'homme (Sullivan et al., 1998).

Les souris ApoE2.Ki ont été soumises à un régime riche en graisses (HFD : High fat diet) afin d'accélérer le processus athérogénique. Une dose quotidienne de CB3 (10 μ g/g de poids corporel) a été injectée chez des souris ApoE2.Ki placées sous HFD pendant 10 semaines. Après le sacrifice de ces souris, nous avons évalué les marqueurs de l'oxydation et de l'inflammation systémique et vasculaire. Nous avons également mesuré la surface des lésions et compté la proportion de macrophages de phénotypes M1 et M2 sur des coupes du sinus aortique.

Résultats

Les résultats obtenus durant cette thèse ont donné lieu à un article accepté pour publication dans la revue *Cardiovascular Research*, le 13 juillet 2018, doi: 10.1093/cvr/cvy183.

Titre : « A thioredoxin-mimetic peptide exerts potent anti-inflammatory, anti-oxidant, and atheroprotective effects in ApoE2.Ki mice fed high fat diet ».

A thioredoxin-mimetic peptide exerts potent anti-inflammatory, antioxidant, and atheroprotective effects in ApoE2.Ki mice fed high fat diet

Fanny Canesi¹, Véronique Mateo², Dominique Couchie¹, Sonia Karabina³, Anne Nègre-Salvayre⁴, Mustapha Rouis^{1†}, and Khadija El Hadri^{1*†}

¹Sorbonne Université, Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), CNRS, INSERM ERL U-1164, Biological Adaptation and Ageing (B2A), UMR-8256, F-75252, Paris, France; ²Sorbonne Université, INSERM U-1135, CIMI-Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière Centre de recherche d'Immunologie et Maladies infectieuses, UMRS CR7, F-75013, Paris, France; ³Sorbonne Université, INSERM, Hôpital Armand-Trousseau, Physiopathologie Des Maladies Genetiques D'Expression Pediatric, UMR_S933, F-75012, Paris, France; and ⁴Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM-UPS, Lipides, Peroxydation, Signalisation et Maladies Vasculaires, UMR 1048, F-31432, Toulouse, France

Received 2 October 2017; revised 30 March 2018; editorial decision 5 July 2018; accepted 10 July 2018

Time for primary review: 40 days

Aims

Oxidative stress and inflammation play a pathogenic role in atherosclerosis. Thioredoxin-1 (Trx-1) is an anti-oxidative, anti-inflammatory protein with atheroprotective effects. However, *in vivo* cleavage of Trx-1 generates a truncated pro-inflammatory protein, Trx-80, which compromises the therapeutic use of Trx-1. Here we analysed whether the thioredoxin-mimetic peptide (TxMP), CB3 might exert anti-oxidative, anti-inflammatory, and atheroprotective effects in ApoE2.Ki mice.

Methods and results

We synthesized a small TxMP, Ac-Cys-Pro-Cys-amide, CB3 and characterized its antioxidant and anti-inflammatory effects on cultured peritoneal murine macrophages. CB3 significantly and dose-dependently reduced the level of reactive oxygen species in lipopolysaccharides (LPS)-activated macrophages. In addition, it efficiently lowered LPS-induced inflammatory process through NF- κ B inhibition, as evidenced by the reduced secretion of monocyte chemoattractant protein-1, interleukin (IL)-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α by macrophages. Nevertheless, CB3 did not affect cholesterol accumulation in macrophages. A daily-administered dose of 10 μ g/g body weight CB3 to ApoE2.Ki mice on high fat diet did not affect plasma of total cholesterol and triglycerides levels but significantly reduced the plasma levels of pro-inflammatory cytokines (IL-33 and TNF- α) and oxidative markers. In contrast, it significantly induced the plasma levels of anti-inflammatory proteins (adiponectin, IL-10). In addition, CB3 reduced the number of pro-inflammatory M1 macrophages in spleen and decreased the ratio of M1/M2 macrophages in atherosclerotic lesion areas. Finally, CB3 significantly reduced the surface area of aortic lesions.

Conclusions

Our results clearly showed that similar to the full length Trx-1, CB3 exerts protective effects, by reducing inflammation and oxidative stress in macrophages and in ApoE2.Ki mice. The atheroprotective effect of CB3 opens promising therapeutic approaches for treatment of atherosclerosis.

Keywords

Atherosclerosis • Thioredoxin-1 • Inflammation • Oxidative stress • Macrophages • Thioredoxin-mimetic peptide • CB3

1. Introduction

Cardiovascular diseases (CVD) remain the leading cause of morbidity and death worldwide.¹ The majority of CVD results from complications

of atherosclerosis which is characterized by a state of unresolved low-grade inflammation of the arterial wall. The inflammatory process plays a key role in all stages of atherosclerosis.² A crucial step of the atherogenic process is the infiltration of monocytes into the subendothelial

* Corresponding author. Tel: 33 1 44 27 20 28; fax: 33 1 44 27 51 40, E-mail: khadija.zegouagh@upmc.fr

† The last two authors contributed equally to the study.

space of arteries and their subsequent differentiation into resident macrophages within the atherosclerotic lesions.³ An important feature of macrophages is their plasticity and ability to adopt diverse activation states in response to their microenvironment.⁴ For many years macrophages have been classified into two main groups, representing the extremes of a continuum, namely 'classically activated' or M1 and 'alternatively activated' or M2 macrophages.⁵⁻⁷ Upon stimulation with interferon- γ (IFN- γ), and toll-like receptor (TLR) ligands, such as lipopolysaccharides (LPS), macrophages adopt a pronounced pro-inflammatory M1 phenotype, characterized by the secretion of pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species (ROS), and nitrogen intermediates.^{3,8} Conversely, interleukin (IL)-4, IL-13,⁶ peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) activators,⁹ and adiponectin¹⁰ polarize macrophages towards an anti-inflammatory M2 phenotype. While M1 macrophages possess bactericidal and inflammatory activity, M2 macrophages are involved in tissue remodelling, immunosuppression, and show phagocytic activity.³

Increasing evidence suggests that risk factors for CVD can lead to dramatic increase in the concentration of ROS in the vascular wall. When the rate of ROS production exceeds the capacity of the antioxidant defence system, oxidative stress occurs which contributes to endothelium damage, oxidized low-density lipoproteins (oxLDL) generation, and stimulation of atherosclerotic mediators leading to atherosclerosis.¹¹ Thioredoxin-1 (Trx-1), a highly conserved 12-kDa protein, plays a vital role in maintaining the intracellular homeostatic redox state by keeping cysteine residues reduced in cells.¹² Trx-1 functions by the reversible oxidation of two Trx-specific redox-active cysteine residues (Cys-32 and Cys-35) to form a disulfide bond that, in turn, can be reduced by the action of Trx reductase (TrxR) and dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH).¹² It has become clear that Trx-1 protects against CVD through its anti-oxidative and anti-inflammatory capacities, its specific interaction with several proteins and through its capacity to modify gene expression.¹² Thus, over expression of human Trx-1 in mice attenuated focal ischaemic brain damage and increased the resistance to various oxidative stresses leading to longer survival compared to control mice.¹³ Furthermore, exogenous Trx-1 exerts distinct cytoprotective effects after transient cerebral ischaemia in mice by means of its redox-regulating activity.¹⁴ Recently, we have demonstrated that Trx-1 promoted the polarization of macrophages into an anti-inflammatory M2 phenotype and significantly reduced the LPS-induced polarization of macrophages toward inflammatory M1 phenotype. These results may explain its protective effects in CVDs in animal models.¹⁵ Indeed, Trx-1 administered to hyperlipoproteinaemic ApoE2.Ki mice shifted the phenotype pattern of lesional macrophages to predominantly M2 over M1, and the aortic lesion area was significantly reduced.¹⁵ Nevertheless, Trx-1 can be cleaved at its C-terminal, resulting in the truncated protein, Trx-80.¹⁶ Recently, ADAM-10 and ADAM-17, two α -secretases, were found to be responsible for Trx-80 generation in brain.¹⁷ Whether, this phenomenon is ubiquitous or tissue specific is not known. It is important to note that Trx-1 and Trx-80 have contrasting roles. While Trx-1 is an oxidative stress-limiting protein with anti-inflammatory and anti-atherogenic properties, its truncated form, Trx-80, exerts pro-inflammatory effects. We recently demonstrated the ability of Trx-80 to promote differentiation of macrophages into the pro-inflammatory M1 phenotype and to accelerate atherogenic process in ApoE2.Ki mice.^{18,19}

Although these *in vitro* and *in vivo* studies are in favour of vasculoprotective effects of Trx-1 and highlight its therapeutic potential; its short half-life (<1 h) and its cleavage into Trx-80, compromise its use as a therapeutic tool in human. However, small peptides based on the active site

(W31-C-G-P-C-K36), containing the two active cysteines, have been shown to be biologically active, particularly when the amino and carboxyl terminal ends are blocked, as it facilitates their entry into cells.²⁰

In this manuscript, we have studied the effect of CB3, a Trx-1 mimetic peptide, *in vitro* and *in vivo* and we have clearly showed that it reduced oxidative stress, inflammation, and atherosclerotic lesions when used in ApoE2.Ki mice, fed high fat diet (HFD).

2. Methods

2.1 Peptide synthesis and purification

The peptide was synthesized by the platform of the 'Institut de Biologie Paris-Seine, Sorbonne Université, Paris' (for further details please see Supplementary material online).

2.2 Isolation and treatment of mouse peritoneal macrophages

As stipulated in the Annex IV of the Official Journal of the European Union (20 October 2010), for the peritoneal macrophages isolation, mice were sacrificed by cervical dislocation. Peritoneal macrophages were collected from thioglycolate-injected 12-week-old C57Bl/6 mice (Janvier labs, France) by peritoneal lavage with 10 mL of PBS, centrifuged at 1500 rpm for 10 min, and cultured in RPMI 1640 medium containing 2 mM L-glutamine and 100 U/mL Penicillin-Streptomycin (ThermoFisher Scientific, USA). Before each experiment, cells were placed in RPMI 1640 medium with 10% foetal bovine serum (FBS) for 48 h. In serum-free RPMI, cells were left untreated or were treated with LPS (10 ng/mL, *E. coli*, serotype 055: B5, Sigma-Aldrich, USA) either in the presence or in the absence of CB3 (from 0.001 to 100 μ M) or recombinant mouse Trx-1 (80 nM, IMCO, Stockholm).

2.3 Intracellular ROS measurement

Macrophages were seeded in 96-well microplates and treated with LPS (10 ng/mL) for 1 h. Thereafter, the cells were treated in the presence or absence of 80 nM Trx-1 or with various concentrations of CB3 for 1 h. After washing with PBS, cells were incubated with DCF-DA (10 μ M) at 37°C for 1 h. Finally, the cells were washed with PBS, and the fluorescence (FLU, excitation wavelength 488 nm, emission wavelength 520 nm) was measured using a fluorescent microplate reader (PerkinElmer, USA).

2.4 Extracellular H₂O₂ levels measurement

Macrophages were cultured in 96-well microplate in the presence or absence of LPS (10 ng/mL) for 4 h followed by an additional 24 h treatment by various concentrations of CB3. Extracellular H₂O₂ levels were detected with the AmplexRed reagent in combination with horseradish peroxidase (HRP) during 30 min at room temperature according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). Finally, the fluorescence (FLU, excitation wavelength 530 nm, emission wavelength 590 nm) was detected by a fluorescent microplate reader (PerkinElmer, USA).

2.5 Real-time polymerase chain reaction

Macrophages were incubated for 4 h with LPS (10 ng/mL) then in the presence or absence of CB3 (10 μ M) for 24 h in 6-well plates. Total RNA was isolated using the ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega, USA) and quantified in a NanoVue Plus spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences, UK). Total RNA (500 ng) was reverse-

transcribed using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, USA) per manufacturer's instructions. mRNA expression levels of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, IL-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor (TNF)- α were quantified using LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche, France) and normalized to 36B4 ribosomal RNA using the $\Delta\Delta C_t$ method. Primer sequences are reported in [Supplementary material online, Table S1](#).

2.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Macrophages were incubated in the presence or absence of LPS (10 ng/mL) for 4 h followed by an additional 24 h treatment with CB3 (10 μ M) in 6-well plates. MCP-1, IL-1 β , IL-6, and TNF- α cytokines released in the culture media were measured with the Mouse Elisa (Biolegend, USA). The absorbance was read at 450 nm with a microplate reader (BioTek instruments, Winooski, VT, USA).

2.7 Western blot analysis

Macrophages were treated with 10 ng/mL LPS for 4 h then with 1 μ M CB3 for 5 or 30 min in 6-well plates. Cells were scraped with lysis buffer (Sigma-Aldrich, USA) containing protease inhibitors cocktail (Roche, France) and cell lysates were incubated on ice for 1 h before centrifugation at 13 000 \times g for 10 min at 4°C. For cell fractionation procedure, see [Supplementary material online](#). Proteins content in the supernatant was determined using the bicinchoninic acid assay (BCA). Proteins (20 μ g) were separated by 12% SDS-PAGE. The resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes, washed and incubated with appropriate antibodies (see [Supplementary material online](#)).

2.8 ApoE2.Ki mice

All animal experiments were carried out by procedures approved by the 'Ministère de l'éducation nationale de l'enseignement supérieur et de la recherche' (01480.02, 06 September 2016) and complied with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. C57Bl/6.ApoE2.ki mice were obtained from Dr Nobuyo Maeda (Department of pathology and laboratory medicine, University of North Carolina) (for details see [Supplementary material online](#)). Female C57Bl/6.ApoE2.Ki mice (6 weeks old) were randomly divided into two groups ($n = 6$ per group). One group was daily injected intraperitoneally with water for 10 weeks (control, C). The other group was injected daily with CB3 (10 μ g/g of bw) for 10 weeks. This dose was chosen because in pilot experiments, (using 1, 10, and 20 CB3 μ g/g of bw), it exerted the maximum reduction of the generation of antibodies directed against oxLDL in mice plasma suggesting that the treatment HFD ApoE2.Ki mice with 10 μ g/g of bw for 10 weeks has the maximum antioxidant effect. Of note, CB3 has been already used for *in vivo* study (rats and mice) at concentrations ranged between 1 to 50 μ g/g of bw.²¹

2.9 Determination of anti-oxLDL antibodies

Human LDL ($d = 1.019\text{--}1.063$) was isolated from frozen plasma of two healthy volunteers by gradient ultracentrifugation as described previously.²² Its protein content was determined by the BCA method (Pierce, Rockford, IL, USA). Freshly prepared, filter (0.45 μ m) sterile LDL (1 mg/mL of protein in PBS), was oxidized in the presence of 10 μ M CuSO₄ for 24 h (see [Supplementary material online](#)). The use of frozen plasma is approved through the convention No. 15EFS012 between 'INSERM' and

'Etablissement Français du Sang'. The donors have given their written consent. All criteria in the convention were met.

2.10 Plasma cytokines determination

Plasma samples were separated by centrifugation of blood at 630 \times g for 20 min at 4°C and kept frozen at -80°C until required. For the quantification of adiponectin, IL-10, IL-33, and TNF- α , we used the Mouse Magnetic Luminex screening assay (R&D Systems). Briefly, 25 μ L plasma were incubated overnight at 4°C with 25 μ L of beads linked to specific antibodies. Thereafter, 25 μ L of biotinylated antibody was added for 1 h at RT. Finally, 25 μ L of streptavidin-phycoerythrin were added for 30 min, and 150 μ L of buffer were added before reading the plate with a Luminex 200 Millipore apparatus. Data were analysed with the xPONENT 3.1 software (Millipore, Billerica, MA, USA).

2.11 Tissue analysis by flow cytometry

Cell suspensions were obtained from spleen, bone-marrow, or peritoneal lavage of euthanized animals. Cell suspensions were incubated with monoclonal antibodies (mAbs) against surface antigens ([Supplementary material online, Table S2](#)).

2.12 Evaluation of mouse aortic lesions

At the end of the study, animals were anaesthetized and perfused transcardially with PBS before the heart and descending aortas were excised and fixed. Hearts were cut directly under and parallel to the leaflet, and the upper portions were embedded in OCT medium and frozen at -80°C until used. Sections of 10 μ m thickness were prepared from proximal aortas. The sections were stained for lipids with Oil-Red O and counterstained with Haematoxylin Harris. Ten sections, each separated by 100 μ m, were used for specific morphometric evaluation of intimal lesions. Images were captured with a CAMIRIS video camera, and the surface area covered by lesions was evaluated with ImageJ software. For localization of M1 and M2 macrophages in atherosclerotic lesions, frozen serial sections were analysed by immunohistochemistry using double immunostaining with antibodies against the macrophage marker F4/80 (Abcam, 1/500 or Santa Cruz, 1/50) and TNF- α antibody (Sigma, 1/200) or the M1 marker CD86 (Santa Cruz, 1/500) or the M2 marker CD206 (Santa Cruz, 1/500).

2.13 Statistical analysis

All values are represented as a mean \pm SEM. The difference between only two groups was analysed using non-parametric Mann-Whitney *U* test. The difference between three or more than three groups was analysed using one-way ANOVA followed by Tukey's post-test. A *P*-value <0.05 was considered to be statistically significant difference. All statistical tests were performed using the GraphPad Prism Software (V5, CA, USA).

3. Results

3.1 CB3 stability

The stability of CB3 was determined, following its incubation in mouse plasma for various periods of time (from 0 to 48 h) at 37°C, using HPLC-MS/MS. The peptide was quantified with the ratio of area peak at T₀ and every time point. The results showed a decrease of intact CB3 with time. After 24 h of incubation for example \sim 30% of CB3 was lost ([Supplementary material online, Figure S1](#)). Of note, its stability was found to be better when CB3 is dissolved in water rather than in saline

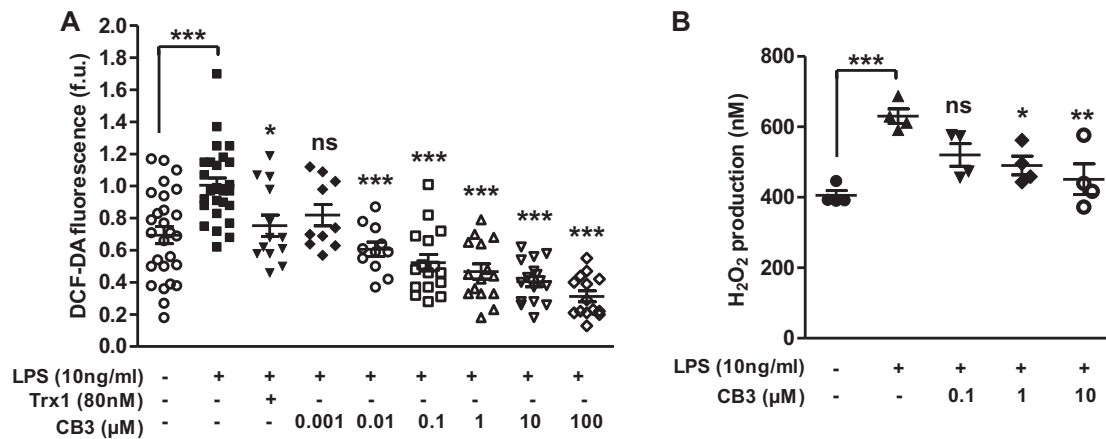


Figure 1 CB3 reduces ROS levels and H₂O₂ production in macrophages. (A) Murine macrophages were incubated with 10 ng/mL of LPS for 1 h followed by 1 h treatment with various concentrations of CB3 or with 80 nM of Trx-1. ROS levels were assessed by ROS-sensitive DCF-DA probe. Results are represented as mean ± SEM of 10 to 27 independent experiments. (B) Murine primary macrophages were treated with 10 ng/mL LPS for 4 h followed by a 24 h treatment with various concentrations of CB3. Culture media were collected, and the H₂O₂ production was evaluated by AmplexRed probe. Results are represented as mean ± SEM from four independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to determine statistically significant differences as compared to LPS-treated macrophages. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ and ns (no statistical significance).

buffer (Supplementary material online, Figure S11). In addition, CB3 does not bind to LDL nor to HDL particles (Supplementary material online, Figure S2).

3.2 CB3 is not cytotoxic in murine macrophages

The ability of CB3 to reduce intracellular ROS levels was analysed using the DCF-DA fluorescent probe. Macrophages were treated with LPS (pro-inflammatory) and a pro-oxidative agent at 10 ng/mL (Figure 1A) in the absence or presence of Trx-1 (80 nM) or various concentrations of CB3 (0.001–100 μM). As shown, LPS increases the ROS levels by 30%, ($P < 0.001$) compared to control macrophages. Under these pro-oxidant conditions, Trx-1 significantly decreases ROS levels by 20% ($P < 0.05$). Interestingly, in the presence of CB3 the ROS level is significantly reduced in a dose-dependent way with a maximal inhibition of about 68% ($P < 0.001$). Similarly, CB3 also reduced the extracellular levels of H₂O₂ in a dose-dependent manner (Figure 1B).

To determine whether or not the CB3 affects inflammatory processes in macrophages, we evaluated the concentrations of some major inflammatory markers such as MCP-1, IL-1β, IL-6, and TNF-α. As shown in Figure 2, LPS significantly increased the expression of all cytokines relative to the control and the treatment of LPS-activated macrophages with CB3 significantly reduced their expression. Of note, a similar effect of CB3 on MCP-1, TNF-α expression and intracellular ROS production is also seen by human macrophages (Supplementary material online, Figure S3).

3.3 CB3 inhibits NF-κB in murine macrophages

In order to determine the signal pathway through which CB3 exerts its anti-inflammatory effect, we explored the NF-κB pathway; one of the major inflammatory pathways. Western blot analysis revealed that I-κB phosphorylation (Figure 3A) was significantly increased in LPS-treated macrophages as compared to control cells (three-fold induction, $P < 0.01$). When macrophages were treated with LPS, we observed a

60% decrease in the presence of p65 in the cytoplasm ($P < 0.01$); whereas its presence was increased by 70% in the nucleus as compared to the control cells ($P < 0.01$) (Figure 3B,C). Therefore, LPS-induced I-κB phosphorylation and p65 translocation to the nucleus, indicating the activation of the NF-κB inflammatory pathway. In the presence of CB3, this tendency was reversed. The phosphorylation of I-κB was rapidly and significantly decreased (two-fold inhibition) after 5 min of treatment with CB3 (Figure 3A). Figure 3B,C show that CB3 increased p65 in the cytoplasm (the level of p65 increases two-fold in the cytoplasm after 30 min of CB3 treatment as compared to LPS treatment) and decreased its translocation to the nucleus (a two-fold decrease).

3.4 CB3 does not affect total cholesterol content in murine macrophages

Macrophages were incubated with LPS (10 ng/mL) for 4 h in the presence or absence of native LDL (100 μg protein/mL) or oxLDL (100 μg protein/mL). The cells were then treated in the presence or absence of CB3 (10 μM) for 24 h. During treatment, lipoproteins were not removed. Cellular total cholesterol content was determined according to the protocol described in the Methods section. The results indicated that CB3 tends to reduce the cholesterol content without however reaching a significant level (Supplementary material online, Figure S4).

3.5 Effect of CB3 on the plasma levels of oxidative and inflammatory markers in ApoE2.Ki mice fed HFD

To evaluate the antioxidant, anti-inflammatory, and vasculoprotective effects of CB3 in the pathological context of atherosclerosis, we used the ApoE2.Ki mice. This mouse model expresses the human ApoE2 isoform instead of the murine ApoE and develops atherosclerosis when fed HFD (21% of lipids).²³ Six-week-old female mice were randomized into two groups ($n = 6$ each group) and then treated daily for 10 weeks with intraperitoneal injection of water for the control group (C) or CB3 (10 μg/g

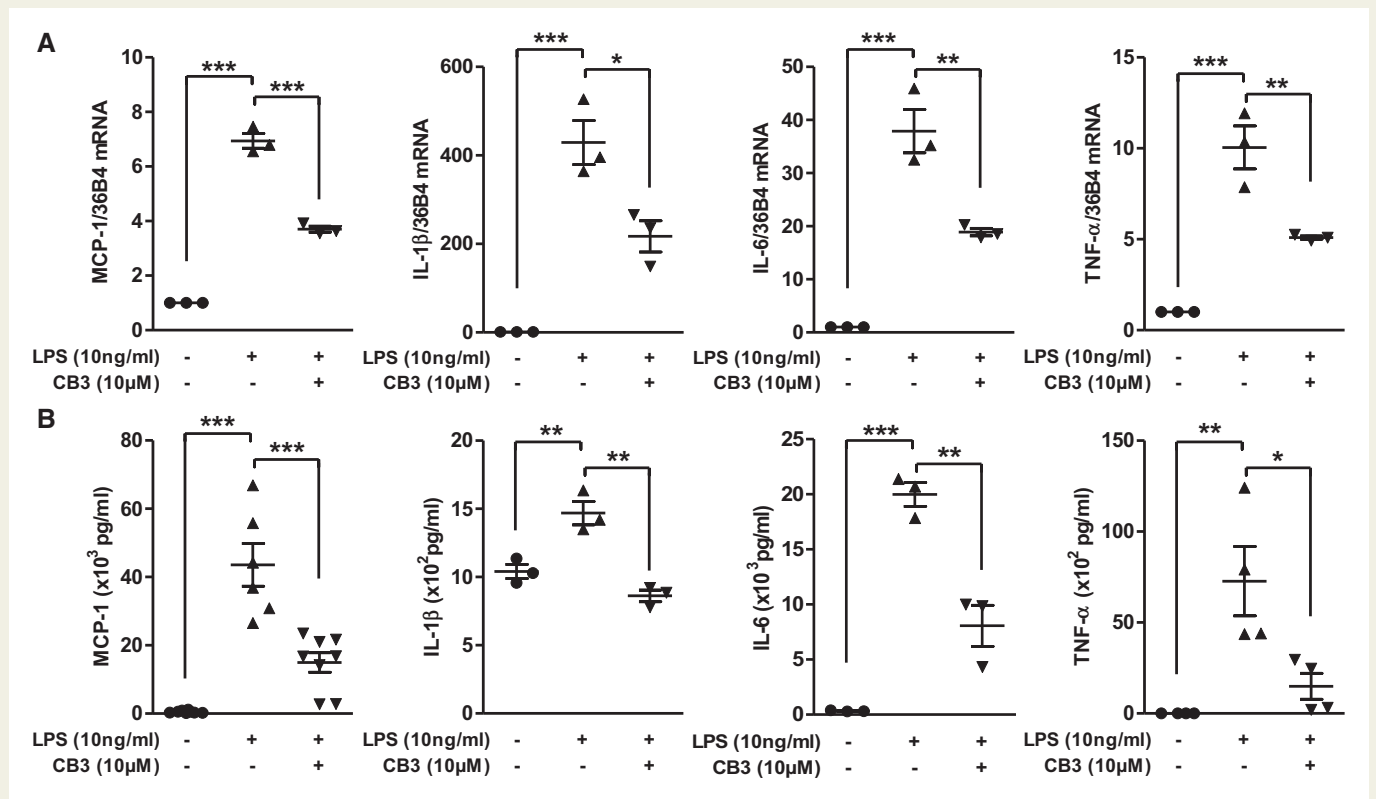


Figure 2 CB3 reduces proinflammatory cytokines mRNA and protein expression in macrophages. Murine macrophages were incubated with LPS (10 ng/ml) for 4 h followed by additional 24 h treatment with 10 μM CB3. Cell lysate and medium were collected and MCP-1, IL-1β, IL-6, TNF-α (A) mRNA and (B) protein levels were evaluated by RT-qPolymerase chain reaction and ELISA, respectively. Results are represented as mean ± SEM from 3 to 8 independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to determine statistically significant differences as compared to LPS-treated macrophages. **P < 0.01; ***P < 0.001 and ns (no statistical significance).

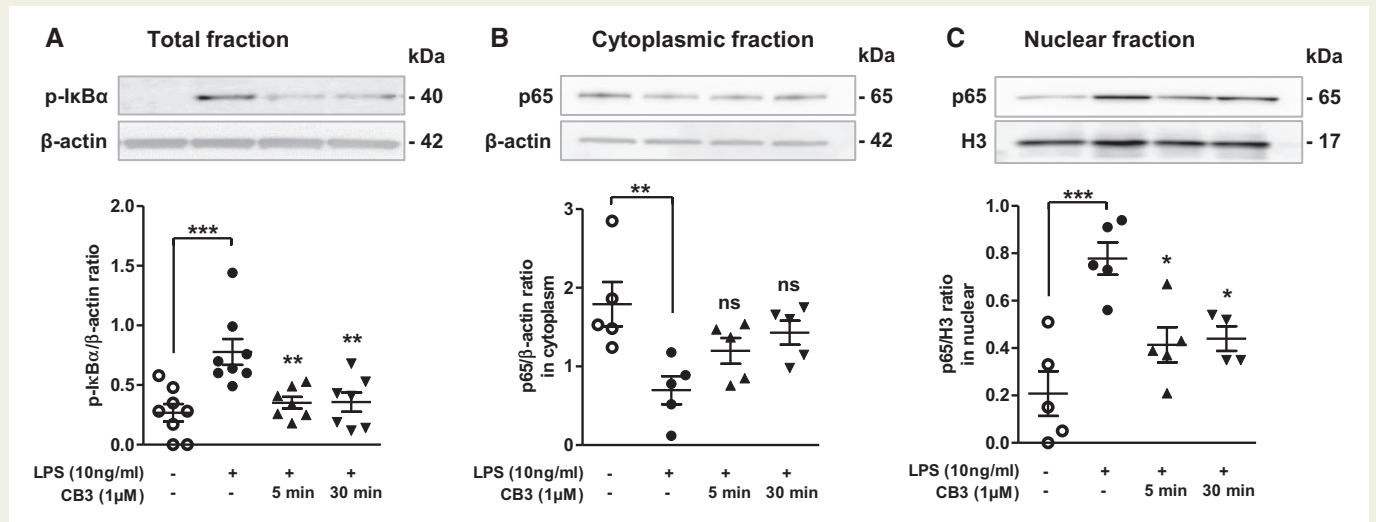


Figure 3 CB3 inhibits LPS-induced NF-κB activation in macrophages. Murine macrophages were incubated with LPS (10 ng/mL) for 4 h and then treated with 1 μM of CB3 during 5 or 30 min. 20 μg of (A) total, (B) cytoplasmic, or (C) nuclear cell lysates were separated on SDS-PAGE. The appropriate antibodies were used to visualize and quantify levels of p-IκB (p-IκB/β-actin, A) or p65 in cytoplasm (p65/β-actin, B) and in nuclei [p65/Histone3 (H3), C]. Results represent the mean ± SEM from 5 to 8 independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to determine statistically significant differences as compared to LPS-treated macrophages. *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001 and ns (no statistical significance).

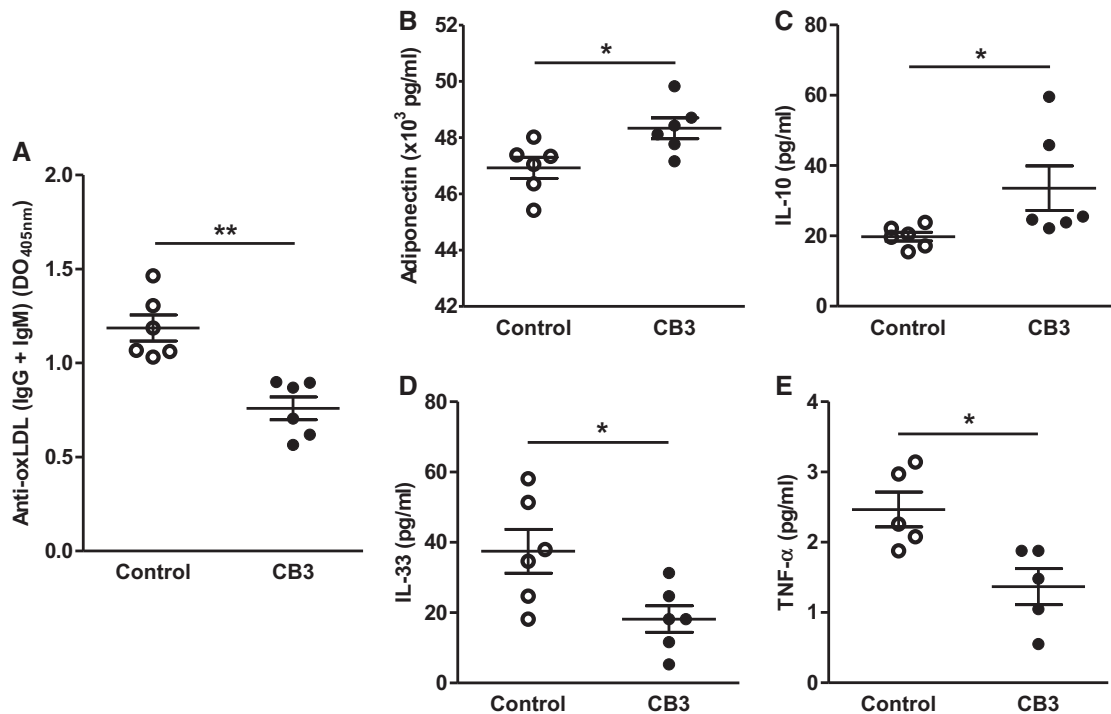


Figure 4 CB3 affects the levels of plasma oxidative and inflammatory markers in HFD-fed ApoE2.Ki. Two groups of female HFD-fed ApoE2.Ki mice were treated with CB3 (10 μ g/g bw) or with water (control) for 10 weeks. (A) Plasma levels of antibodies against oxLDL were analysed by ELISA. (B, C) Plasma anti-inflammatory cytokine levels or (D, E) pro-inflammatory cytokine levels were evaluated by the Luminex technique. Results represent the mean \pm SEM from 5 to 6 mice. Mann–Whitney’s *U* test was used to determine statistically significant differences as compared to control group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

of bw) for the treated group (CB3). At the end of the treatment, we determined the activity of both transaminases: Aspartate aminotransferase (ASAT) and Alanine Aminotransferase (ALAT) in plasma. The result showed comparable enzymatic activities in both groups indicating that CB3 does not induce hepatic cytotoxicity. ASAT: 247.3 ± 55.1 U/L (control) vs. 206.3 ± 68.7 U/L (CB3); ALAT: 19.9 ± 4.1 U/L (control) vs. 25.4 ± 1.4 U/L (CB3). In addition, we measured body weights, food intake and total plasma cholesterol, and triglycerides of control and CB3-treated mice. The results did not show any significant differences between both groups (Supplementary material online, Figure S5). In order to demonstrate the antioxidant properties of CB3, the plasma levels of antibodies directed against oxLDL (IgG and IgM) were evaluated. Treatment of ApoE2.Ki mice fed HFD with CB3 significantly reduced the plasma concentration of anti-oxLDL antibodies by $\sim 36\%$ ($P < 0.01$) in comparison to control mice (Figure 4A). In addition, in CB3-treated mice, the levels of adiponectin and IL-10, two factors known to exert an anti-inflammatory effect, are significantly increased in the plasma in comparison to control mice (Figure 4B and C). In contrast, the plasma levels of TNF- α and IL-33, which are involved in inflammation, decreased significantly in the CB3-treated mice in comparison to the control group (Figure 4D and E).

3.6 CB3 reduces the abundance of activated macrophages in HFD ApoE2.Ki mice

To evaluate the global impact of systemic administration of CB3 on the haematopoietic compartment and resident macrophages in ApoE2.Ki

mice fed HFD, we performed multiparametric flow cytometry analysis on the spleen of treated animals as compared to control mice. While long-term CB3 treatment had no measurable effect on cells belonging to the adaptive compartment of the immune system (data not shown), only resident macrophages were significantly affected, as CB3 treatment reduces the percentages of activated macrophages by 32.43% amongst the total CD45+ cell compartment (CB3 1.09 ± 0.09 vs C 1.61 ± 0.14) (Figure 5).

3.7 CB3 exerts an anti-atherogenic effect in ApoE2.Ki mice

Consistent with the findings of Sullivan *et al.*,²³ we observed a significant increase of the lesion size in HFD-challenged ApoE2.Ki mice as compared to ApoE2.Ki mice, fed on a regular chow diet. Therefore, we evaluated the mean lesion area in proximal aortas of control and CB3-treated groups. The results, shown in Figure 6A, indicate a significant decrease ($\sim 36\%$, $P < 0.05$) in lesion area of CB3-treated mice vs. the control group. In addition, lesional macrophages in control mice express high levels of CD86 and low levels of CD206, suggesting the predominant presence of proinflammatory M1 macrophages. However, when ApoE2.Ki mice were treated with CB3, the number of total macrophages (F4/80+) was reduced (Supplementary material online, Figure S6) among which M1 macrophages (CD86+) or (TNF- α +) were significantly reduced respectively (7.02 ± 0.37 for control vs 3.76 ± 0.47 for CB3-treated mice, $P < 0.01$) and (5.83 ± 0.87 for control vs 1.16 ± 0.40 for

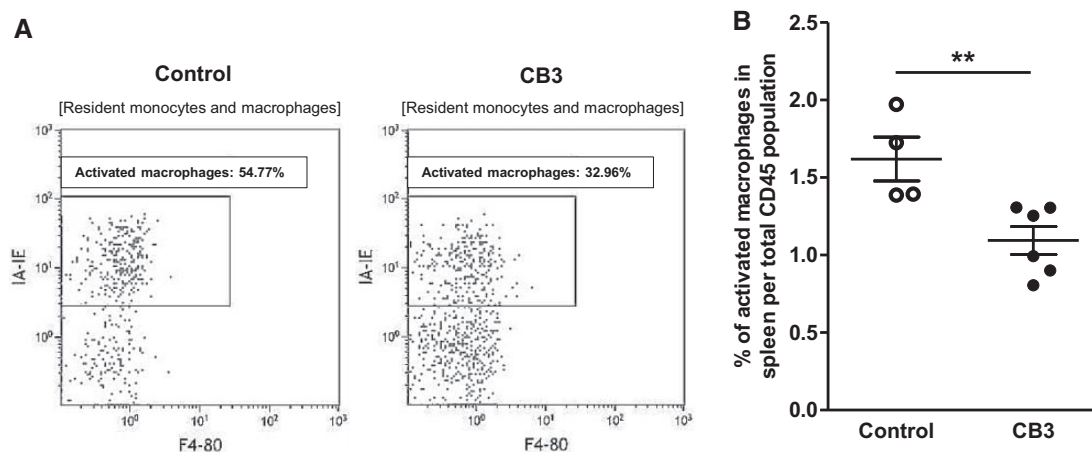


Figure 5 CB3 reduces activated macrophages in ApoE2.Ki mice fed HFD. Two groups of female HFD-fed ApoE2.Ki mice were treated with CB3 (10 μ g/g bw) or with water (control) for 10 weeks. Number of activated macrophages in the spleen were determined by multiparametric flow cytometry analysis and normalized per total CD45⁺ population (Supplementary material online). (A) A representative dot-plot of activated macrophages is shown. (B) Percentages of activated macrophages among total CD45⁺ population in untreated (C) and CB3-treated (CB3) animals. Results represent the mean \pm SEM from 4 to 6 mice. Mann–Whitney’s *U* test was used to determine statistically significant differences as compared to control group. ***P* < 0.01.

CB3-treated mice, *P* < 0.01). The number of M2 macrophages (CD206⁺) was, in contrast, significantly increased (3.71 \pm 0.59 for control vs. 6.56 \pm 0.86 for CB3-treated mice, *P* < 0.05) (Figure 6B and Supplementary material online, Figure S7).

4. Discussion

We conducted the present study using, CB3, a Trx-1-mimetic peptide, based on the active site Cys³²-Gly-Pro-Cys³⁵ (CXXC) of Trx-1, as alternative approach to the use of Trx-1 in therapy. This approach has been taken because full length Trx-1 can be cleaved leading to generation of proatherogenic Trx-80 particles which can compromise its potential therapeutic use in CVD. We showed that CB3 was able to reduce, in a dose-dependent manner, the level of intracellular ROS (Figure 1A) and extracellular H₂O₂ (Figure 1B) generated in LPS-activated macrophages. In addition, CB3 significantly decreased the level of potent pro-inflammatory cytokines, like MCP-1, IL-1 β , IL-6, and TNF- α , in LPS-activated macrophages (Figure 2) through the inhibition of the NF- κ B pathway (Figure 3). Of note, it is well established that ROS are directly induced, as second messengers, in the activation of NF- κ B by the oxidation of a cysteine-SH group. Reduction of ROS levels could, at least in part, represent the underlying molecular mechanism by which CB3 acts to inhibit NF- κ B pathway and to reduce inflammation. Moreover, intraperitoneal injection of CB3 peptide into HFD-fed ApoE2.Ki mice reduced the levels of circulating antibodies directed against oxLDL reflecting its antioxidative activity (Figure 4A) without affecting the plasma levels of total cholesterol or triglycerides (Supplementary material online, Figure S5C and D). CB3 treatment significantly increased anti-inflammatory proteins such as adiponectin and IL-10 (Figure 4B and C) and significantly reduced plasma levels of pro-inflammatory factors like IL-33 and TNF- α (Figure 4D and E). It also reduced the number of activated macrophages (M1 phenotype) in the spleen (Figure 5) and in the arterial lesion area (Figure 6B) suggesting its ability to orient macrophages toward the M2 anti-inflammatory phenotype. Finally, treatment of HFD-fed ApoE2.Ki mice

with CB3 significantly reduced the aortic lesion surface area (Figure 6A). Taken together, our results indicate that CB3 exerts several protective effects and could represent a novel therapeutic approach to treat CVDs.

During the last decades, tremendous efforts have been made to study the role of certain major risk factors such as hypertension, hyperglycaemia and hypercholesterolaemia in the development of CVD. This strategy allowed the generation of a first set of medications which are currently in use such as angiotensin-converting enzyme inhibitors (ACEIs), angiotensin II receptor blockers (ARBs), anticoagulants, cholesterol-lowering drugs (statins), beta-blockers, and some anti-inflammatory medicines (NSAID, glucocorticoids).²⁴ Although, many of these drugs have shown efficacy; many exert also a variety of undesirable effects and therefore are not suitable to use for a long-term treatment.^{25–27} Therefore, new medications to treat CVD are required. Given the adverse side effects associated with pharmacological therapy, therapeutics based on synthetic peptides have become an alternative strategy in the prevention of CVD. The advanced technologies which now allow the generation of stable, specific and efficient peptides, and peptidomimetics, has increased dramatically the interest for their use as potential therapeutic agents.^{28,29} For example, different apolipoprotein-AI (apoA-I) mimetic peptides such as the 4F,³⁰ D-4F, and L-4F,³¹ 6F,³² the FAMP, which has been reported to function specifically via ABCA1 (ATP-binding Cassette transporter A1),³³ and 5A³⁴ were generated. These peptides demonstrated atheroprotective effects in apoE^{-/-} mice, and 5A is under consideration for clinical trials.³⁵ Similarly, several mimetic peptides based on apoE structure have also been developed (reviewed by reference 24) The most studied peptide is the Ac-hE18A-NH₂, composed by a region of the LDL binding domain of apoE linked to the 18A apoA-I mimetic peptide.³⁶ This peptide reduced plasma cholesterol and atheroma formation and improved endothelial function.^{37,38} Moreover, It is important to note that a large collection of peptides of varying lengths have been reported for several biomedical applications, including diagnosis and therapy for atherosclerosis.³⁹ Although, an increasing number of studies have been using nanoparticle-associated

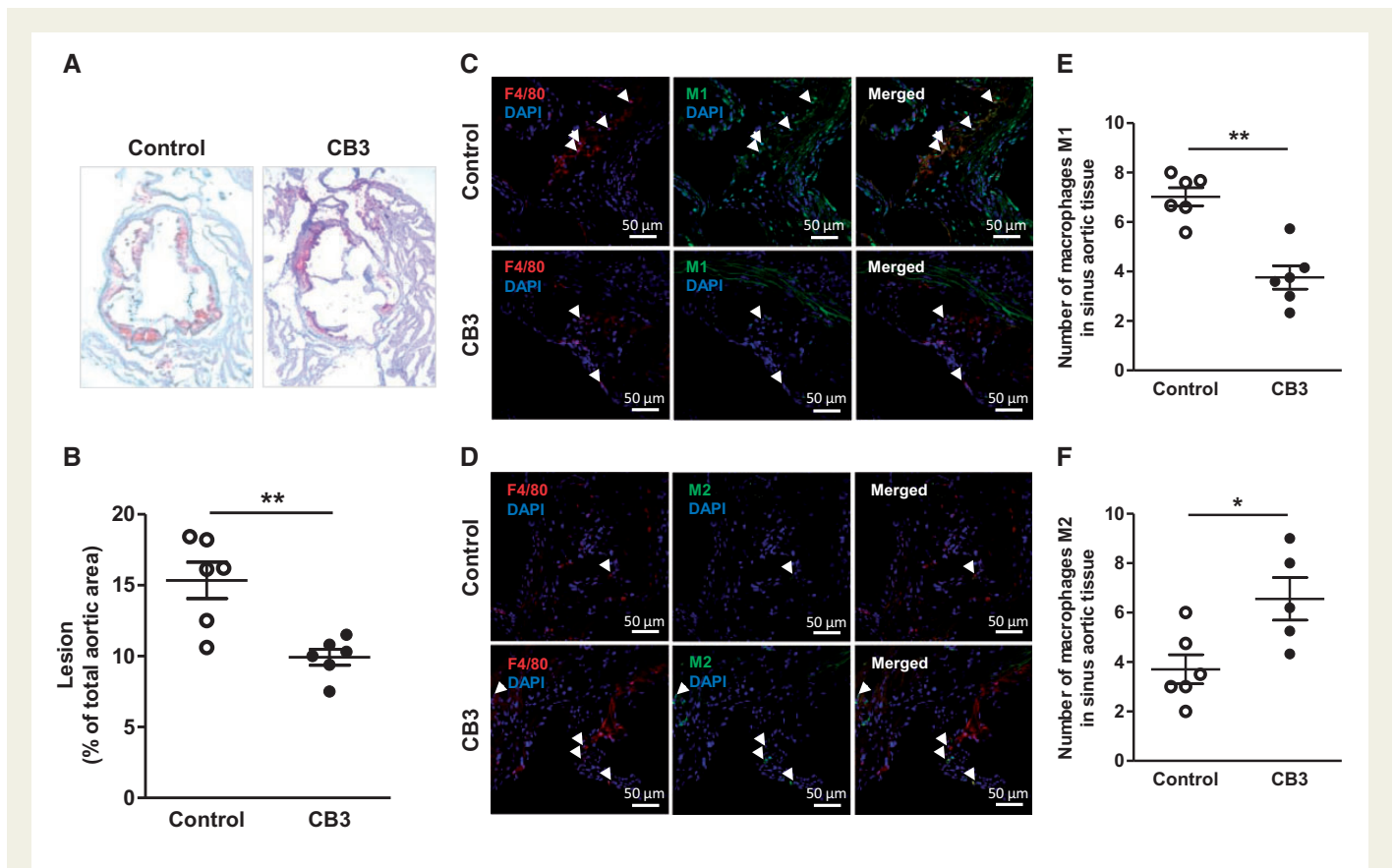


Figure 6 CB3 reduces atherosclerotic lesion area and M1 macrophages number in aortic sinus of ApoE2.Ki mice fed HFD. Two groups of female HFD-fed ApoE2.Ki mice were treated with CB3 (10 $\mu\text{g/g}$ bw) or with water (control) for 10 weeks. (A) The atherosclerotic lesion areas were examined by Oil Red O staining in aortic sinus. (B) Lesions were expressed as the % of total aortic area. (C) Serial sections of proximal aortas were immunostained with antibodies either against F4/80 (macrophage marker) and CD86 (M1 marker) or (D) against CD206 (M2 marker). Quantification of M1 or M2 macrophage phenotype (E, F) in sinus aortic tissue was performed, for each mouse, on 3 different sections separated each by 100 μm . The result indicates the mean numbers. A representative image for each immunostaining is shown. Results represent the mean \pm SEM for 6 mice. Mann–Whitney’s *U* test was used to determine statistically significant differences as compared to control group. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. DAPI, 4',6'-diamidino-2-phénylindole.

therapeutic peptides for atherosclerosis, some studies did not associate nanoparticle such as the D-4F, apoA-I mimetic peptide, which was given orally to apoE^{-/-} mice⁴⁰ or CB3 peptide which was intraperitoneally infused (present study).

Although lipid disorder is a major risk factor for CVD which justify the use of apoA-I or apoE mimetic peptides, inflammation, whether is related to lipid disorders or not, is generally accepted to participate in atherosclerosis progression.⁴¹ Therefore, targeting macrophages as a major actor of inflammation and proteins involving in chronic inflammation can also be an interesting therapeutic strategy for CVD treatment. Thus for example, certain mimetic peptides for Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS) reduced inflammatory and exert atheroprotective roles.^{42,43} In our present study, the use of Trx-1-mimetic peptide, CB3, is of great importance as it reduced oxidative stress, inflammation, and atherosclerotic lesions in ApoE2.Ki mice fed HFD without affecting lipid profile. Our results are strengthened by previous data indicating that small peptides based on the Trx-1 active site (W31-C-G-P-C-K36), containing the two active cysteines, were biologically active, particularly when the amino and carboxy terminal ends were blocked which facilitates their entry into cells,²⁰ Such peptides displayed a higher efficiency, compared to traditional antioxidant agents, such as N-acetylcysteine (NAC), dithiothreitol (DTT), glutathione (GSH), and ascorbic acid, in a variety of cellular pathways.^{20,44}

Aging and other risk factors can induce oxidative stress, particularly in vessels, where ROS contribute to vascular disease.⁴⁵ ROS in the vascular wall are generated by NADPH oxidases (NOX), xanthine oxidase, mitochondria, and dysfunctional endothelial nitric oxide synthase (eNOS). NOX2, expressed by endothelial cells and macrophages, is a major producer of O₂⁻ and disruption of its gene reduces atherogenesis in ApoE^{-/-} mice.⁴⁶ The early stage of atherosclerosis is associated with high levels of peroxide anion (O₂⁻) in human, rabbit, and primate models.⁴⁷ A major atherogenic mechanism occurs via the O₂⁻-mediated inactivation of nitric oxide (NO) leading to, not only peroxynitrite (ONOO⁻) formation but also to loss of vasculoprotective effects of NO. Through its powerful oxidizing properties, ONOO⁻ causes irreversible damage to proteins, lipids, and DNA.^{45,47,48} In addition, O₂⁻ is the precursor of H₂O₂ that can spontaneously convert to hydroxyl radical (OH[•]). Due to its extreme reactivity, OH[•] can damage most cellular compartments and contribute, with H₂O₂, to LDL oxidation in vessel wall.^{45,47} In addition, H₂O₂ reacts with myeloperoxidase, particularly in immune cells, to form highly reactive hypochlorous acid (HOCl). It was recently demonstrated that high concentration of H₂O₂ causes phenotypical transition of fibroblasts and smooth muscle cells in atherosclerotic plaques related to human advanced phenotype and instable plaque.⁴⁵ The biological impact of ROS depends not only on their quantities but also on their chemical nature,

subcellular and tissue location, and the rates of their formation and degradation. Otherwise, increased ROS favour pro-inflammatory genes expression via redox-sensitive transcription factor like NF- κ B. Our results demonstrate a potent anti-oxidative effect of CB3 that act probably by scavenging H₂O₂. This mechanism could, at least in part, indirectly explain the anti-inflammatory role of CB3.

Hence, the CXXC peptide is effectively protecting against oxidative stress and inflammation and could represent a new class of compounds for preventing and/or treating CVD. The CB3 peptide could be particularly useful in old people who have a high risk to develop CVD due, at least in part, to the increased cleavage of Trx-1 and the loss of its vasculoprotective effects.¹⁹

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

We thank Dr Christophe Piesse for synthesis of Trx-1 mimetic peptide (Peptide synthesis Platform, IBPS-Paris), Dr Nadir Benslimane and Julie Knoertzer for their precious help with mice housing and treatments (Animal house platform, IBPS-Paris), and Raphaël Thuillet for the immunohistochemical studies and Dr Christine Balducci Biophytis-Paris, for peptide stability analysis.

Conflict of interest: none declared.

Funding

This work was supported by the 'Fondation Coeur et Artères' [FCA14T4] and the 'Institut de Biologie Paris-Seine' for the 'Action incitative' program.

References

- Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jimenez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P. Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2017;**135**: e146–e603.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002;**420**:868–874.
- Cochain C, Zerneck A. Macrophages in vascular inflammation and atherosclerosis. *Pflügers Arch* 2017;**469**:485–499.
- Ginhoux F, Schultze JL, Murray PJ, Ochando J, Biswas SK. New insights into the multi-dimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nat Immunol* 2016;**17**:34–40.
- Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000;**164**:6166–6173.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;**3**:23–35.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004;**25**:677–686.
- Montecucco F, Liberale L, Bonaventura A, Vecchie A, Dallegri F, Carbone F. The role of inflammation in cardiovascular outcome. *Curr Atheroscler Rep* 2017;**19**:11.
- Bouhrel MA, Derudas B, Rigamonti E, Dievart R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPAR γ activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab* 2007;**6**:137–143.
- Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, Pedersen AA, Kalthoff C, Tullin S, Sams A, Summer R, Walsh K. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem* 2010;**285**:6153–6160.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:29–38.
- Mahmood DF, Abderrazak A, El Hadri K, Simmet T, Rouis M. The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 2013;**19**:1266–1303.
- Mitsui A, Hamuro J, Nakamura H, Kondo N, Hirabayashi Y, Ishizaki-Koizumi S, Hirakawa T, Inoue T, Yodoi J. Overexpression of human thioredoxin in transgenic mice controls oxidative stress and life span. *Antioxid Redox Signal* 2002;**4**:693–696.
- Hattori I, Takagi Y, Nakamura H, Nozaki K, Bai J, Kondo N, Sugino T, Nishimura M, Hashimoto N, Yodoi J. Intravenous administration of thioredoxin decreases brain damage following transient focal cerebral ischemia in mice. *Antioxid Redox Signal* 2004;**6**:81–87.
- Hadri KE, Mahmood DFD, Couchie D, Jguirim-Souissi I, Genze F, Diderot V, Syrovets T, Lunov O, Simmet T, Rouis M. Thioredoxin-1 promotes anti-inflammatory macrophages of the M2 phenotype and antagonizes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012;**32**:1445–1452.
- Pekkarı K, Holmgren A. Truncated thioredoxin: physiological functions and mechanism. *Antioxid Redox Signal* 2004;**6**:53–61.
- Gil-Bea F, Akterin S, Persson T, Mateos L, Sandebring A, Avila-Cariño J, Gutierrez-Rodríguez A, Sundström E, Holmgren A, Winblad B, Cedazo-Minguez A. Thioredoxin-80 is a product of alpha-secretase cleavage that inhibits amyloid-beta aggregation and is decreased in Alzheimer's disease brain. *EMBO Mol Med* 2012;**4**:1097–1111.
- Mahmood DF, Abderrazak A, Couchie D, Lunov O, Diderot V, Syrovets T, Slimane MN, Gosselet F, Simmet T, Rouis M, El Hadri K. Truncated thioredoxin (Trx-80) promotes pro-inflammatory macrophages of the M1 phenotype and enhances atherosclerosis. *J Cell Physiol* 2013;**228**:1577–1583.
- Gil-Bea F, Akterin S, Persson T, Mateos L, Sandebring A, Avila-Cariño J, Gutierrez-Rodríguez A, Sundström E, Holmgren A, Winblad B, Cedazo-Minguez A. Thioredoxin-80 is a product of alpha-secretase cleavage that inhibits amyloid-beta aggregation and is decreased in Alzheimer's disease brain. *EMBO Mol Med* 2012;**4**:1097–1111.
- Bachnoff N, Trus M, Atlas D. Alleviation of oxidative stress by potent and selective thioredoxin-mimetic peptides. *Free Radic Biol Med* 2011;**50**:1355–1367.
- Cohen-Kutner M, Khomsky L, Trus M, Aisner Y, Niv MY, Benhar M, Atlas D. Thioredoxin-mimetic peptides (TXM) reverse auranofin induced apoptosis and restore insulin secretion in insulinoma cells. *Biochem Pharmacol* 2013;**85**:977–990.
- Santanam N, Parthasarathy S. Paradoxical actions of antioxidants in the oxidation of low density lipoprotein by peroxidases. *J Clin Invest* 1995;**95**:2594–2600.
- Sullivan PM, Mezdour H, Quarfordt SH, Maeda N. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *J Clin Invest* 1998;**102**:130–135.
- Recio C, Maione F, Iqbal AJ, Mascolo N, De Feo V. The potential therapeutic application of peptides and peptidomimetics in cardiovascular disease. *Front Pharmacol* 2017;**7**:526.
- Costopoulos C, Niespialowska-Steuden M, Kukreja N, Gorog DA. Novel oral anticoagulants in acute coronary syndrome. *Int J Cardiol* 2013;**167**:2449–2455.
- Cheng J, Zhang W, Zhang X, Han F, Li X, He X, Li Q, Chen J. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers on all-cause mortality, cardiovascular deaths, and cardiovascular events in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *JAMA Intern Med* 2014;**174**:773–785.
- Stein EA, Raal FJ. Lipid-lowering drug therapy for CVD prevention: looking into the future. *Curr Cardiol Rep* 2015;**17**:104.
- Goodwin D, Simerska P, Toth I. Peptides as therapeutics with enhanced bioactivity. *Curr Med Chem* 2012;**19**:4451–4461.
- Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today* 2015;**20**:122–128.
- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR, Yu N, Ansell BJ, Datta G, Garber DW, Fogelman AM. Apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;**25**:1325–1331.
- Navab M, Anantharamaiah GM, Hama S, Garber DW, Chaddha M, Hough G, Lallone R, Fogelman AM. Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation* 2002;**105**:290–292.
- Navab M, Hough G, Buga GM, Su F, Wagner AC, Meriwether D, Chattopadhyay A, Gao F, Grijalva V, Danciger JS, Van Lenten BJ, Org E, Lusis AJ, Pan C, Anantharamaiah GM, Farias-Eisner R, Smyth SS, Reddy ST, Fogelman AM. Transgenic 6F tomatoes act on the small intestine to prevent systemic inflammation and dyslipidemia caused by Western diet and intestinally derived lysophosphatidic acid. *J Lipid Res* 2013;**54**:3403–3418.
- Uehara Y, Ando S, Yahiro E, Oniki K, Ayaori M, Abe S, Kawachi E, Zhang B, Shioi S, Tanigawa H, Imaizumi S, Miura S, Saku K. FAMP, a novel apoA-I mimetic peptide, suppresses aortic plaque formation through promotion of biological HDL function in ApoE-deficient mice. *J Am Heart Assoc* 2013;**2**:e000048.
- Remaley AT, Thomas F, Stonik JA, Demosky SJ, Bark SE, Neufeld EB, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Patterson AP, Eggerman TL, Santamarina-Fojo S, Brewer HB. Synthetic amphipathic helical peptides promote lipid efflux from cells by an ABCA1-dependent and an ABCA1-independent pathway. *J Lipid Res* 2003;**44**:828–836.
- Amar MJ, D'Souza W, Turner S, Demosky S, Sviridov D, Stonik J, Luchoomun J, Voogt J, Hellerstein M, Sviridov D, Remaley AT. 5A apolipoprotein mimetic peptide promotes cholesterol efflux and reduces atherosclerosis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;**334**:634–641.
- Sharifov OF, Nayyar G, Garber DW, Handattu SP, Mishra VK, Goldberg D, Anantharamaiah GM, Gupta H. Apolipoprotein E mimetics and cholesterol-lowering properties. *Am J Cardiovasc Drugs* 2011;**11**:371–381.

37. Gupta H, White CR, Handattu S, Garber DW, Datta G, Chaddha M, Dai L, Gianturco SH, Bradley WA, Anantharamaiah GM. Apolipoprotein E mimetic peptide dramatically lowers plasma cholesterol and restores endothelial function in watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 2005;**111**:3112–3118.
38. Datta G, White CR, Dashti N, Chaddha M, Palgunachari MN, Gupta H, Handattu SP, Garber DW, Anantharamaiah GM. Anti-inflammatory and recycling properties of an apolipoprotein mimetic peptide, Ac-hE18A-NH(2). *Atherosclerosis* 2010;**208**:134–141.
39. Chung EJ. Targeting and therapeutic peptides in nanomedicine for atherosclerosis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2016;**241**:891–898.
40. Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Hama S, Hough G, Grijalva VR, Wagner AC, Frank JS, Datta G, Garber D, Fogelman AM. Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 2004;**109**:3215–3220.
41. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011;**473**:317–325.
42. Mujtaba MG, Flowers LO, Patel CB, Patel RA, Haider MI, Johnson HM. Treatment of mice with the suppressor of cytokine signaling-1 mimetic peptide, tyrosine kinase inhibitor peptide, prevents development of the acute form of experimental allergic encephalomyelitis and induces stable remission in the chronic relapsing/remitting form. *J Immunol* 2005;**175**:5077–5086.
43. Ahmed CMI, Larkin J, Johnson HM. SOCS1 mimetics and antagonists: a complementary approach to positive and negative regulation of immune function. *Front Immunol* 2015;**6**:183.
44. Kim SR, Lee KS, Park SJ, Min KH, Lee MH, Lee KA, Bartov O, Atlas D, Lee YC. A novel dithiol amide CB3 attenuates allergic airway disease through negative regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; **183**:1015–1024.
45. Munzel T, Camici GG, Maack C, Bonetti NR, Fuster V, Kovacic JC. Impact of oxidative stress on the heart and vasculature: Part 2 of a 3-part series. *J Am Coll Cardiol* 2017;**70**:212–229.
46. Barry-Lane PA, Patterson C, van der Merwe M, Hu Z, Holland SM, Yeh ET, Runge MS. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice. *J Clin Invest* 2001;**108**:1513–1522.
47. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004;**84**:1381–1478.
48. Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol Metab* 2014;**25**:452–463.

Résultats supplémentaires

Supplemental data

Manuscript: MS # CVR-2017-862R2

A thioredoxin-mimetic peptide exerts potent anti-inflammatory, anti-oxidant, and atheroprotective effects in ApoE2.Ki mice fed high fat diet.

Fanny Canesi¹, Véronique Mateo² PhD, Dominique Couchie¹ PhD, Sonia Karabina³ PhD, Anne Nègre-Salvayre⁴ PhD, Mustapha Rouis*¹ PhD and Khadija El Hadri*^{§1} PhD

¹Sorbonne Université, Institut de Biologie Paris Seine (IBPS), CNRS, INSERM ERL U-1164, Biological Adaptation and Ageing (B2A), UMR-8256, F-75252 Paris, France.

²Sorbonne Université, INSERM U-1135, CIMI-Paris, Hôpital Pitié-Salpêtrière Centre de recherche d'Immunologie et Maladies infectieuses, UMRS CR7, F-75013 Paris, France.

³Sorbonne Université, INSERM, Hôpital Armand-Trousseau, Physiopathologie Des Maladies Genetiques D'Expression Pediatrique, UMR_S933, F-75012, Paris, France.

⁴Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires, INSERM-UPS, Lipides, Peroxydation, Signalisation et Maladies Vasculaires, UMR 1048, F-31432 Toulouse, France.

Running title: Atheroprotective effect of CB3 in ApoE2.Ki mice fed HFD

*These author contributed equally

§To whom correspondence should be addressed:

CNRS UMR-8256/INSERM ERL U-1164

Bât. A, 6ème étage

Université Pierre et Marie Curie (UPMC, Sorbonne Universités).

7, Quai Saint Bernard

75252 Paris Cedex, France,

Tél : 33 1 44 27 20 28

E-mail: khadija.zegouagh@upmc.fr

Keywords: Atherosclerosis, Thioredoxin-1, inflammation, oxidative stress, macrophages, Thioredoxin-mimetic peptide, CB3

Materials

Peptide Synthesis, Purification and Stability.

Carboxamidated CB3 peptide was synthesized via Fmoc chemistry using the Liberty Blue™ automated microwave peptide synthesizer (CEM Corporation), a Rink Amide MBHA resin (Merck Millipore, ref: 855003), and a systematic double-coupling protocol. Fmoc-protected amino acids were purchased from Iris Biotech GMBH, solvents from Carlo Erba and all other reagents from Sigma-Aldrich. The NH₂ terminal of the crude peptide was acetylated with addition of 10% acetic acid. The peptide was cleaved from the resin and deprotected using standard TFA procedures with 1,2-ethanedithiol, water, and triisopropylsilane as scavengers. The peptide was purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) using a Phenomenex Luna® C18 (2) semi-preparative column (5 µm, 250 × 10 mm) eluted at a flow rate of 5 mL/min by a 0-60% linear gradient of ACN (0.07% TFA) in 0.1% TFA/water (1% ACN/min). The homogeneity and identity of the synthetic peptide were assessed by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (Voyager DE-PRO Applied Biosystems, Mass Spectrometry and Proteomics Platform, IBPS, UPMC, Paris, France) and analytical RP-HPLC (Apollo C18 column, 5 µm, 250 x 4.6 mm, W.R. Grace) using the above conditions with a flow rate of 0.75 ml/min.

The stability of CB3 was determined following its incubation in mouse plasma for various periods (from 0 to 48 h) at 37°C. Plasma samples containing CB3 were then treated with 4 volumes of methanol fixed and after 30 min of freezing, they were centrifuged during 10 min. Aliquots from supernatants were treated with 1 mM DTT. HPLC-MS/MS analyses were performed with a QQQ Mass Spectrometer 6420 (Agilent Technologies) in the ESI mode. The HPLC apparatus comprised a quaternary pump G1311 and a multi-sampler injector G7167 (Agilent). Separation was performed in a Fortis C18 column 50mm long, 2.1 mm i.d. (5 µm particles), at t 30°C, flow-rate 0.3 ml/min, gradient 0% to 90% (in 10 min) of acetonitrile in water containing 0.1% formic acid. The injection volume was 5 µl. Detection used SIM Mode. The ion used was 361.1 (M-H)⁻. The peptide was quantified with the ratio of area peak at T₀ and every time point.

Real-time PCR

For real time PCR, we used primer sequences reported in Table I (Eurofins, Luxembourg).

Table I: Mouse primers		
Genes	Forward sequence	Reverse sequence
36B4	AGCTGAAGCAAAGGAAGAGTCGGA	ACTTGGTTGCTTTGGCGGGATTAG
MCP-1	TCACCTGCTGCTACTCATTACCA	TACAGCTTCTTTGGGACACCTGCT
IL-1 β	AAGGGCTGCTTCCAAACCTTTGAC	ATACTGCCTGCCTGAAGCTCTTGT
IL-6	ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
TNF- α	TTCATGCACCACCATCAAGGACT	ACCACTCTCCCTTTGCAGAACTCA
Human primers		
36B4	TGCAGCTGATCAAGACTGGAGACA	TCCAGGAAGCGAGAATGCAGAGTT
MCP-1	TCGCTCAGCCAGATGCAATCAATG	TGGAATCCTGAACCCACTTCTGCT
TNF- α	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA

Western blot analysis

Macrophages were incubated with LPS (10 ng/ml) for 4 h and then treated with CB3 at 1 μ M for 5 or 30 min in 6-well plates. Cells were incubated with lysis buffer (Sigma-Aldrich, USA) containing protease inhibitors cocktail (Roche, France). Cell lysates were incubated on ice for 1 h and centrifuged at 13 000xg for 10 min at 4 °C. The proteins content in the supernatant were determined using a bicinchoninic acid assay (BCA). 20 μ g of the proteins were loaded into the gel and separated by 12% SDS-PAGE. The resolved proteins were transferred to nitrocellulose membranes and the blocking was assessed with 5% non-fat milk in PBS with 0.1% Tween-20 (PBS-T) for 1 h at room temperature (RT). The blots were then incubated overnight at 4 °C with a primary antibody against either β -actin (1:5 000, Sigma-Aldrich, USA) or P-I κ B- α (1:1 000, Cell Signaling Technology, Netherlands). The membranes were washed with PBS-Tween and probed with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1h at RT. Membranes were revealed with the enhanced chemiluminescence (ECL) detection reagents (Healthcare) and the Fujifilm LAS-3000 imager. The levels of proteins expression were calculated as the relative band density by ImageJ software.

Cell fractionation

Macrophages were incubated with LPS (10 ng/ml) for 4 h and then treated with CB3 (1 μ M) for 5 or 30 min. Cell lysates were centrifuged at 500xg during 5 min and the pellets were re-suspended with hypotonic buffer containing 10% NP40. After centrifugation at 3000xg for 10 min, the cytoplasmic fractions (supernatants) were removed and the pellets were re-suspended with cell extraction buffer (Invitrogen, USA) and incubated on ice for 10 min. This step was repeated three times. The nuclear fractions were harvested after centrifugation at 14000xg for 30 min. The proteins in the supernatant were determined using a bicinchoninic acid assay (BCA). 20 μ g were loaded into the gel and separated by 12% SDS-PAGE. For Western blot analysis, we used primary antibody against either p65 (1:1.000, Cell Signaling Technology, Netherlands), β -actin (1:5.000, Sigma-Aldrich, USA) or histone H3 (1:1.000, Sigma-Aldrich, USA).

ApoE2.Ki mice

All animal studies were carried out by procedures approved by the “Ministère de l'éducation nationale de l'enseignement supérieur et de la recherche” (01480.02, 06-09-2016). C57Bl/6.ApoE2.ki mice were obtained from Dr Nobuyo Maeda (Department of pathology and laboratory medicine, University of North Carolina). These mice were generated by replacement of the mouse *ApoE* gene with the human *ApoE₂* allele *via* targeted gene replacement in embryonic stem cells¹. Mice expressing human ApoE2 isoform have virtually all the characteristics of type III hyperlipoproteinemia in man. Their plasma cholesterol and triglyceride levels are both twice to three times those in normolipidemic mice¹. These mice are markedly defective in clearing migrating VLDL particles, and spontaneously develop atherosclerotic plaques, even on a regular diet. An atherogenic diet exacerbates development of atherosclerosis in these ApoE2.Ki mice¹. Thus, female C57Bl/6.ApoE2.Ki mice (6 weeks-old) were randomly divided into two groups (n=6 per group). One group was daily injected intraperitoneally with water for 10 weeks (control, C). The other group was injected daily with CB3 (10 μ g/g bw) for 10 weeks. This dose was chosen because in pilot experiments, (using 1, 10 and 20 μ g/g bw), it exerted the maximum reduction of the generation of antibodies directed against oxLDL in mice plasma suggesting that the treatment of HFD-fed ApoE2.Ki mice with 10 μ g/g bw for 10 weeks has the maximum antioxidant effect. Of note, CB3 has been already used for *in vivo* study (rats and mice) at concentrations ranged between 1 to 50 μ g/g of bw^{2,3}.

According to the Annex IV of Official Journal of the European Union (20.10.2010), for the analysis of ApoE2.Ki mice, animals were intraperitoneally injected with anesthetic overdose (pentobarbital, 150 mg/kg) and the sacrifice was completed by permanent cessation of the

circulation. At the end of the study, blood samples were collected in EDTA tubes and the heart and spleen were excised.

Isolation and Culture of Human Monocytes-derived macrophages

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from buffy-coats of healthy donors using Ficoll gradient centrifugation. Monocytes were selected by adherence and were subsequently cultured in RPMI 1640 medium containing penicillin and streptomycin (and 10% pooled human serum (Promocell, Heidelberg, Germany) at a density of 0.5×10^6 cells/well in 6 well-plate Primaria-plastic culture dishes (Polylabo, Strasbourg, France). During adherence and 7 day culture monocytes differentiate to macrophages. For analysis, macrophages were washed three times with PBS and incubated in the serum-free RPMI medium supplemented with penicillin / streptomycin. The use of buffy coats to isolate human monocytes was approved through the convention N°15EFS012 between "INSERM" and "Etablissement Français du Sang".

Determination of anti-oxLDL antibodies

Human LDL ($d = 1.019-1.063$) was isolated from frozen plasma of 2 healthy volunteers by gradient ultracentrifugation as described previously⁵. The use of frozen plasma was approved through the convention N°15EFS012 between "INSERM" and "Etablissement Français du Sang". The donors have given their written consent. All criteria in the convention were met. The LDL protein was determined by the bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce, Rockford, IL). Freshly prepared, filter ($0.45 \mu\text{m}$) sterile LDL (1mg/ml of protein in PBS), was oxidized in the presence of $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 for 24 h. Oxidation kinetics were monitored at 234 nm. Oxidation was stopped by adding $20 \mu\text{M}$ EDTA. For ELISA assay, 96-well plates were freshly coated with $100 \mu\text{l}$ of oxLDL ($5 \mu\text{g/ml}$) in PBS overnight at 4°C . The wells were blocked with 1% BSA for 2h at RT. A $100 \mu\text{l}$ aliquot of diluted (1:40) plasma from each mice ($n=6$) was added in quadruplicate and incubated for 2h at RT. After three washes with PBS containing 0.1% Tween-20, a mixture of goat anti-mouse IgM and IgG conjugated with peroxidase (1:1.000 dilution, Beckman-Coulter, Paris, France) was added to each well, and the incubation continued for 2h at RT. Plates were washed again, and the alkaline peroxidase activity was determined using ortho-phenylenediamine dichloride (OPD, Sigma) as a substrate and detected at 492 nm.

Tissue analysis by flow cytometry

Cell suspensions were obtained from spleen, bone-marrow or peritoneal lavage of euthanized animal. Spleens were further dissociated by enzymatic digestion using 1mg/ml of collagenase IV (Sigma-Aldrich, USA) and 0.2mg/ml of DNase (Roche, France). After

counting, cells were stained using Fixable Viability Dye eFluor®780 at 2–8°C for 10 min (eBioscience, USA). Then, cell suspensions were incubated with monoclonal antibodies (mAbs) against surface antigens (Table II) at 4°C during 20 min, and permeabilized with Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience, USA), according to manufacturer's instructions. Acquisition and data analyses were performed using Fortessa flow cytometer (Becton Dickinson) and Kaluza software (Beckman Coulter). Gating strategy is showed in the online-only data supplement figure IX.

mAbs & fluorochromes	Host reactivity	Clone	Manufacturer
CD45-PE-CF594	Rat anti-mouse	30-F11	BD Horizon™
CD4-PE	Rat anti-mouse	RM4-5	BD Horizon™
I-A/I-E-V500	Rat anti-mouse	M5/114.15.2	BD Pharmigen™
CD3e-FITC	Hamster anti-mouse	145-2C11	BD Pharmigen™
CD8a-AlexaFluor®700	Rat anti-mouse	53-6.7	BD Pharmigen™
CD19-eFluor 780	Rat anti-mouse	1D3	eBioscience
CD335 (NKp46)-FITC	Rat anti-mouse	29A1.4	BD Pharmigen™
CD11b-AlexaFluor®700	Rat anti-mouse	M1/70	BD Pharmigen™
CD11c-APC	Hamster anti-mouse	HL3	BD Pharmigen™
Ly6G-PE	Rat anti-mouse	1A8	BD Pharmigen™
Ly6C-PE-Cy7	Rat anti-mouse	AL-21	BD Pharmigen™
FoxP3-APC	Rat anti-mouse	FJK16s	eBioscience

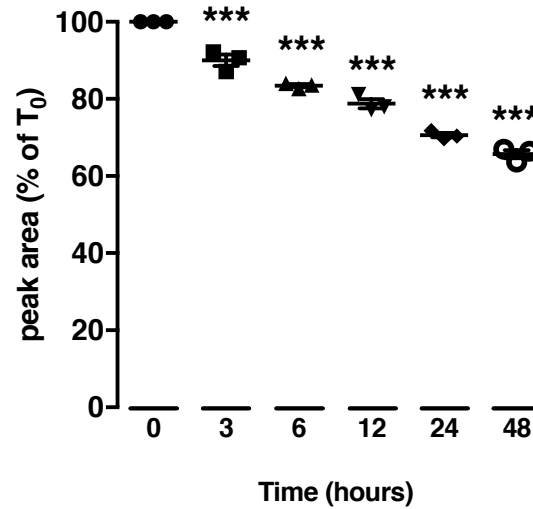
Biochemical measurements

LDL cholesterol levels of murine macrophages were evaluated with Cholesterol/ Cholesteryl Ester Assay Kit according to the manufacturer's instructions (Abcam, UK). The microwell absorbance was read at 570 nm with a microplate reader (BioTek instruments, USA). Serum ALAT and ASAT activities were assayed with the Reflovet Plus clinical chemistry analyzer (Scil Animal Care Company, France). The plasma total cholesterol and triglycerides were measured respectively with Cholesterol FS and Triglycerides FS kit (Diasys, USA) according to the instructions of the supplier. The microwell absorbance was read at 500 nm with a microplate reader (BioTek instruments, USA).

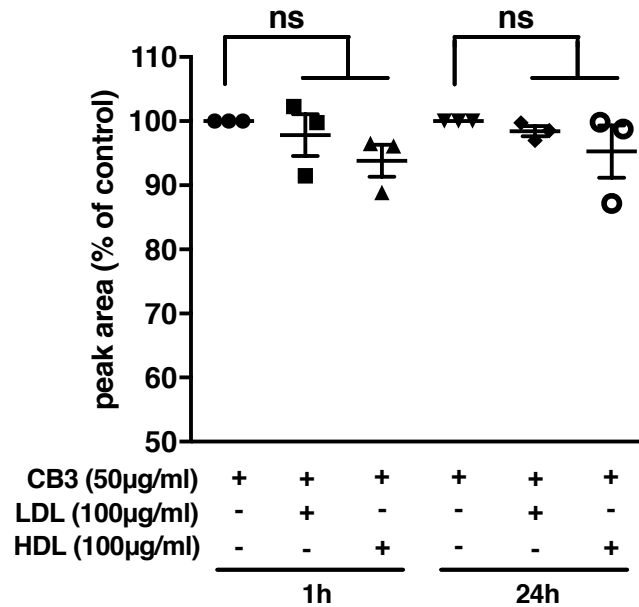
References

1. Sullivan PM, Mezdour H, Quarfordt SH, Maeda N. Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *J Clin Invest.* 1998;**102**:130-135.
2. Cohen-Kutner M, Khomsky L, Trus M, Aisner Y, Niv MY, Benhar M, Atlas D. Thioredoxin-mimetic peptides (TXM) reverse auranofin induced apoptosis and restore insulin secretion in insulinoma cells. *Biochem Pharmacol.* 2013;**85**:977-990.

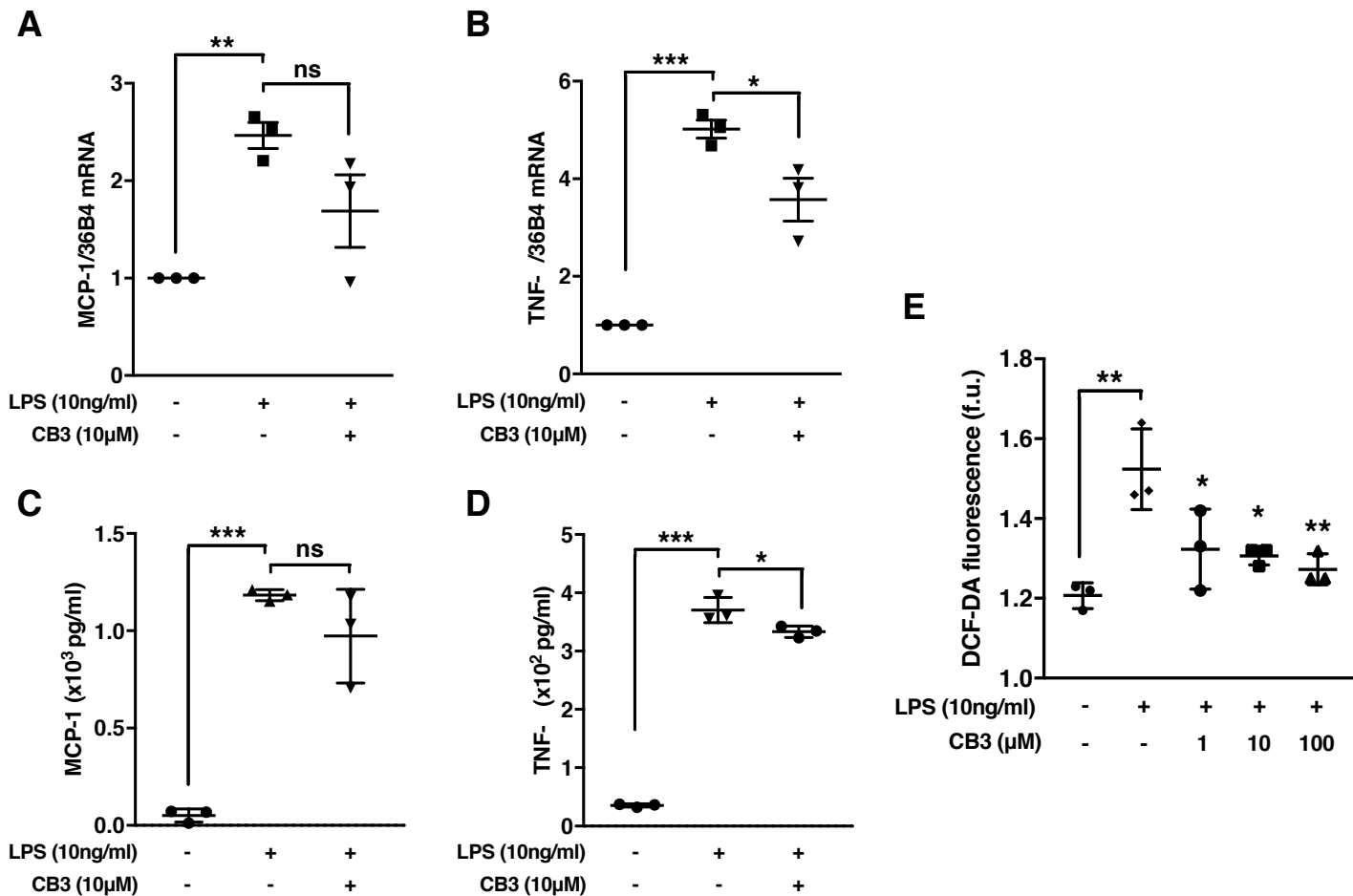
3. Kim SR, Lee KS, Park SJ, Min KH, Lee MH, Lee KA, Bartov O, Atlas D, Lee YC. A novel dithiol amide CB3 attenuates allergic airway disease through negative regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;**183**:1015-1024.
4. Billiet L, Furman C, Cuaz-Perolin C, Paumelle R, Raymondjean M, Simmet T, Rouis M. Thioredoxin-1 and its natural inhibitor, vitamin D3 up-regulated protein 1, are differentially regulated by PPARalpha in human macrophages. *J Mol Biol*. 2008;**384**:564-576.
5. Santanam N, Parthasarathy S. Paradoxical actions of antioxidants in the oxidation of low density lipoprotein by peroxidases. *J Clin Invest*. 1995;**95**:2594-2600.



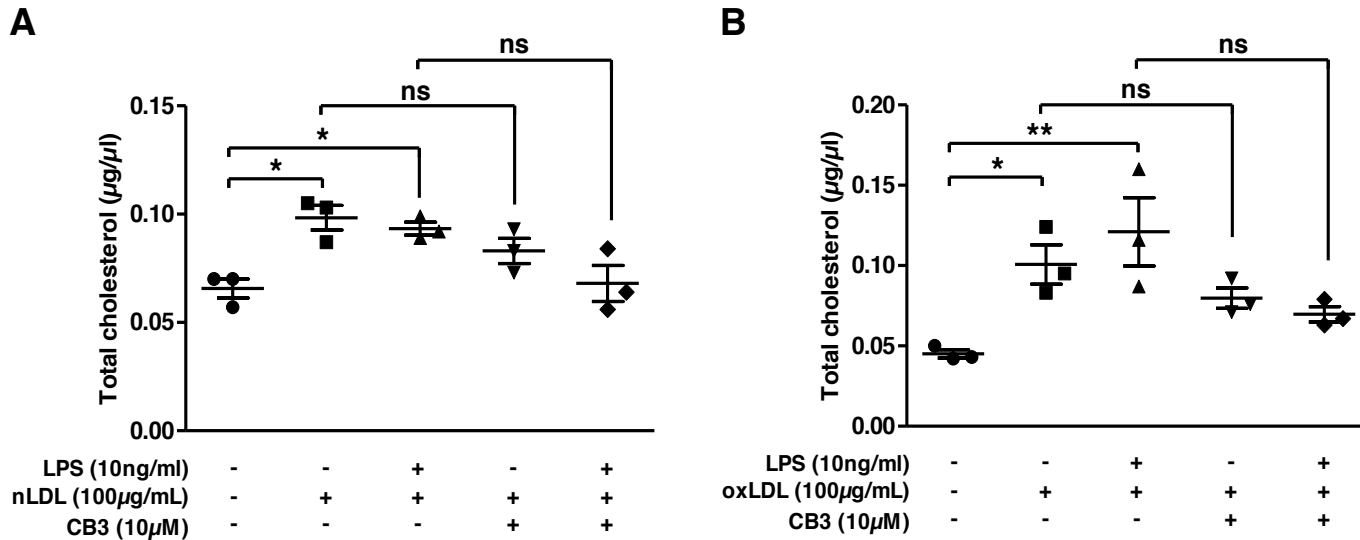
Supplemental Figure I: Stability of CB3 in plasma of mice. CB3 (50 $\mu\text{g/ml}$) was incubated with mouse plasma for different period of times (0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours). Following methanol precipitation and centrifugation, supernatants were analyzed by HPLC-MS/MS. CB3 was quantified with the ratio of area peak (% of T₀). Results are represented as means \pm SEM of 3 independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to determine statistically significant differences. *** $p < 0.001$.



Supplemental Figure II: CB3 does not bind LDL or HDL particles in vitro. CB3 (50 µg/ml) was added to LDL (100 µg/ml) or HDL (100 µg/ml) and the mixtures were incubated for 1h or 24h at 37°C. For the control, CB3 was incubated in the same conditions in the absence of lipoproteins. The mixtures were then centrifuged through centrifugal filter (Amicon Ultra 3K cutoff-3 000 Nominal Molecular Weight Limit, NMWL). Free CB3 but not CB3 that could bind lipoproteins can cross the filter and can be quantified by HPLC-MS/MS. CB3 was quantified with the ratio of area peak (% of control). Results are represented as means \pm SEM of 3 independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to determine statistically significant differences (ns: no statistical significance).

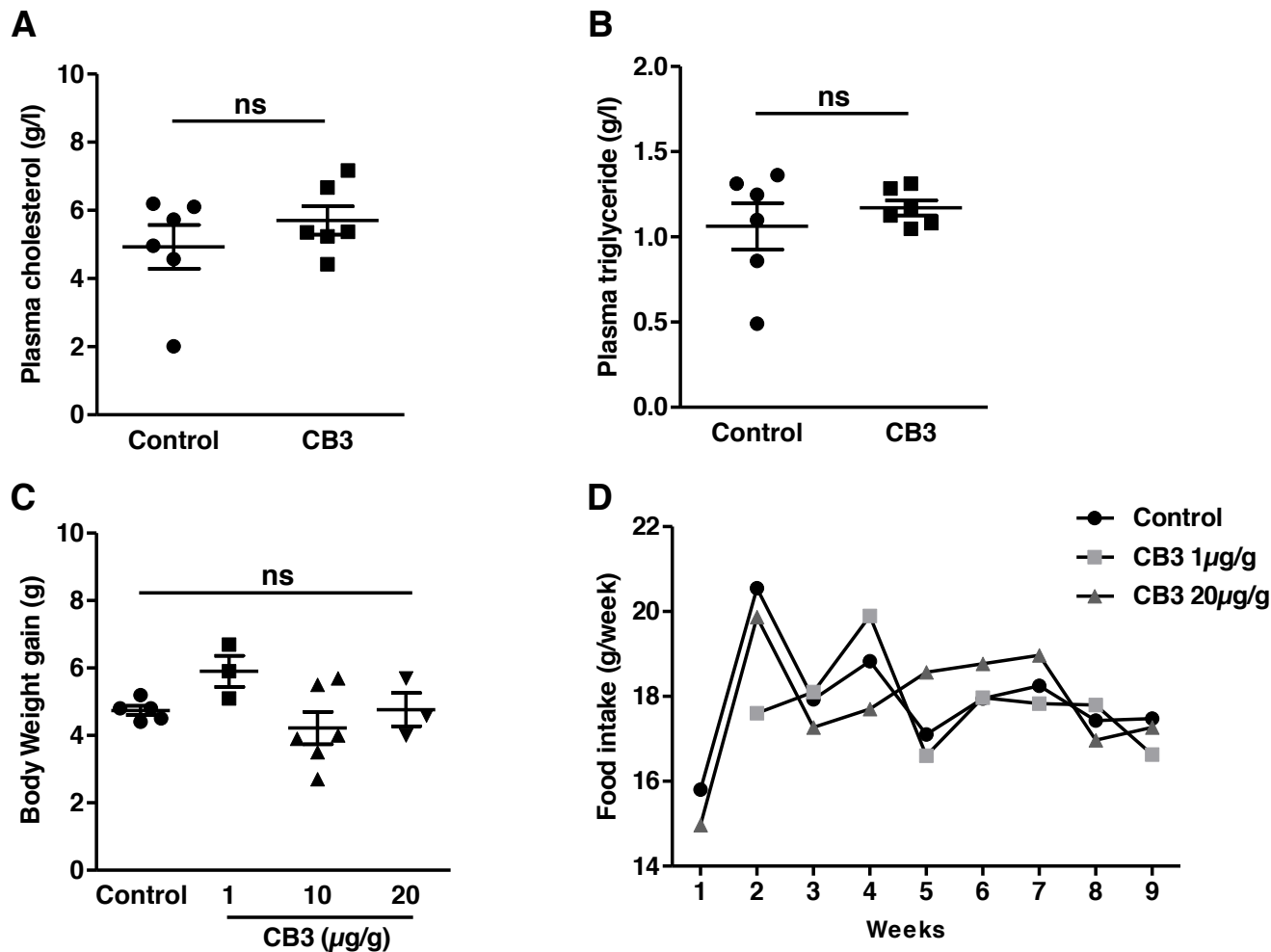


Supplemental Figure III. CB3 reduces pro-inflammatory cytokine expression and ROS production in human macrophages. Human macrophages were first incubated with or without LPS at 10 ng/ml for 4 h. Thereafter, the medium was removed and a fresh medium containing LPS (10 ng/ml) with or without CB3 at 10 mM was added for additional 24 h. Cell lysates and medium were collected and MCP-1, TNF- α mRNA (**A**, **B**) and protein (**C**, **D**) levels were evaluated by RT-qPCR and ELISA respectively. (**E**) Human macrophages were incubated with LPS at 10 ng/ml for 1h and treated or not with CB3 at 1, 10 or 100 μ M for an additional 1h. ROS levels were assessed by the ROS-sensitive DCF-DA probe. Results show the mean \pm SEM of 3 independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to determine statistically significant differences as compared to LPS-treated human macrophages. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 and ns (no statistical significance).

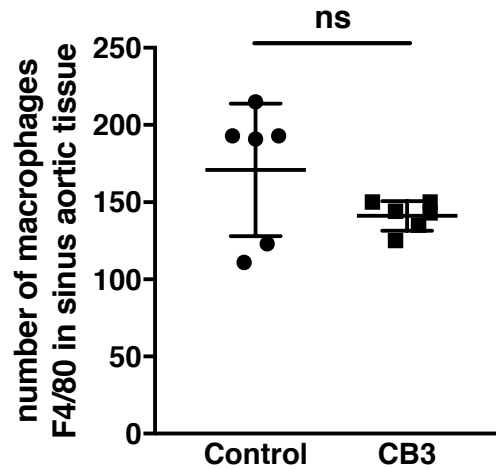


Supplemental figure IV: CB3 does not affect the incorporation of LDL-cholesterol into the macrophages.

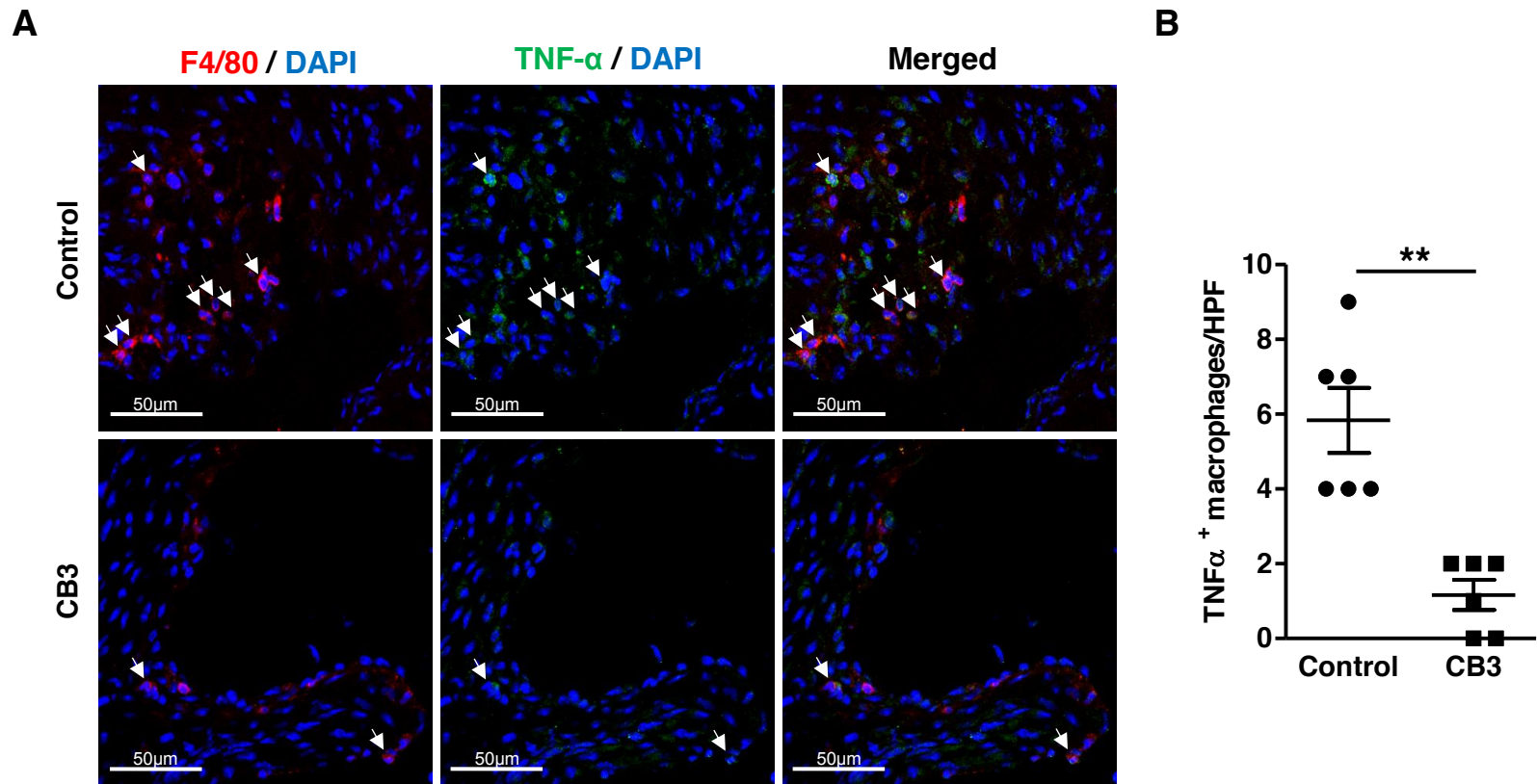
Murine macrophages were treated or not with 10 ng/ml of LPS in the presence or in the absence of **(A)** native LDL (100 μg protein/ml) or **(B)** oxLDL (100 μg protein/ml) for 4h and then treated or not with CB3 (10 μM) during 24h. Cell extracts were collected and the incorporation of total cholesterol was evaluated. Results are represented as means \pm SEM of 3 independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to determine statistically significant differences. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and ns (no statistical significance).



Supplemental figure V: Effect of CB3 on the cholesterol, triglyceride, body weight and food intake in ApoE2.Ki mice fed HFD. ApoE2.Ki mice subjected to a HFD diet treated (CB3) or not (Control) with 10 $\mu\text{g} / \text{g}$ CB3 for 10 weeks and **(A)** cholesterol and **(B)** triglyceride plasma levels were evaluated. **(C)** Body and **(D)** food intake of ApoE2.Ki mice subjected to a HFD diet and treated or not (Control) with different doses of CB3 for 10 weeks. Results are mean \pm SEM of 3 to 6 mice. Mann Whitney's test or one-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to determine statistically significant differences as compared to control group (ns: no statistical significance).

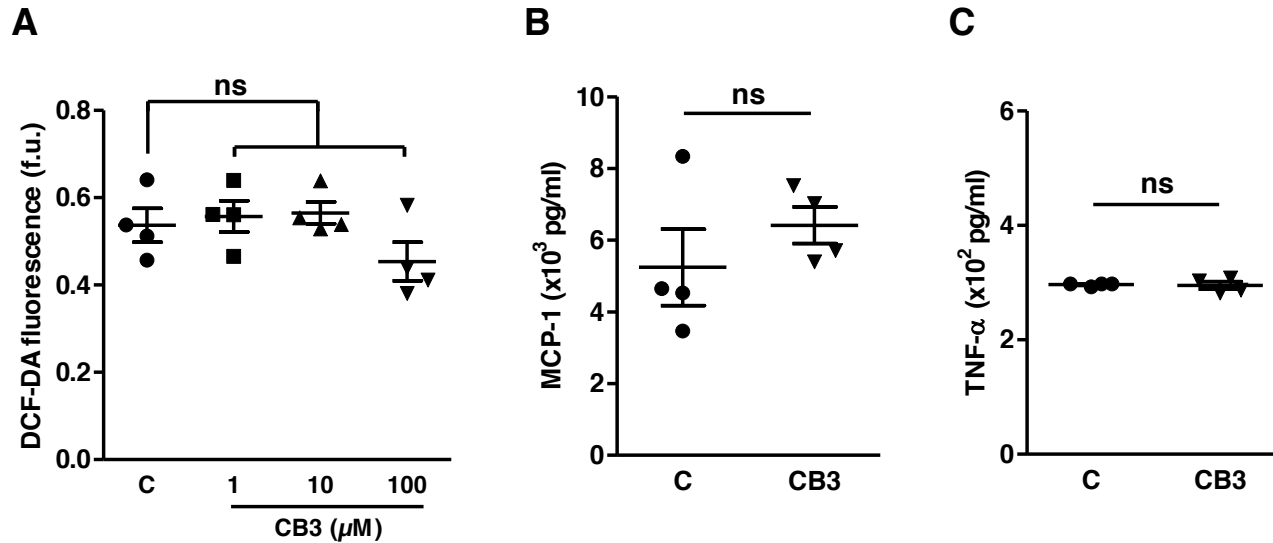


Supplemental Figure VI. CB3 reduces F4/80+ macrophages number in aortic sinus of ApoE2.Ki mice fed HFD. Two groups of ApoE2.Ki mice (n=6 for each group) were fed HFD and simultaneously treated with water (control) or with CB3 (10 $\mu\text{g/g}$ bw) during 10 weeks. Serial sections of proximal aortas were analyzed by immunohistochemistry using F4/80 antibody (macrophage marker). Results are means \pm SEM of 6 mice. Mann Whitney's test was used to determine statistically significant differences as compared to control group (ns: no statistical significance).

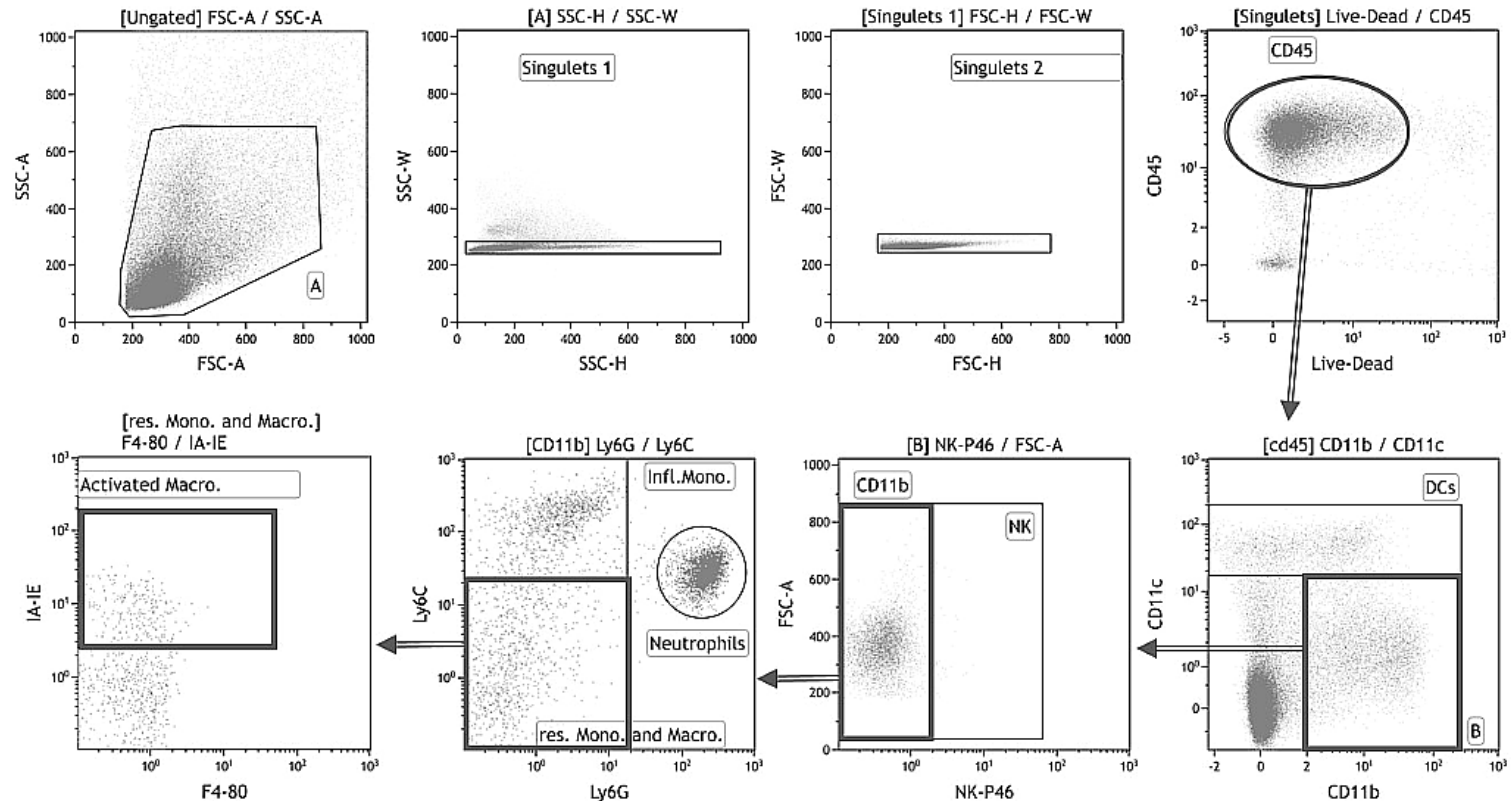


Supplemental figure VII: CB3 reduces TNF-α expression in aortic sinus of ApoE2.Ki mice fed HFD.

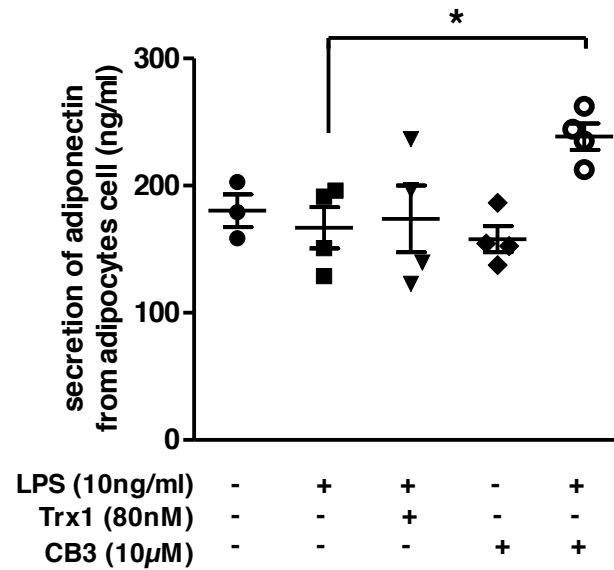
ApoE2.Ki mice were fed HFD and simultaneously treated with CB3 (10 µg/g bw) or with water (Control) during 10 weeks. **(A)** Cryostat serial sections of proximal aortas were immunostained with antibodies either against F4/80 (macrophage marker) and TNF-α. **(B)** Quantification of TNF-α⁺ macrophages in sinus aortic tissue are shown. Results are means ± SEM of 6 mice and Mann Whitney's test was used to determine statistically significant differences as compared to control group. ** $p < 0.01$.



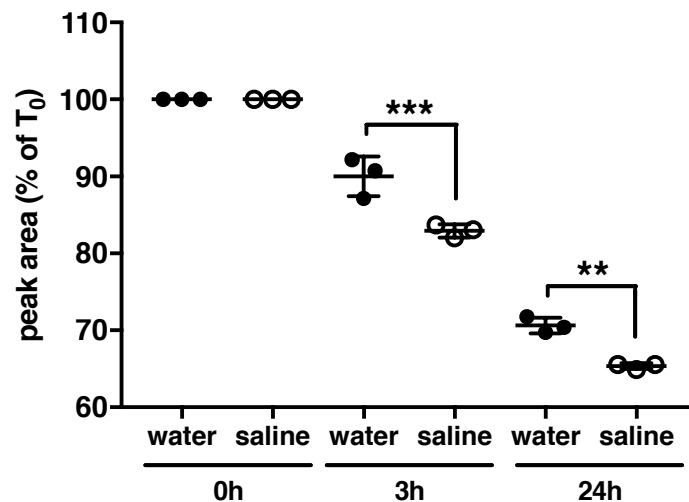
Supplemental figure VIII: CB3 does not affect the basal levels of ROS and inflammatory cytokines in macrophages. (A) After incubation for 1h in presence of RPMI medium, murine macrophages were treated or not with various concentrations of CB3 for 1h. ROS levels were assessed by ROS-sensitive DCF-DA probe. (B, C) Murine macrophages were treated with 10 ng/ml of LPS for 4h and then treated or not 10 μM CB3 during 24h. Supernatants were collected and the MCP-1 and TNF-α levels was evaluated by ELISA. The results are represented as means ± SEM of 4 independent experiments. Mann whitney's test or one-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to determine statistically significant differences as compared to control macrophages. ns (no statistical significance).



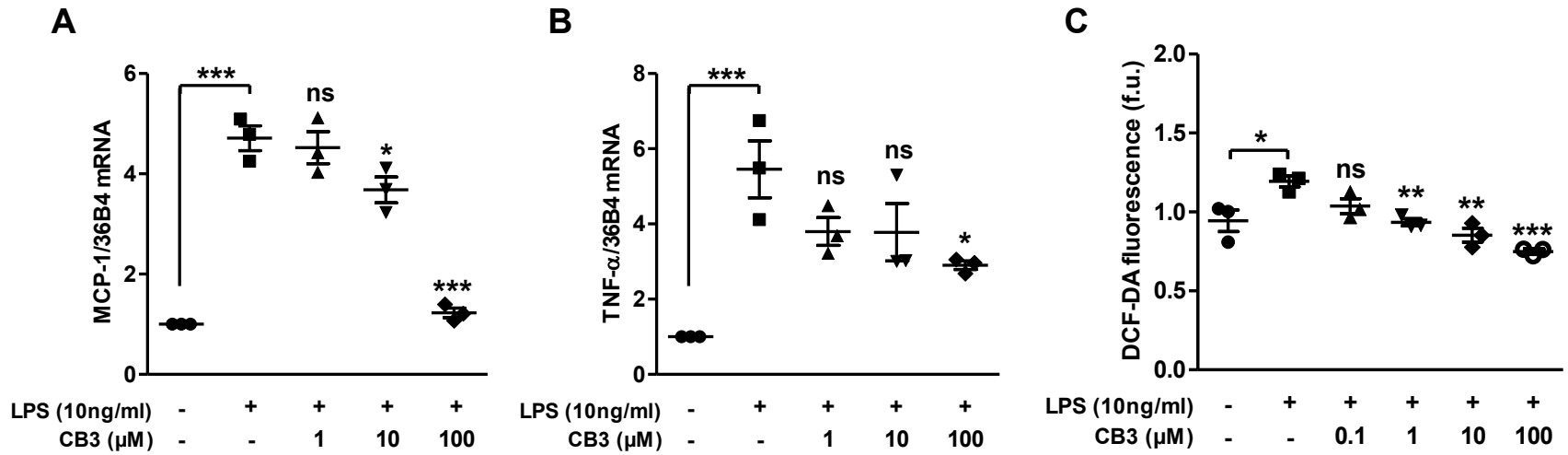
Supplemental figure IX: Gating strategy for multiparametric flow cytometry analysis of activated macrophages in cell suspensions from spleens. After doublets and dead cells exclusion, eight CD45⁺ gated subpopulations were identified as following: CD11c^{high} (Dendritic-Cells); Amongst CD11b⁺ (“B” gate) NKp46⁺ (NK cells); Within CD11b⁺/CD11c^{low/-} cells, Ly6G^{high}/Ly6C⁺ (neutrophils), Ly6G^{low/-}/Ly6C^{low/-} (resident Monocytes and/or macrophages) and Ly6G^{low/-}/Ly6C^{high} (inflammatory Monocytes) were identified. Lastly, Activated Macrophages were defined as MHC-II positive-cells amongst “*resident Monocytes and/or macrophages*” gate.



Supplemental figure X: CB3 induces adiponectin secretion in 3F3-F442A adipocytes. Adipocytes 3T3-F442A cell were treated with 10ng/ml of LPS for 24h and then treated or not with 10μM of CB3 or with 80nM of Trx1 during 24 h. Cell culture mediums were collected and the concentrations of adiponectin were evaluated by ELISA. Results are represented as means ± SEM of 3 to 4 independent experiments. Mann Whitney's test was used to determine statistically significant differences as compared to LPS-treated adipocytes. * $p < 0.05$.



Supplemental Figure XI: Stability of CB3 diluted in water or in saline buffer: CB3 (50 µg/ml) diluted in either water or saline buffer and incubated in mouse plasma for 0, 3 or 24 h. After Met-OH precipitation and centrifugation, supernatants were analyzed by HPLC-MS/MS. CB3 was quantified with the ratio of area peak (% of T₀). Results are represented as means ± SEM of 3 independent experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post-test was used to determine statistically significant differences. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (water vs. saline).



Supplemental figure A: CB3 reduces proinflammatory cytokines expression and ROS production in human THP-1-derived macrophages.

Human macrophages were treated with 10 ng/ml of LPS for 4h and then treated or not with various concentrations of CB3 during 24h. Cellular extracts were collected and the (A) MCP-1, (B) TNF-α mRNA levels were evaluated by RT-qPCR. (C) ROS levels were assessed by ROS-sensitive DCF-DA probe. Results are the means ± SEM of 3 independent experiments. One-way ANOVA followed by Turkey's post-test was used to determine statistically significant differences as compared to LPS-treated macrophages. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ and ns (no statistical significance).

Discussion

Aujourd'hui, il est bien établi que la principale caractéristique pathologique sous-jacente de toutes les maladies cardiovasculaires est l'athérosclérose. Malgré une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques avec la mise en place de nombreuses stratégies thérapeutiques et chirurgicales chez l'homme, la mortalité causée par les maladies cardiovasculaires prédomine toujours dans le monde. L'athérosclérose est caractérisée par un stress oxydant et un état inflammatoire élevé au sein de la plaque d'athérome. De nombreuses cellules, en particulier les macrophages, participent à ce processus athérogène du fait de leur plasticité phénotypique dépendante du microenvironnement complexe de la plaque d'athérome. Ces cellules sont impliquées dans toutes les étapes de l'athérogenèse.

Notre équipe a découvert une stratégie thérapeutique potentielle basée sur l'utilisation de la Trx-1 pour traiter les maladies cardiovasculaires. En effet, nos nombreux travaux ont montré ses effets antioxydants, anti-inflammatoires et antiathérogènes en réorientant les macrophages vers un phénotype M2 anti-inflammatoire et réparateur (Billiet et al., 2005; El Hadri et al., 2012; Mahmood, 2014). Cependant, le clivage de la Trx-1 conduit à une forme tronquée, la Trx-80. Dépourvue de propriétés antioxydantes, il a été démontré, toujours par notre équipe, qu'elle exerce des effets pro-athérogènes et hautement pro-inflammatoires en réorientant les macrophages vers un phénotype M1 et en activant l'inflammasome NLRP3 (Mahmood et al., 2013; Couchie et al., 2017). L'ensemble de ces résultats montre que le processus de clivage compromet l'utilisation de la Trx-1 comme approche thérapeutique. C'est pourquoi, le principal objectif de ma thèse a été de proposer et de valider une thérapie alternative à l'utilisation de la Trx-1, en synthétisant un peptide mimétique afin de contourner ce processus de clivage. Ce peptide mimétique, nommé CB3, est basé sur le site actif C³²XXC³⁵ de la Trx-1.

Dans un premier temps, j'ai étudié les effets du peptide CB3 sur des macrophages murins obtenus à partir de souris C57Bl/6Jrj et activés par le LPS. Les résultats de cette étude *in vitro* ont montré que le peptide CB3 :

- réduit, significativement et de manière dose-dépendante, le niveau des ROS intracellulaires et celui de l'H₂O₂ extracellulaire générés dans les macrophages murins (Article Figure 1).
- diminue, de manière significative, l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires puissantes telles que MCP-1, IL-1 β , IL-6 et TNF- α (Article Figure 2).
- diminue la phosphorylation de I- κ B (Article Figure 3A).
- diminue la translocation nucléaire de p65 (Article Figures 3B et C).

Dans un deuxième temps, j'ai étudié les effets du CB3 sur un modèle de souris ApoE2.Ki soumis à un régime alimentaire athérogène de type HFD développant ainsi l'athérosclérose. Les résultats de cette étude *in vivo* ont montré que le peptide CB3 :

- réduit les taux d'anticorps plasmatiques dirigés contre les LDL oxydées chez les souris ApoE2.Ki (Article Figure 4A).
- augmente significativement les taux plasmatiques de cytokines anti-inflammatoires telles que l'adiponectine et l'IL-10 et réduit significativement les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-33 et le TNF- α (Article Figures 4B et C).
- réduit également le nombre de macrophages activés (phénotype M1) dans la rate (Article Figure 5).
- réduit la proportion de macrophages M1 et augmente la proportion de macrophages M2 au sein de la plaque d'athérome (Article Figures 6C, D, E et F).
- réduit significativement la surface de la lésion aortique des souris ApoE2.Ki (Article Figures 6A et B).

L'ensemble de nos résultats indique que le peptide CB3 exerce plusieurs effets protecteurs et peut ainsi représenter une nouvelle approche thérapeutique pour traiter les maladies cardiovasculaires.

Mes travaux ont montré, dans un premier temps, une absence de toxicité du peptide CB3 dans les macrophages murins en culture primaire. Dans un deuxième temps, nous avons mis en évidence, dans des conditions pro-oxydantes, une réduction dose-dépendante du niveau des ROS intracellulaires et du H₂O₂ extracellulaire produit par les macrophages murins activés par le LPS en présence du peptide CB3. Le CB3 exerce un effet antioxydant plus efficace que la Trx-1 recombinante. A ce jour, une seule équipe a utilisé le CB3 et a démontré qu'il protège les cellules β -pancréatiques (INS 832/13) du stress oxydatif induit par l'auranofin, un inhibiteur sélectif de la TrxR (Cohen-Kutner et al., 2013). Ce modèle a été utilisé car les cellules β -pancréatiques sont beaucoup plus sensibles aux dommages cytotoxiques en raison de leur faible teneur en enzymes antioxydantes (glutathion peroxydase, superoxyde dismutase, catalase) (Lenzen et al., 1996). De plus, le CB3 présente une efficacité supérieure à celle des agents antioxydants conventionnels tels que le NAC, la GSH, le DTT ou la vitamine C et même la hTrx-1 recombinante (Kim et al., 2011), et ce en accord avec nos propres résultats. L'effet antioxydant du peptide CB3 sur les macrophages activés peut s'expliquer par un effet "mimétique" de la Trx-1 *via* la régénération directe et/ou indirecte des systèmes antioxydants endogènes. En effet, les équipes de Cohen-Kutner *et al.* et de Kim *et al.* montrent respectivement une augmentation de la Trx-1 à l'état réduit en présence de CB3 dans les cellules INS 832/13 (Cohen-Kutner et al., 2013) et du glutathion réduit dans les tissus pulmonaires (Kim et al., 2011). Cependant, au vu du rôle physiologique des ROS comme molécules de signalisation régulant des fonctions cellulaires essentielles, l'utilisation du CB3 pourrait potentiellement perturber cette homéostasie redox. Or, nous avons démontré que le peptide CB3, même à forte dose, n'affecte pas le niveau des ROS dans les macrophages non activés par le LPS (Article Figure VIII supplémentaire). Les mécanismes qui expliqueraient l'efficacité du CB3 en tant que puissant antioxydant dans les macrophages activés ou non (conditions basales) restent encore à démontrer.

Dans des conditions inflammatoires, les macrophages exposés au CB3 présentent une diminution de l'expression et de la sécrétion de facteurs inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6 et MCP-1) avec une inhibition de la voie NF- κ B. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par El Hadri *et al.* et confirment que la Trx-1 recombinante diminue les marqueurs inflammatoires (TNF- α et MCP-1) et augmente les marqueurs anti-inflammatoires (IL-10) dans le même modèle cellulaire (El Hadri et al., 2012). De même, Billiet *et al.* ont observé que la hTrx-1 exerce une fonction anti-inflammatoire suite à l'inhibition de la voie NF- κ B impliquée

dans la transcription du gène inflammatoire IL-1 β dans des macrophages primaires dérivés de monocytes issus de donneur humain (HMDM : Human monocyte-derived macrophages). Ces cellules sont impliquées dans plusieurs maladies inflammatoires, notamment l'athérosclérose. Ainsi, le peptide CB3 "mime" bien les propriétés anti-inflammatoires de la Trx-1. De plus, Kim *et al.* ont observé une inhibition de la translocation nucléaire du facteur NF- κ B en présence du CB3 dans le tissu pulmonaire d'un modèle d'inflammation des voies respiratoires (Kim et al., 2011).

Des résultats analogues ont également été obtenus dans deux modèles de macrophages humains, es cultures primaires de HMDM (Article Figure III supplémentaire) et la lignée THP-1 (Article Figure A supplémentaire). Ainsi, le peptide CB3 exerce des effets antioxydants et anti-inflammatoires *in vitro*.

La validation fonctionnelle du CB3 *in vivo* a été réalisée sur un modèle murin développant de l'athérosclérose, des souris ApoE2.Ki soumises à un régime HFD. Nous avons d'abord étudié la stabilité du peptide à 37°C, dans le plasma de ces souris. Après 48h d'incubation, le peptide CB3 présente une dégradation de seulement ~30%, montrant sa bonne stabilité (Article Figure I supplémentaire). L'injection intrapéritonéale quotidienne de CB3 ne présente aucune toxicité hépatique (faibles activités de l'ALAT et de l'ASAT), même à forte dose (20 μ g/g). Nous avons également démontré que le peptide mimétique de la Trx-1 diminue significativement le taux circulant des anticorps anti-LDLox, ce qui suggère une baisse globale de l'état oxydatif chez ces souris.

Nous avons ensuite étudié l'effet anti-inflammatoire du CB3 chez les souris ApoE2.Ki. Nous avons démontré une diminution des cytokines pro-inflammatoires circulantes (IL-33, TNF- α) et une augmentation des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, adiponectine), ce qui reflète une baisse de l'inflammation suite à l'administration du peptide. Kim *et al.* ont également montré que l'administration du CB3 augmente les niveaux d'IL-10 dans les tissus pulmonaires de souris développant une inflammation des voies respiratoires (Kim et al., 2011). De plus, sur des coupes transversales de sinus aortique, nous avons montré une diminution de l'expression du TNF- α , un marqueur inflammatoire, au sein de la plaque d'athérome. Sur ces mêmes coupes, nous avons étudié le phénotype des macrophages au

niveau des plaques d'athérome. Nos résultats montrent que le CB3 oriente les macrophages d'un phénotype M1 pro-inflammatoire vers un phénotype M2 anti-inflammatoire et diminue globalement le nombre de macrophages lésionnels (macrophages positifs pour le F4/80). Le peptide mimétique de la Trx-1 diminue probablement l'infiltration des macrophages et/ou inhibe leur prolifération au sein de la plaque d'athérome. Cependant, d'autres études sont nécessaires pour apporter des arguments supplémentaires. En revanche, ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par El Hadri *et al.* au sein de notre équipe : la colocalisation de la Trx-1 avec le CD206 (marqueur anti-inflammatoire) dans les lésions athérosclérotiques des souris ApoE2.Ki implique une polarisation des macrophages vers un phénotype M2 (El Hadri et al., 2012). Le CB3 "mime" donc bien la Trx-1, en orientant les macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire M2. Nos résultats ont été complétés par une analyse en cytométrie de flux sur la rate de souris ApoE2.Ki afin d'évaluer l'impact global de l'administration du CB3 sur le système immunitaire. Le CB3 n'exerce aucun effet mesurable sur les cellules appartenant au système immunitaire (données non présentées); seule l'abondance des macrophages activés (phénotype M1) est significativement réduite de 32 % par rapport aux macrophages totaux (CD45⁺). L'ensemble de nos résultats montre très clairement l'effet anti-inflammatoire du peptide CB3 *in vivo*.

Nos travaux révèlent que la surface des lésions dans les aortes proximales de souris ApoE2.Ki soumises à un régime alimentaire type HFD diminue très significativement suite au traitement par le peptide CB3. Cette action antiathérogène est semblable à celle de la Trx-1 puisqu'une réduction de la surface de la lésion a également été observée dans ce modèle de souris traitées par la Trx-1 (El Hadri et al., 2012). Il est bien établi que les CML ou les macrophages, dotés de récepteurs scavengers à leur surface, se gorgent de LDLox jusqu'à devenir des cellules spumeuses et participer à la formation du corps lipidique de la plaque d'athérome. Or, nous avons montré que le CB3 diminue le niveau des LDLox circulants ainsi que le nombre de macrophages lésionnels chez des souris susceptibles à l'athérosclérose. Cela expliquerait que le CB3 diminue, du moins en partie, le nombre des cellules spumeuses et le volume du corps lipidique au sein de la plaque d'athérome. Une autre explication peut être avancée. Nous avons en effet montré que le CB3 induit une augmentation de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 circulante, produite par les cellules T auxiliaires de type Th2, les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages M2 anti-inflammatoires. Or, il a été

rapporté que la cytokine IL-10, sécrétée localement dans la lésion d'athérosclérose, empêche l'accumulation des lipides et module négativement la réaction inflammatoire locale (Mallat et al., 1999). L'IL-10 inhibe également plusieurs voies cellulaires pouvant jouer un rôle important dans le développement et la progression de l'athérosclérose, notamment l'activation de NF- κ B (Lentsch et al., 1997; Schottelius et al., 1999; Wang et al., 1995), la production de métalloprotéase, de molécules d'adhésion (Henke et al., 2000; Lacraz et al., 1995) et la mort cellulaire par apoptose (Arai et al., 1995). Cela lui confère des propriétés protectrices anti-athérosclérotiques. Ainsi, la baisse de l'inflammation, induite par le CB3 chez des souris ApoE2.Ki, pourrait s'expliquer, du moins en partie, par l'augmentation des niveaux circulants de l'IL-10 qui joue un rôle protecteur contre le processus athérosclérotique.

Enfin, de façon inattendue, le CB3 induit une augmentation du niveau circulant de l'adiponectine chez des souris ApoE2.Ki. Cette réponse serait due à une adipokine impliquée dans la régulation des métabolismes lipidique et glucidique et ayant des effets anti-inflammatoires et vasculo-protecteurs bien documentés. Il a également été rapporté que son expression est fortement inhibée par des facteurs inflammatoires, en particulier le TNF- α et par les ROS (Ghadge et al., 2018; Li and Zeng, 2018). Nous avons montré, sur une lignée adipocytaire 3T3-F442A cultivée dans des conditions inflammatoires, que le CB3 induit la sécrétion de l'adiponectine (Article Figure X supplémentaire). Ce peptide CB3 est donc capable, en plus de ses effets vasculaires, d'exercer des effets sur le tissu adipeux en augmentant l'expression d'un facteur anti-inflammatoire et antiathérogène, l'adiponectine. Cet effet du CB3 peut également être indirectement la conséquence d'une diminution de l'inflammation dans le tissu adipeux, *via* la réorientation des macrophages résidents d'un phénotype M1 vers un phénotype M2. L'effet athéroprotecteur du CB3 serait alors partiellement médié partiellement par l'adiponectine (Figure 15).

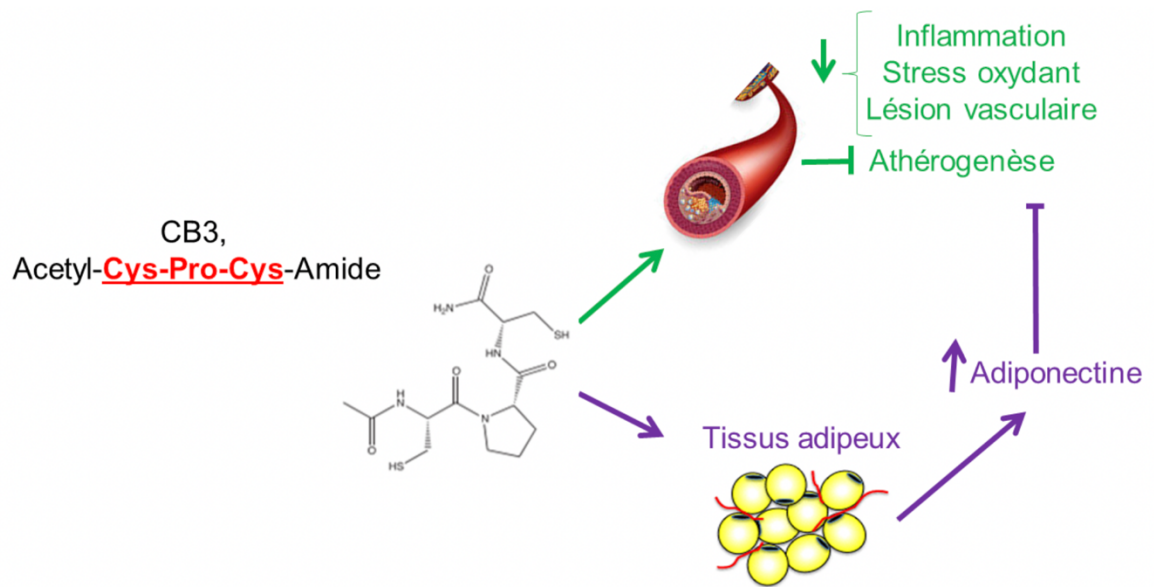


Figure 15. Effets anti-inflammatoires et antiathérogènes du CB3. Mécanismes d'action directe et indirecte via l'adiponectine.

Conclusion

Historiquement, une première série de médicaments anti-inflammatoires (anticorps anti-TNF- α), anticoagulants (rivaroxaban, dabigatran), hypocholestérolémiantes (statines) et antioxydants (vitamine E, β -carotène) a été générée. Ces médicaments sont actuellement utilisés dans le traitement des maladies cardiovasculaires (Cheng et al., 2014; Costopoulos et al., 2013; Lawrence et al., 2002; Rienstra et al., 2013; Stein and Raal, 2015). Bien que beaucoup de ces médicaments aient montré une certaine efficacité, un grand nombre d'entre eux exerce toutefois des effets controversés voire indésirables et ne conviennent donc pas pour un traitement à long terme (Recio et al., 2017). Par conséquent, de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires pour traiter les maladies cardiovasculaires. Ainsi, les approches basées sur l'utilisation de peptides et les peptidomimétiques ont suscité un vif intérêt dans la communauté scientifique et médicale pour le traitement et la prévention des maladies cardiovasculaires (Recio et al., 2017). Parmi cette classe, les peptides mimétiques de l'apolipoprotéine A-I (ApoA-I) ont été une des principales stratégies utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires. En effet, l'hypercholestérolémie, un des facteurs de risque majeurs, joue un rôle clé dans la progression de l'athérosclérose. L'ApoA-I est une des protéines constitutives des particules de HDL chargées de transporter le cholestérol vers le foie en vue de son élimination. L'ApoA-I est essentielle pour maintenir l'homéostasie du cholestérol cellulaire et exerce de multiples fonctions (Fisher et al., 2012; Mangaraj et al., 2016). Sa déficience génétique chez des souris déjà invalidées pour le récepteur LDL (RLDL^{-/-}) favorise de manière significative la progression de l'athérosclérose (Moore et al., 2003). Il a été démontré que des peptides mimétiques de l'ApoA-I tels que le 18A, 4F, 6F, 5A exercent des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antiathérogènes chez des souris ApoE^{-/-} et sur des cellules endothéliales aortiques humaines (HCAEC) ou bovines (BAEC) (Amar et al., 2010; Li et al., 2004; Navab et al., 2002, 2005; Rosenbaum et al., 2015; Tabet et al., 2010). Bon nombre de ces peptides mimétiques de l'ApoA-I se trouvent à un stade de développement préclinique (Smith, 2010; Uehara et al., 2015; White et al., 2014). Cependant, aucune efficacité dans les essais humains n'a été démontrée (peptides 4F) (Bloedon et al., 2008; Li et al., 2004; Van Lenten et al., 2008; Watson et al., 2011). Par ailleurs, la stabilité de certains peptides administrés par voie orale même à fortes doses est faible. L'administration par voie intraveineuse ou sous cutanée reste la plus couramment utilisée pour de faibles doses. Bien que l'utilisation de peptidomimétiques dans le traitement des maladies cardiovasculaires

gagne du terrain ; des études complémentaires sont encore nécessaires afin d'améliorer notamment la stabilité des peptides (Fosgerau and Hoffmann, 2015; Recio et al., 2017).

Dans ce contexte, l'étude très récente du peptide mimétique de la thiorédoxine-1, présentant une forte stabilité, fournit d'ores et déjà des résultats très prometteurs. L'ensemble des données obtenues au cours de ma thèse montre l'effet antioxydant, anti-inflammatoire et athéroprotecteur de ce peptide. Il reproduit également les fonctions du site catalytique de la Trx-1 et ce, de façon plus puissante que la protéine native, la Trx-1. Le CB3 suscite donc un grand intérêt pour limiter l'inflammation et le stress oxydant, deux processus impliqués dans la physiopathologie de l'athérosclérose.

Pour conclure, mon travail de thèse donne lieu, pour la première fois, à des résultats qui ouvrent des perspectives de recherche dont le peptide mimétique de la Trx-1 pourrait être une nouvelle approche thérapeutique. Ce peptide, en ciblant les macrophages, pourrait limiter non seulement le développement de l'athérosclérose mais également, l'initiation et le développement des désordres métaboliques qui lui sont associés.

Perspectives

Afin d'utiliser le CB3 comme traitement potentiel pour les maladies cardiovasculaires, il serait essentiel de mieux appréhender son mécanisme d'action.

Ainsi, d'une part, il serait très intéressant d'évaluer l'état oxydatif et inflammatoire (évaluer les macrophages M1/M2 et cytokines inflammatoires) de tissus métaboliques comme le foie, le muscle ou les tissus adipeux de souris ApoE2.Ki sous HFD et traitées par le CB3.

D'autre part, nos résultats mettent en évidence l'impact du peptide mimétique de la Trx-1 sur la réorientation phénotypique des macrophages tissulaires vers un profil anti-inflammatoire et réparateur. Or, comme nous l'avons vu, chaque changement phénotypique s'accompagnerait d'un profond remodelage métabolique au niveau des macrophages. Il serait donc intéressant de décrire le mécanisme d'action du CB3 sur la réorientation métabolique des macrophages. Dans ce but, l'utilisation de la technique du "*Seahorse*" (analyseur Seahorse XF^e24) nous permettra de mesurer, de façon non invasive et en temps réel, l'activité des deux principales voies métaboliques : la glycolyse et la phosphorylation oxydative des mitochondries dans des conditions inflammatoires et en présence du peptide CB3. L'identification, au sein des voies métaboliques explorées, de cibles potentielles du CB3 nous permettra ensuite de caractériser la régulation de leur expression par RT-qPCR et Western Blot. Ainsi, la reprogrammation métabolique des macrophages pourrait devenir une autre approche thérapeutique prometteuse pour traiter les maladies cardiovasculaires et particulièrement l'athérosclérose.

Bibliographie

- ◆ Abate, C., Patel, L., Rauscher, F.J., and Curran, T. (1990). Redox regulation of fos and jun DNA-binding activity in vitro. *Science* 249, 1157–1161.
- ◆ Abderrazak, A., Syrovets, T., Couchie, D., El Hadri, K., Friguet, B., Simmet, T., and Rouis, M. (2015). NLRP3 inflammasome: from a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol.* 4, 296–307.
- ◆ Adamson, S., and Leitinger, N. (2011). Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids. *Curr. Opin. Lipidol.* 22, 335–342.
- ◆ Aguado-Llera, D., Martínez-Gómez, A.I., Prieto, J., Marenchino, M., Traverso, J.A., Gómez, J., Chueca, A., and Neira, J.L. (2011). The Conformational Stability and Biophysical Properties of the Eukaryotic Thioredoxins of *Pisum Sativum* Are Not Family-Conserved. *PLOS ONE* 6, e17068.
- ◆ Allahverdian, S., Chaabane, C., Boukais, K., Francis, G.A., and Bochaton-Piallat, M.-L. (2018). Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 114, 540–550.
- ◆ Amar, M.J.A., D'Souza, W., Turner, S., Demosky, S., Sviridov, D., Stonik, J., Luchoomun, J., Voogt, J., Hellerstein, M., Sviridov, D., et al. (2010). 5A apolipoprotein mimetic peptide promotes cholesterol efflux and reduces atherosclerosis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 334, 634–641.
- ◆ Anitschkow, N., and Chalator, S. (1983). Classics in arteriosclerosis research: On experimental cholesterol steatosis and its significance in the origin of some pathological processes by N. Anitschkow and S. Chalator, translated by Mary Z. Pelias, 1913. *Arterioscler. Dallas Tex* 3, 178–182.
- ◆ Arai, T., Hiromatsu, K., Nishimura, H., Kimura, Y., Kobayashi, N., Ishida, H., Nimura, Y., and Yoshikai, Y. (1995). Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during *Salmonella* infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213, 600–607.
- ◆ Arigony, A.L.V., de Oliveira, I.M., Machado, M., Bordin, D.L., Bergter, L., Prá, D., and Pêgas Henriques, J.A. (2013). The Influence of Micronutrients in Cell Culture: A Reflection on Viability and Genomic Stability. *BioMed Res. Int.* 2013.
- ◆ Berndt, C., Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2008). Thioredoxins and glutaredoxins as facilitators of protein folding. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1783, 641–650.
- ◆ Billiet, L., Furman, C., Larigauderie, G., Copin, C., Brand, K., Fruchart, J.-C., and Rouis, M. (2005). Extracellular Human Thioredoxin-1 Inhibits Lipopolysaccharide-induced Interleukin-1 β Expression in Human Monocyte-derived Macrophages. *J. Biol. Chem.* 280, 40310–40318.
- ◆ Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2012). Orchestration of Metabolism by Macrophages. *Cell Metab.* 15, 432–437.
- ◆ Blankenberg, S., Rupprecht, H.J., Bickel, C., Torzewski, M., Hafner, G., Tiret, L., Smieja, M., Cambien, F., Meyer, J., Lackner, K.J., et al. (2003). Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 349, 1605–1613.
- ◆ Bloedon, L.T., Dunbar, R., Duffy, D., Pinell-Salles, P., Norris, R., DeGroot, B.J., Movva, R., Navab, M., Fogelman, A.M., and Rader, D.J. (2008). Safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of oral apoA-I mimetic peptide D-4F in high-risk cardiovascular patients. *J. Lipid Res.* 49, 1344–1352.
- ◆ Bloomfield, K.L., Osborne, S.A., Kennedy, D.D., Clarke, F.M., and Tonissen, K.F. (2003). Thioredoxin-mediated redox control of the transcription factor Sp1 and regulation of

the thioredoxin gene promoter. *Gene* 319, 107–116.

- ◆ Blough, N.V., and Zafiriou, O.C. (1985). Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxonitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg. Chem.* 24, 3502–3504.
- ◆ Bouhrel, M.A., Derudas, B., Rigamonti, E., Dièvert, R., Brozek, J., Haulon, S., Zawadzki, C., Jude, B., Torpier, G., Marx, N., et al. (2007). PPAR γ Activation Primes Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Anti-inflammatory Properties. *Cell Metab.* 6, 137–143.
- ◆ Brandes, R.P., and Kreuzer, J. (2005). Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc. Res.* 65, 16–27.
- ◆ Bretón-Romero, R., González de Orduña, C., Romero, N., Sánchez-Gómez, F.J., de Álvaro, C., Porras, A., Rodríguez-Pascual, F., Laranjinha, J., Radi, R., and Lamas, S. (2012). Critical role of hydrogen peroxide signaling in the sequential activation of p38 MAPK and eNOS in laminar shear stress. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1093–1100.
- ◆ Cannon, W.B. (1926). Physiological regulation of normal states: some tentative postulates concerning biological homeostatics. Auguste Pettit Ed Paris Éditions Médicales Charles Richet Ses Amis Ses Collègues Ses Élèves *Jubilee Volume for Charles Richet*, 91–93.
- ◆ Cannon, W.B. (1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.* 9, 399–431.
- ◆ Chakraborti, P.K., Garabedian, M.J., Yamamoto, K.R., and Simons, S.S. (1992). Role of cysteines 640, 656, and 661 in steroid binding to rat glucocorticoid receptors. *J. Biol. Chem.* 267, 11366–11373.
- ◆ Chatzizisis, Y.S., Coskun, A.U., Jonas, M., Edelman, E.R., Feldman, C.L., and Stone, P.H. (2007). Role of Endothelial Shear Stress in the Natural History of Coronary Atherosclerosis and Vascular Remodeling: Molecular, Cellular, and Vascular Behavior. *J. Am. Coll. Cardiol.* 49, 2379–2393.
- ◆ Chen, Q., Wang, Q., Zhu, J., Xiao, Q., and Zhang, L. (2018). Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. *Br. J. Pharmacol.* 175, 1279–1292.
- ◆ Chen, X., Tang, W., Liu, S., Yu, L., and Chen, Z. (2010). Thioredoxin-1 phosphorylated at T100 is needed for its anti-apoptotic activity in HepG2 cancer cells. *Life Sci.* 87, 254–260.
- ◆ Cheng, J., Zhang, W., Zhang, X., Han, F., Li, X., He, X., Li, Q., and Chen, J. (2014). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor blockers on all-cause mortality, cardiovascular deaths, and cardiovascular events in patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *JAMA Intern. Med.* 174, 773–785.
- ◆ Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M., and Moncada, S. (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: Crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7631–7636.
- ◆ Clinton, S.K., Underwood, R., Hayes, L., Sherman, M.L., Kufe, D.W., and Libby, P. (1992). Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* 140, 301–316.
- ◆ Cohen-Kutner, M., Khomsky, L., Trus, M., Aisner, Y., Niv, M.Y., Benhar, M., and Atlas, D. (2013). Thioredoxin-mimetic peptides (TXM) reverse auranofin induced apoptosis and restore insulin secretion in insulinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 85, 977–990.
- ◆ Colavitti, R., Pani, G., Bedogni, B., Anzevino, R., Borrello, S., Waltenberger, J., and Galeotti, T. (2002). Reactive Oxygen Species as Downstream Mediators of Angiogenic

Signaling by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2/KDR. *J. Biol. Chem.* 277, 3101–3108.

- ◆ Colin, S., Chinetti-Gbaguidi, G., and Staels, B. (2014). Macrophage phenotypes in atherosclerosis. *Immunol. Rev.* 262, 153–166.
- ◆ Collet, J.-F., and Messens, J. (2010). Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1205–1216.
- ◆ Commoner, B., Townsend, J., and Pake, G.E. (1954). Free radicals in biological materials. *Nature* 174, 689–691.
- ◆ Cordes, T., Wallace, M., Michelucci, A., Divakaruni, A.S., Sapcaru, S.C., Sousa, C., Koseki, H., Cabrales, P., Murphy, A.N., Hiller, K., et al. (2016). Immuno-responsive Gene 1 and Itaconate Inhibit Succinate Dehydrogenase to Modulate Intracellular Succinate Levels. *J. Biol. Chem.* 291, 14274–14284.
- ◆ Costopoulos, C., Niespialowska-Steuden, M., Kukreja, N., and Gorog, D.A. (2013). Novel oral anticoagulants in acute coronary syndrome. *Int. J. Cardiol.* 167, 2449–2455.
- ◆ Couchie, D., Vaisman, B., Abderrazak, A., Mahmood, D.F.D., Hamza, M.M., Canesi, F., Diderot, V., El Hadri, K., Nègre-Salvayre, A., Le Page, A., et al. (2017). Human Plasma Thioredoxin-80 Increases With Age and in ApoE^{-/-} Mice Induces Inflammation, Angiogenesis, and Atherosclerosis. *Circulation* 136, 464–475.
- ◆ Dalton, D.K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I.S., Bradley, A., and Stewart, T.A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259, 1739–1742.
- ◆ Davies, K.J.A. (2016). Adaptive homeostasis. *Mol. Aspects Med.* 49, 1–7.
- ◆ De Paoli, F., Staels, B., and Chinetti-Gbaguidi, G. (2014). Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 78, 1775–1781.
- ◆ Dikalov, S.I., Dikalova, A.E., Bikineyeva, A.T., Schmidt, H.H.H.W., Harrison, D.G., and Griendling, K.K. (2008). Distinct Roles of Nox1 and Nox4 in Basal and Angiotensin II-Stimulated Superoxide and Hydrogen Peroxide Production. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 1340–1351.
- ◆ Dimmeler, S., Rippmann, V., Weiland, U., Haendeler, J., and Zeiher, A.M. (1997). Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ. Res.* 81, 970–976.
- ◆ Drummond, G.R., Selemidis, S., Griendling, K.K., and Sobey, C.G. (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 453–471.
- ◆ El Hadri, K., Mahmood, D.F.D., Couchie, D., Jguirim-Souissi, I., Genze, F., Diderot, V., Syrovets, T., Lunov, O., Simmet, T., and Rouis, M. (2012). Thioredoxin-1 promotes anti-inflammatory macrophages of the M2 phenotype and antagonizes atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1445–1452.
- ◆ Ellulu, M.S., Patimah, I., Khaza'ai, H., Rahmat, A., Abed, Y., and Ali, F. (2016). Atherosclerotic cardiovascular disease: a review of initiators and protective factors. *Inflammopharmacology* 24, 1–10.
- ◆ Evangelista, A.M., Thompson, M.D., Bolotina, V.M., Tong, X., and Cohen, R.A. (2012). Nox4- and Nox2-dependent oxidant production is required for VEGF-induced SERCA cysteine-674 S-glutathiolation and endothelial cell migration. *Free Radic. Biol. Med.* 53.
- ◆ Ferrante, C.J., Pinhal-Enfield, G., Elson, G., Cronstein, B.N., Hasko, G., Outram, S., and Leibovich, S.J. (2013). The adenosine-dependent angiogenic switch of macrophages to

an M2-like phenotype is independent of interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) signaling. *Inflammation* 36, 921–931.

- ◆ Fisher, E.A., Feig, J.E., Hewing, B., Hazen, S.L., and Smith, J.D. (2012). High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 2813–2820.
- ◆ Flohé, L., Brigelius-Flohé, R., Saliou, C., Traber, M.G., and Packer, L. (1997). Redox Regulation of NF-kappa B Activation. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 1115–1126.
- ◆ Förstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837.
- ◆ Fosgerau, K., and Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov. Today* 20, 122–128.
- ◆ Freed, J.K., and Gutterman, D.D. (2013). Mitochondrial reactive oxygen species and vascular function: less is more. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 673–675.
- ◆ Freerman, A.J., Johnson, A.R., Sacks, G.N., Milner, J.J., Kirk, E.L., Troester, M.A., Macintyre, A.N., Goraksha-Hicks, P., Rathmell, J.C., and Makowski, L. (2014). Metabolic Reprogramming of Macrophages. *J. Biol. Chem.* 289, 7884–7896.
- ◆ Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1583–1606.
- ◆ Galván-Peña, S., and O’Neill, L.A.J. (2014). Metabolic Reprogramming in Macrophage Polarization. *Front. Immunol.* 5.
- ◆ Garrido-Urbani, S., Meguenani, M., Montecucco, F., and Imhof, B.A. (2014). Immunological aspects of atherosclerosis. *Semin. Immunopathol.* 36, 73–91.
- ◆ Geeraerts, X., Bolli, E., Fendt, S.-M., and Van Ginderachter, J.A. (2017). Macrophage Metabolism As Therapeutic Target for Cancer, Atherosclerosis, and Obesity. *Front. Immunol.* 8.
- ◆ Ghadge, A.A., Khaire, A.A., and Kuvalekar, A.A. (2018). Adiponectin: A potential therapeutic target for metabolic syndrome. *Cytokine Growth Factor Rev.* 39, 151–158.
- ◆ Gil-Bea, F., Akterin, S., Persson, T., Mateos, L., Sandebring, A., Avila-Cariño, J., Gutierrez-Rodriguez, A., Sundström, E., Holmgren, A., Winblad, B., et al. (2012). Thioredoxin-80 is a product of alpha-secretase cleavage that inhibits amyloid-beta aggregation and is decreased in Alzheimer’s disease brain. *EMBO Mol. Med.* 4, 1097–1111.
- ◆ Gilroy, D.W., Lawrence, T., Perretti, M., and Rossi, A.G. (2004). Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 401–416.
- ◆ Gimbrone, M.A., Topper, J.N., Nagel, T., Anderson, K.R., and Garcia-Cardena, G. (2000). Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 902, 230–239; discussion 239–240.
- ◆ Glass, C.K., and Witztum, J.L. (2001). Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell* 104, 503–516.
- ◆ Go, Y.-M., and Jones, D.P. (2010). Redox Control Systems in the Nucleus: Mechanisms and Functions. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 489–509.
- ◆ Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23–35.
- ◆ Gordon, S. (2007). The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37 Suppl 1, S9–17.
- ◆ Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative Activation of Macrophages:

Mechanism and Functions. *Immunity* 32, 593–604.

- ◆ Grippo, J.F., Holmgren, A., and Pratt, W.B. (1985). Proof that the endogenous, heat-stable glucocorticoid receptor-activating factor is thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 260, 93–97.
- ◆ Grootaert, M.O.J., Moulis, M., Roth, L., Martinet, W., Vindis, C., Bennett, M.R., and De Meyer, G.R.Y. (2018). Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis. *Cardiovasc. Res.* 114, 622–634.
- ◆ Gryglewski, R.J., Palmer, R.M., and Moncada, S. (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320, 454–456.
- ◆ Guichard, C., Pedruzzi, E., Fay, M., Mkaddem, S.B., Coant, N., Daniel, F., and Ogier-Denis, E. (2006). Les Nox/Duox: une nouvelle famille de NADPH oxydases. *médecine/sciences* 22, 953–960.
- ◆ Guo, Z., Ran, Q., Roberts, L.J., Zhou, L., Richardson, A., Sharan, C., Wu, D., and Yang, H. (2008). Suppression of atherosclerosis by overexpression of glutathione peroxidase-4 in apolipoprotein E-deficient mice. *Free Radic. Biol. Med.* 44, 343–352.
- ◆ Gupta, S., Sodhi, S., and Mahajan, V. (2009). Correlation of antioxidants with lipid peroxidation and lipid profile in patients suffering from coronary artery disease. *Expert Opin. Ther. Targets* 13, 889–894.
- ◆ Guzik, T.J., Sadowski, J., Guzik, B., Jopek, A., Kapelak, B., Przybylowski, P., Wierzbicki, K., Korbut, R., Harrison, D.G., and Channon, K.M. (2006). Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 333–339.
- ◆ Haendeler, J., Hoffmann, J., Tischler, V., Berk, B.C., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2002). Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat. Cell Biol.* 4, 743–749.
- ◆ Haendeler, J., Hoffmann, J., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2004). Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells: a novel vasculoprotective function of statins. *Circulation* 110, 856–861.
- ◆ Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.-O., Charlier, C., and Chapelle, J.-P. (2007). Le stress oxydant. *Rev. Médicale Liège* 62.
- ◆ Halliwell, B., and Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1–85.
- ◆ Ham, M., Lee, J.-W., Choi, A.H., Jang, H., Choi, G., Park, J., Kozuka, C., Sears, D.D., Masuzaki, H., and Kim, J.B. (2013). Macrophage Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Stimulates Proinflammatory Responses with Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2425–2435.
- ◆ Hansson, G.K., and Libby, P. (2006). The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 508–519.
- ◆ Harrison, R. (2004). Physiological Roles of Xanthine Oxidoreductase. *Drug Metab. Rev.* 36, 363–375.
- ◆ Harrison, D., Griendling, K.K., Landmesser, U., Hornig, B., and Drexler, H. (2003). Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 91, 7–11.
- ◆ Harrison, D.G., Chen, W., Dikalov, S., and Li, L. (2010). Regulation of endothelial cell tetrahydrobiopterin pathophysiological and therapeutic implications. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 60, 107–132.
- ◆ Haschemi, A., Kosma, P., Gille, L., Evans, C.R., Burant, C.F., Starkl, P., Knapp, B., Haas,

- R., Schmid, J.A., Jandl, C., et al. (2012). The Sedoheptulose Kinase CARKL Directs Macrophage Polarization through Control of Glucose Metabolism. *Cell Metab.* *15*, 813–826.
- ◆ Hayashi, M., Sakata, M., Takeda, T., Yamamoto, T., Okamoto, Y., Sawada, K., Kimura, A., Minekawa, R., Tahara, M., Tasaka, K., et al. (2004). Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 α under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J. Endocrinol.* *183*, 145–154.
 - ◆ Heitzer, T., Schlinzig, T., Krohn, K., Meinertz, T., and Münzel, T. (2001). Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* *104*, 2673–2678.
 - ◆ Heller, R., Unbehauen, A., Schellenberg, B., Mayer, B., Werner-Felmayer, G., and Werner, E.R. (2001). L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* *276*, 40–47.
 - ◆ Henke, P.K., DeBrunye, L.A., Strieter, R.M., Bromberg, J.S., Prince, M., Kadell, A.M., Sarkar, M., Londy, F., and Wakefield, T.W. (2000). Viral IL-10 Gene Transfer Decreases Inflammation and Cell Adhesion Molecule Expression in a Rat Model of Venous Thrombosis. *J. Immunol.* *164*, 2131–2141.
 - ◆ Hilgers, R.H.P., Kundumani-Sridharan, V., Subramani, J., Chen, L.C., Cuello, L.G., Rusch, N.J., and Das, K.C. (2017). Thioredoxin reverses age-related hypertension by chronically improving vascular redox and restoring eNOS function. *Sci. Transl. Med.* *9*.
 - ◆ Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3633–3638.
 - ◆ Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K., and Yodoi, J. (1999). Distinct Roles of Thioredoxin in the Cytoplasm and in the Nucleus A TWO-STEP MECHANISM OF REDOX REGULATION OF TRANSCRIPTION FACTOR NF- κ B. *J. Biol. Chem.* *274*, 27891–27897.
 - ◆ Holmgren, A. (1968). Thioredoxin. 6. The amino acid sequence of the protein from escherichia coli B. *Eur. J. Biochem.* *6*, 475–484.
 - ◆ Holmgren, A. (1985). Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* *54*, 237–271.
 - ◆ Holmgren, A., and Lu, J. (2010). Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *396*, 120–124.
 - ◆ Huang, S.C.-C., Everts, B., Ivanova, Y., O’Sullivan, D., Nascimento, M., Smith, A.M., Beatty, W., Love-Gregory, L., Lam, W.Y., O’Neill, C.M., et al. (2014). Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for macrophage alternative activation. *Nat. Immunol.* *15*, 846–855.
 - ◆ Hulsmans, M., and Holvoet, P. (2010). The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 70–78.
 - ◆ Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., and Gotoh, Y. (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* *275*, 90–94.
 - ◆ Ikeda, S., Ushio-Fukai, M., Zuo, L., Tojo, T., Dikalov, S., Patrushev, N.A., and Alexander, R.W. (2005). Novel role of ARF6 in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ. Res.* *96*, 467–475.
 - ◆ Jetten, N., Verbruggen, S., Gijbels, M.J., Post, M.J., De Winther, M.P.J., and Donners, M.P.J.

- M.M.P.C. (2014). Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo. *Angiogenesis* 17, 109–118.
- ◆ Jha, A.K., Huang, S.C.-C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K.M., Ashall, J., Everts, B., et al. (2015). Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. *Immunity* 42, 419–430.
 - ◆ Junn, E., Han, S.H., Im, J.Y., Yang, Y., Cho, E.W., Um, H.D., Kim, D.K., Lee, K.W., Han, P.L., Rhee, S.G., et al. (2000). Vitamin D3 Up-Regulated Protein 1 Mediates Oxidative Stress Via Suppressing the Thioredoxin Function. *J. Immunol.* 164, 6287–6295.
 - ◆ Kadl, A., Meher, A.K., Sharma, P.R., Lee, M.Y., Doran, A.C., Johnstone, S.R., Elliott, M.R., Gruber, F., Han, J., Chen, W., et al. (2010). Identification of a novel macrophage phenotype that develops in response to atherogenic phospholipids via Nrf2. *Circ. Res.* 107, 737–746.
 - ◆ Kaghad, M., Dessarps, F., Jacquemin-Sablon, H., Caput, D., Fradelizi, D., and Wollman, E.E. (1994). Genomic cloning of human thioredoxin-encoding gene: mapping of the transcription start point and analysis of the promoter. *Gene* 140, 273–278.
 - ◆ Kaplan, N., Urao, N., Furuta, E., Kim, S.-J., Razvi, M., Nakamura, Y., McKinney, R.D., Poole, L.B., Fukai, T., and Ushio-Fukai, M. (2011). Localized Cysteine Sulfenic Acid Formation by Vascular Endothelial Growth Factor: Role in Endothelial Cell Migration and Angiogenesis. *Free Radic. Res.* 45, 1124–1135.
 - ◆ Kim, Y.-W., and Byzova, T.V. (2014). Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood* 123, 625–631.
 - ◆ Kim, S.R., Lee, K.S., Park, S.J., Min, K.H., Lee, M.H., Lee, K.A., Bartov, O., Atlas, D., and Lee, Y.C. (2011). A novel dithiol amide CB3 attenuates allergic airway disease through negative regulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183, 1015–1024.
 - ◆ Kishimoto, C., Shioji, K., Nakamura, H., Nakayama, Y., Yodoi, J., and Sasayama, S. (2001). Serum thioredoxin (TRX) levels in patients with heart failure. *Jpn. Circ. J.* 65, 491–494.
 - ◆ Koelwyn, G.J., Corr, E.M., Erbay, E., and Moore, K.J. (2018). Regulation of macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Nat. Immunol.* 19, 526–537.
 - ◆ Konstantinov, I.E., Mejevoi, N., and Anichkov, N.M. (2006). Nikolai N. Anichkov and His Theory of Atherosclerosis. *Tex. Heart Inst. J.* 33, 417–423.
 - ◆ Krishnaswamy, G., Chi, D.S., and Kelley, J. (1999). Vulnerable plaque. *Ann. Intern. Med.* 131, 392–393; author reply 393–394.
 - ◆ Lacraz, S., Nicod, L.P., Chicheportiche, R., Welgus, H.G., and Dayer, J.M. (1995). IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *J. Clin. Invest.* 96, 2304–2310.
 - ◆ Lampropoulou, V., Sergushichev, A., Bambouskova, M., Nair, S., Vincent, E.E., Loginicheva, E., Cervantes-Barragan, L., Ma, X., Huang, S.C.-C., Griss, T., et al. (2016). Itaconate Links Inhibition of Succinate Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell Metab.* 24, 158–166.
 - ◆ Landmesser, U., and Drexler, H. (2007). Endothelial function and hypertension. *Curr. Opin. Cardiol.* 22, 316–320.
 - ◆ Laurent, T.C., Moore, E.C., and Reichard, P. (1964). ENZYMATIC SYNTHESIS OF DEOXYRIBONUCLEOTIDES. IV. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THIOREDOXIN, THE HYDROGEN DONOR FROM ESCHERICHIA COLI B. *J. Biol. Chem.* 239, 3436–3444.

- ◆ Laursen, J.B., Somers, M., Kurz, S., McCann, L., Warnholtz, A., Freeman, B.A., Tarpey, M., Fukai, T., and Harrison, D.G. (2001). Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. *Circulation* 103, 1282–1288.
- ◆ Lawrence, T., Willoughby, D.A., and Gilroy, D.W. (2002). Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 787–795.
- ◆ Lee, H.-C., and Wei, Y.-H. (2007). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 232, 592–606.
- ◆ Lee, C.G., Homer, R.J., Zhu, Z., Lanone, S., Wang, X., Koteliansky, V., Shipley, J.M., Gotwals, P., Noble, P., Chen, Q., et al. (2001). Interleukin-13 Induces Tissue Fibrosis by Selectively Stimulating and Activating Transforming Growth Factor β 1. *J. Exp. Med.* 194, 809–822.
- ◆ Lee, S., Kim, S.M., and Lee, R.T. (2013). Thioredoxin and Thioredoxin Target Proteins: From Molecular Mechanisms to Functional Significance. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1165–1207.
- ◆ Lee, S.-R., Yang, K.-S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., and Rhee, S.G. (2002). Reversible Inactivation of the Tumor Suppressor PTEN by H₂O₂. *J. Biol. Chem.* 277, 20336–20342.
- ◆ Lentsch, A.B., Shanley, T.P., Sarma, V., and Ward, P.A. (1997). In vivo suppression of NF-kappa B and preservation of I kappa B alpha by interleukin-10 and interleukin-13. *J. Clin. Invest.* 100, 2443–2448.
- ◆ Lenzen, S., Drinkgern, J., and Tiedge, M. (1996). Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med.* 20, 463–466.
- ◆ Lewis, P., Stefanovic, N., Pete, J., Calkin, A.C., Giunti, S., Thallas-Bonke, V., Jandeleit-Dahm, K.A., Allen, T.J., Kola, I., Cooper, M.E., et al. (2007). Lack of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase-1 accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 115, 2178–2187.
- ◆ Li, H., and Sun, B. (2007). Toll-like receptor 4 in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* 11, 88–95.
- ◆ Li, T. di, and Zeng, Z.H. (2018). Adiponectin as a potential therapeutic target for the treatment of restenosis. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 101, 798–804.
- ◆ Li, H., Wang, Y., Feng, D., Liu, Y., Xu, M., Gao, A., Tian, F., Zhang, L., Cui, Y., Wang, Z., et al. (2014). Alterations in the time course of expression of the Nox family in the brain in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model: effects of melatonin. *J. Pineal Res.* 57, 110–119.
- ◆ Li, X., Chyu, K.-Y., Faria Neto, J.R., Yano, J., Nathwani, N., Ferreira, C., Dimayuga, P.C., Cercek, B., Kaul, S., and Shah, P.K. (2004). Differential effects of apolipoprotein A-I-mimetic peptide on evolving and established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 110, 1701–1705.
- ◆ Libby, P. (2002). Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868–874.
- ◆ Libby, P., Ridker, P.M., and Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135–1143.
- ◆ Libby, P., Ridker, P.M., and Hansson, G.K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 473, 317–325.
- ◆ Lillig, C.H., and Holmgren, A. (2006). Thioredoxin and Related Molecules—From Biology

to Health and Disease. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 25–47.

- ◆ Liu, Y., and Min, W. (2002). Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ. Res.* 90, 1259–1266.
- ◆ Liu, J.Q., Zelko, I.N., and Folz, R.J. (2004). Reoxygenation-induced constriction in murine coronary arteries: the role of endothelial NADPH oxidase (gp91phox) and intracellular superoxide. *J. Biol. Chem.* 279, 24493–24497.
- ◆ Loffredo, L., Martino, F., Carnevale, R., Pignatelli, P., Catasca, E., Perri, L., Calabrese, C.M., Palumbo, M.M., Baratta, F., Ben, M.D., et al. (2012). Obesity and Hypercholesterolemia are Associated with NOX2 Generated Oxidative Stress and Arterial Dysfunction. *J. Pediatr.* 161, 1004–1009.
- ◆ Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Szmitko, P.E., Singh, K.K., Shukla, P.C., Gupta, M., Chan, L., Al-Omran, M., Teoh, H., et al. (2010). Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 299, H656–H663.
- ◆ Lowes, D.A., and Galley, H.F. (2011). Mitochondrial protection by the thioredoxin-2 and glutathione systems in an in vitro endothelial model of sepsis. *Biochem. J.* 436, 123–132.
- ◆ Lu, J., and Holmgren, A. (2012). Thioredoxin System in Cell Death Progression. *Antioxid. Redox Signal.* 17, 1738–1747.
- ◆ Lusis, A.J. (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407, 233–241.
- ◆ Mackaness, G.B. (1962). Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116, 381–406.
- ◆ Madamanchi, N.R., and Runge, M.S. (2007). Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ. Res.* 100, 460–473.
- ◆ Madamanchi, N.R., Hakim, Z.S., and Runge, M.S. (2005a). Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J. Thromb. Haemost.* 3, 254–267.
- ◆ Madamanchi, N.R., Moon, S.-K., Hakim, Z.S., Clark, S., Mehrizi, A., Patterson, C., and Runge, M.S. (2005b). Differential activation of mitogenic signaling pathways in aortic smooth muscle cells deficient in superoxide dismutase isoforms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 950–956.
- ◆ Mahmood, D.F.D. (2014). Thioredoxin-1 (Trx1) : a new target in the treatment of cardiovascular diseases. phdthesis. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.
- ◆ Mahmood, D.F.D., Abderrazak, A., Couchie, D., Lunov, O., Diderot, V., Syrovets, T., Slimane, M.-N., Gosselet, F., Simmet, T., Rouis, M., et al. (2013). Truncated thioredoxin (Trx-80) promotes pro-inflammatory macrophages of the M1 phenotype and enhances atherosclerosis. *J. Cell. Physiol.* 228, 1577–1583.
- ◆ Makino, Y., Yoshikawa, N., Okamoto, K., Hirota, K., Yodoi, J., Makino, I., and Tanaka, H. (1999). Direct Association with Thioredoxin Allows Redox Regulation of Glucocorticoid Receptor Function. *J. Biol. Chem.* 274, 3182–3188.
- ◆ Malandrino, M.I., Fucho, R., Weber, M., Calderon-Dominguez, M., Mir, J.F., Valcarcel, L., Escoté, X., Gómez-Serrano, M., Peral, B., Salvadó, L., et al. (2015). Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 308, E756-769.
- ◆ Mallat, Z., Besnard, S., Duriez, M., Deleuze, V., Emmanuel, F., Bureau, M.F., Soubrier, F., Esposito, B., Duez, H., Fievet, C., et al. (1999). Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ. Res.* 85, e17-24.

- ◆ Mangaraj, M., Nanda, R., and Panda, S. (2016). Apolipoprotein A-I: A Molecule of Diverse Function. *Indian J. Clin. Biochem. IJCB* 31, 253–259.
- ◆ Mann, J.M., and Davies, M.J. (1996). Vulnerable plaque. Relation of characteristics to degree of stenosis in human coronary arteries. *Circulation* 94, 928–931.
- ◆ Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- ◆ Mantovani, A., Garlanda, C., and Locati, M. (2009). Macrophage diversity and polarization in atherosclerosis: a question of balance. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 1419–1423.
- ◆ Maraldi, T., Prata, C., Caliceti, C., Vieceli Dalla Sega, F., Zambonin, L., Fiorentini, D., and Hakim, G. (2010). VEGF-induced ROS generation from NAD(P)H oxidases protects human leukemic cells from apoptosis. *Int. J. Oncol.* 36, 1581–1589.
- ◆ Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 453–461.
- ◆ Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., and Taketo, M.M. (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev. Biol.* 178, 179–185.
- ◆ McNally, J.S., Davis, M.E., Giddens, D.P., Saha, A., Hwang, J., Dikalov, S., Jo, H., and Harrison, D.G. (2003). Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 285, H2290–H2297.
- ◆ Meuillet, E.J., Mahadevan, D., Berggren, M., Coon, A., and Powis, G. (2004). Thioredoxin-1 binds to the C2 domain of PTEN inhibiting PTEN's lipid phosphatase activity and membrane binding: a mechanism for the functional loss of PTEN's tumor suppressor activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 429, 123–133.
- ◆ Migdal, C., and Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences* 27, 405–412.
- ◆ Miller, null, Hoenig, null, and Ujhelyi, null (1998). Mechanisms of Impaired Endothelial Function Associated With Insulin Resistance. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 3, 125–134.
- ◆ Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A.S.H., Varma, M., Bryant, C.E., Turlomousis, P., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., et al. (2016). Repurposing mitochondria from ATP production to ROS generation drives a pro-inflammatory phenotype in macrophages that depends on succinate oxidation by complex II. *Cell* 167, 457-470.e13.
- ◆ Miranda-Vizueté, A., Ljung, J., Damdimopoulos, A.E., Gustafsson, J.A., Oko, R., Pelto-Huikko, M., and Spyrou, G. (2001). Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J. Biol. Chem.* 276, 31567–31574.
- ◆ Miranda-Vizueté, A., Sadek, C.M., Jiménez, A., Krause, W.J., Sutovsky, P., and Oko, R. (2004). The mammalian testis-specific thioredoxin system. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 25–40.
- ◆ Moore, R.E., Kawashiri, M., Kitajima, K., Secreto, A., Millar, J.S., Pratico, D., and Rader, D.J. (2003). Apolipoprotein A-I deficiency results in markedly increased atherosclerosis in mice lacking the LDL receptor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1914–1920.
- ◆ Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73,

209–212.

- ◆ Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 958–969.
- ◆ Münzel, T., Camici, G.G., Maack, C., Bonetti, N.R., Fuster, V., and Kovacic, J.C. (2017). Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, 212–229.
- ◆ Nakamura, H., Matsuda, M., Furuke, K., Kitaoka, Y., Iwata, S., Toda, K., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Ozawa, K., and Yodoi, J. (1994). Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunol. Lett.* 42, 75–80.
- ◆ Napoli, C., D’Armiento, F.P., Mancini, F.P., Postiglione, A., Witztum, J.L., Palumbo, G., and Palinski, W. (1997). Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J. Clin. Invest.* 100, 2680–2690.
- ◆ Navab, M., Anantharamaiah, G.M., Hama, S., Garber, D.W., Chaddha, M., Hough, G., Lallone, R., and Fogelman, A.M. (2002). Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation* 105, 290–292.
- ◆ Navab, M., Anantharamaiah, G.M., Reddy, S.T., Hama, S., Hough, G., Grijalva, V.R., Yu, N., Ansell, B.J., Datta, G., Garber, D.W., et al. (2005). Apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1325–1331.
- ◆ Newby, A.C. (2008). Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 2108–2114.
- ◆ Nishinaka, Y., Masutani, H., Oka, S.-I., Matsuo, Y., Yamaguchi, Y., Nishio, K., Ishii, Y., and Yodoi, J. (2004). Importin alpha1 (Rch1) mediates nuclear translocation of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3)-up-regulated protein 1. *J. Biol. Chem.* 279, 37559–37565.
- ◆ Nonn, L., Williams, R.R., Erickson, R.P., and Powis, G. (2003). The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol. Cell. Biol.* 23, 916–922.
- ◆ Odegaard, J.I., and Chawla, A. (2008). Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab.* 4, 619–626.
- ◆ Ohashi, K., Parker, J.L., Ouchi, N., Higuchi, A., Vita, J.A., Gokce, N., Pedersen, A.A., Kalthoff, C., Tullin, S., Sams, A., et al. (2010). Adiponectin Promotes Macrophage Polarization toward an Anti-inflammatory Phenotype. *J. Biol. Chem.* 285, 6153–6160.
- ◆ O’Neill, L.A.J., and Pearce, E.J. (2016). Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function. *J. Exp. Med.* 213, 15–23.
- ◆ O’Neill, L.A.J., Kishton, R.J., and Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 553–565.
- ◆ Papaharalambus, C.A., and Griendling, K.K. (2007). Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury. *Trends Cardiovasc. Med.* 17, 48–54.
- ◆ Pekkari, K., and Holmgren, A. (2004). Truncated Thioredoxin: Physiological Functions and Mechanism. *Antioxid. Redox Signal.* 6, 53–61.
- ◆ Pekkari, K., Gurunath, R., Arnér, E.S.J., and Holmgren, A. (2000). Truncated Thioredoxin

Is a Mitogenic Cytokine for Resting Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Is Present in Human Plasma. *J. Biol. Chem.* 275, 37474–37480.

- ◆ Peluso, I., Morabito, G., Urban, L., Ioannone, F., and Serafini, M. (2012). Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 12, 351–360.
- ◆ Penney, R.B., and Roy, D. (2013). Thioredoxin-mediated redox regulation of resistance to endocrine therapy in breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1836, 60–79.
- ◆ Phaniendra, A., Jestadi, D.B., and Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.* 30, 11–26.
- ◆ Pinhal-Enfield, G., Ramanathan, M., Hasko, G., Vogel, S.N., Salzman, A.L., Boons, G.-J., and Leibovich, S.J. (2003). An Angiogenic Switch in Macrophages Involving Synergy between Toll-Like Receptors 2, 4, 7, and 9 and Adenosine A2A Receptors. *Am. J. Pathol.* 163, 711–721.
- ◆ Plüddemann, A., Neyen, C., and Gordon, S. (2007). Macrophage scavenger receptors and host-derived ligands. *Methods* 43, 207–217.
- ◆ Raines, E.W., and Ross, R. (1993). Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br. Heart J.* 69, S30–S37.
- ◆ Ramos, M.A., Kuzuya, M., Esaki, T., Miura, S., Satake, S., Asai, T., Kanda, S., Hayashi, T., and Iguchi, A. (1998). Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18, 1188–1196.
- ◆ Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., and Munder, M. (2014). Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front. Immunol.* 5.
- ◆ Recio, C., Maione, F., Iqbal, A.J., Mascolo, N., and De Feo, V. (2017). The Potential Therapeutic Application of Peptides and Peptidomimetics in Cardiovascular Disease. *Front. Pharmacol.* 7.
- ◆ Rhee, S.G., and Woo, H.A. (2011). Multiple functions of peroxiredoxins: peroxidases, sensors and regulators of the intracellular messenger H₂O₂, and protein chaperones. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 781–794.
- ◆ Rienstra, M., Damman, K., Mulder, B.A., Van Gelder, I.C., McMurray, J.J.V., and Van Veldhuisen, D.J. (2013). Beta-blockers and outcome in heart failure and atrial fibrillation: a meta-analysis. *JACC Heart Fail.* 1, 21–28.
- ◆ Roma-Lavisse, C., Tagzirt, M., Zawadzki, C., Lorenzi, R., Vincentelli, A., Haulon, S., Juthier, F., Rauch, A., Corseaux, D., Staels, B., et al. (2015). M1 and M2 macrophage proteolytic and angiogenic profile analysis in atherosclerotic patients reveals a distinctive profile in type 2 diabetes. *Diab. Vasc. Dis. Res.* 12, 279–289.
- ◆ Rosenbaum, M.A., Chaudhuri, P., Abelson, B., Cross, B.N., and Graham, L.M. (2015). Apolipoprotein A-I mimetic peptide reverses impaired arterial healing after injury by reducing oxidative stress. *Atherosclerosis* 241, 709–715.
- ◆ Ross, R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362, 801–809.
- ◆ Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115–126.
- ◆ Ross, R., and Glomset, J.A. (1976). The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 295, 369–377.

- ◆ Ruffer, M.A. (1911). On arterial lesions found in Egyptian mummies (1580 B.C.—525 A.D.). *J. Pathol. Bacteriol.* *15*, 453–462.
- ◆ Rybnikova, E., Damdimopoulos, A.E., Gustafsson, J.-Å., Spyrou, G., and Pelto-Huikko, M. (2000). Expression of novel antioxidant thioredoxin-2 in the rat brain. *Eur. J. Neurosci.* *12*, 1669–1678.
- ◆ Sahaf, B., Söderberg, A., Spyrou, G., Barral, A.M., Pekkari, K., Holmgren, A., and Rosén, A. (1997). Thioredoxin Expression and Localization in Human Cell Lines: Detection of Full-Length and Truncated Species. *Exp. Cell Res.* *236*, 181–192.
- ◆ Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* *17*, 2596–2606.
- ◆ Santilli, F., D’Ardes, D., and Davì, G. (2015). Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention. *Vascul. Pharmacol.* *74*, 23–37.
- ◆ Schenk, H., Klein, M., Erdbrügger, W., Dröge, W., and Schulze-Osthoff, K. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 1672–1676.
- ◆ Schmidt, T.S., and Alp, N.J. (2007). Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease. *Clin. Sci.* *113*, 47–63.
- ◆ Schottelius, A.J., Mayo, M.W., Sartor, R.B., and Baldwin, A.S. (1999). Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J. Biol. Chem.* *274*, 31868–31874.
- ◆ Sena, C.M., Pereira, A.M., and Seïça, R. (2013). Endothelial dysfunction — A major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1832*, 2216–2231.
- ◆ Shioji, K., Nakamura, H., Masutani, H., and Yodoi, J. (2003). Redox regulation by thioredoxin in cardiovascular diseases. *Antioxid. Redox Signal.* *5*, 795–802.
- ◆ Sies, H., and Cadenas, E. (1985). Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Phil Trans R Soc Lond B* *311*, 617–631.
- ◆ Sies, H., Berndt, C., and Jones, D.P. (2017). Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* *86*, 715–748.
- ◆ Silva, J.P., and Coutinho, O.P. (2010). Free radicals in the regulation of damage and cell death - basic mechanisms and prevention. *Drug Discov. Ther.* *4*, 144–167.
- ◆ Simons, S.S., and Pratt, W.B. (1995). Glucocorticoid receptor thiols and steroid-binding activity. *Methods Enzymol.* *251*, 406–422.
- ◆ Smith, J.D. (2010). Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis. *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* *2000* *11*, 989–996.
- ◆ 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.
- ◆ Spyrou, G., Enmark, E., Miranda-Vizuete, A., and Gustafsson, J.-Å. (1997). Cloning and Expression of a Novel Mammalian Thioredoxin. *J. Biol. Chem.* *272*, 2936–2941.
- ◆ Stary, H.C., Chandler, A.B., Glagov, S., Guyton, J.R., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schaffer, S.A., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., and Wissler, R.W. (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* *89*, 2462–2478.

- ◆ Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., 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.
- ◆ Stein, E.A., and Raal, F.J. (2015). Lipid-Lowering Drug Therapy for CVD Prevention: Looking into the Future. *Curr. Cardiol. Rep.* 17, 104.
- ◆ Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* 176, 287–292.
- ◆ Steinberg, D. (1997). Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95, 1062–1071.
- ◆ Steinberg, D. (2002). Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nat. Med.* 8, 1211–1217.
- ◆ Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C., and Witztum, J.L. (1989). Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 320, 915–924.
- ◆ Steinl, D.C., and Kaufmann, B.A. (2015). Ultrasound imaging for risk assessment in atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 9749–9769.
- ◆ Stiko-Rahm, A., Hultgårdh-Nilsson, A., Regnström, J., Hamsten, A., and Nilsson, J. (1992). Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* 12, 1099–1109.
- ◆ Stocker, R., and Keaney, J.F. (2004). Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol. Rev.* 84, 1381–1478.
- ◆ Stöger, J.L., Gijbels, M.J.J., van der Velden, S., Manca, M., van der Loos, C.M., Biessen, E.A.L., Daemen, M.J.A.P., Lutgens, E., and de Winther, M.P.J. (2012). Distribution of macrophage polarization markers in human atherosclerosis. *Atherosclerosis* 225, 461–468.
- ◆ Sullivan, P.M., Mezdour, H., Aratani, Y., Knouff, C., Najib, J., Reddick, R.L., Quarfordt, S.H., and Maeda, N. (1997). Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 272, 17972–17980.
- ◆ Sullivan, P.M., Mezdour, H., Quarfordt, S.H., and Maeda, N. (1998). Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2. *J. Clin. Invest.* 102, 130–135.
- ◆ Sumimoto, H. (2008). Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* 275, 3249–3277.
- ◆ Sumpio, B.E., Timothy Riley, J., and Dardik, A. (2002). Cells in focus: endothelial cell. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 1508–1512.
- ◆ Szabó, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 662–680.
- ◆ Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 36–46.
- ◆ Tabet, F., Remaley, A.T., Segaliny, A.I., Millet, J., Yan, L., Nakhla, S., Barter, P.J., Rye, K.-A., and Lambert, G. (2010). The 5A apolipoprotein A-I mimetic peptide displays antiinflammatory and antioxidant properties in vivo and in vitro. *Arterioscler. Thromb.*

Vasc. Biol. 30, 246–252.

- ◆ Takagi, Y., Gon, Y., Todaka, T., Nozaki, K., Nishiyama, A., Sono, H., Hashimoto, N., Kikuchi, H., and Yodoi, J. (1998). Expression of thioredoxin is enhanced in atherosclerotic plaques and during neointima formation in rat arteries. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 78, 957–966.
- ◆ Tannahill, G., Curtis, A., Adamik, J., Palsson-McDermott, E., McGettrick, A., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N., Kelly, B., Foley, N., et al. (2013). Succinate is a danger signal that induces IL-1 β via HIF-1 α . *Nature* 496, 238–242.
- ◆ Tao, L., Gao, E., Bryan, N.S., Qu, Y., Liu, H.-R., Hu, A., Christopher, T.A., Lopez, B.L., Yodoi, J., Koch, W.J., et al. (2004). Cardioprotective effects of thioredoxin in myocardial ischemia and reperfusion: role of S-nitrosation [corrected]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 11471–11476.
- ◆ Tjernberg, L.O., Näslund, J., Lindqvist, F., Johansson, J., Karlström, A.R., Thyberg, J., Terenius, L., and Nordstedt, C. (1996). Arrest of β -Amyloid Fibril Formation by a Pentapeptide Ligand. *J. Biol. Chem.* 271, 8545–8548.
- ◆ Tonissen, K.F., and Wells, J.R. (1991). Isolation and characterization of human thioredoxin-encoding genes. *Gene* 102, 221–228.
- ◆ Torzewski, M., Ochsenhirt, V., Kleschyov, A.L., Oelze, M., Daiber, A., Li, H., Rossmann, H., Tsimikas, S., Reifenberg, K., Cheng, F., et al. (2007). Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27, 850–857.
- ◆ Touyz, R.M., and Briones, A.M. (2011). Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension. *Hypertens. Res.* 34, 5–14.
- ◆ Tribble, D.L. (1999). AHA Science Advisory. Antioxidant consumption and risk of coronary heart disease: emphasis on vitamin C, vitamin E, and beta-carotene: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 99, 591–595.
- ◆ Tsimikas, S., and Miller, Y.I. (2011). Oxidative modification of lipoproteins: mechanisms, role in inflammation and potential clinical applications in cardiovascular disease. *Curr. Pharm. Des.* 17, 27–37.
- ◆ Turoczy, T., Chang, V.W.-H., Engelman, R.M., Maulik, N., Ho, Y.S., and Das, D.K. (2003). Thioredoxin redox signaling in the ischemic heart: an insight with transgenic mice overexpressing Trx1. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35, 695–704.
- ◆ Uehara, Y., Chiesa, G., and Saku, K. (2015). High-Density Lipoprotein-Targeted Therapy and Apolipoprotein A-I Mimetic Peptides. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* 79, 2523–2528.
- ◆ Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- ◆ Vallance, P., and Chan, N. (2001). Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 85, 342–350.
- ◆ Valledor, A.F., Borràs, F.E., Cullèll-Young, M., and Celada, A. (1998). Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *J. Leukoc. Biol.* 63, 405–417.
- ◆ Van den Bossche, J., Baardman, J., Otto, N.A., van der Velden, S., Neele, A.E., van den Berg, S.M., Luque-Martin, R., Chen, H.-J., Boshuizen, M.C.S., Ahmed, M., et al. (2016). Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep.* 17, 684–696.

- ◆ Van Lenten, B.J., Wagner, A.C., Jung, C.-L., Ruchala, P., Waring, A.J., Lehrer, R.I., Watson, A.D., Hama, S., Navab, M., Anantharamaiah, G.M., et al. (2008). Anti-inflammatory apoA-I-mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I. *J. Lipid Res.* *49*, 2302–2311.
- ◆ Vara, D., and Pula, G. (2014). Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. *Curr. Mol. Med.* *14*, 1103–1125.
- ◆ Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J.I., Zhang, L., Smith, K.L., Morel, C.R., Greaves, D.R., Murray, P.J., and Chawla, A. (2006). Oxidative metabolism and PGC-1 β attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell Metab.* *4*, 13–24.
- ◆ Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., and Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4560–4565.
- ◆ Vincent, B., and Checler, F. (2012). α -Secretase in Alzheimer's disease and beyond: mechanistic, regulation and function in the shedding of membrane proteins. *Curr. Alzheimer Res.* *9*, 140–156.
- ◆ Wahlgren, C.-M., and Pekkari, K. (2005). Elevated thioredoxin after angioplasty in peripheral arterial disease. *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. Off. J. Eur. Soc. Vasc. Surg.* *29*, 281–286.
- ◆ Wang, P., Wu, P., Siegel, M.I., Egan, R.W., and Billah, M.M. (1995). Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* *270*, 9558–9563.
- ◆ Watson, C.E., Weissbach, N., Kjems, L., Ayalasomayajula, S., Zhang, Y., Chang, I., Navab, M., Hama, S., Hough, G., Reddy, S.T., et al. (2011). Treatment of patients with cardiovascular disease with L-4F, an apo-A1 mimetic, did not improve select biomarkers of HDL function. *J. Lipid Res.* *52*, 361–373.
- ◆ White, C.R., Garber, D.W., and Anantharamaiah, G.M. (2014). Anti-inflammatory and cholesterol-reducing properties of apolipoprotein mimetics: a review. *J. Lipid Res.* *55*, 2007–2021.
- ◆ WHO Study Group (1958). Classification des lésions d' athérosclérose : rapport d' un groupe d' étude [réuni à Washington du 7 au 11 octobre 1957] (Genève: Genève : Organisation mondiale de la Santé).
- ◆ Wolfs, I.M.J., Donners, M.M.P.C., and de Winther, M.P.J. (2011). Differentiation factors and cytokines in the atherosclerotic plaque micro-environment as a trigger for macrophage polarisation. *Thromb. Haemost.* *106*, 763–771.
- ◆ Xanthoudakis, S., and Curran, T. (1992). Identification and characterization of Ref-1, a nuclear protein that facilitates AP-1 DNA-binding activity. *EMBO J.* *11*, 653–665.
- ◆ Xu, S.-Z., Sukumar, P., Zeng, F., Li, J., Jairaman, A., English, A., Naylor, J., Ciurtin, C., Majeed, Y., Milligan, C.J., et al. (2008). TRPC channel activation by extracellular thioredoxin. *Nature* *451*, 69–72.
- ◆ Yamaoka-Tojo, M., Ushio-Fukai, M., Hilenski, L., Dikalov, S.I., Chen, Y.E., Tojo, T., Fukai, T., Fujimoto, M., Patrushev, N.A., Wang, N., et al. (2004). IQGAP1, a novel vascular endothelial growth factor receptor binding protein, is involved in reactive oxygen species--dependent endothelial migration and proliferation. *Circ. Res.* *95*, 276–283.
- ◆ Yamawaki, H., Haendeler, J., and Berk, B.C. (2003). Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ. Res.* *93*, 1029–1033.

- ◆ Zhang, H., Luo, Y., Zhang, W., He, Y., Dai, S., Zhang, R., Huang, Y., Bernatchez, P., Giordano, F.J., Shadel, G., et al. (2007). Endothelial-specific expression of mitochondrial thioredoxin improves endothelial cell function and reduces atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* *170*, 1108–1120.
- ◆ Zizzo, G., and Cohen, P.L. (2013). IL-17 Stimulates Differentiation of Human Anti-Inflammatory Macrophages and Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils in Response to IL-10 and Glucocorticoids. *J. Immunol.* *190*, 5237–5246.
- ◆ Zizzo, G., Hilliard, B.A., Monestier, M., and Cohen, P.L. (2012). Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires “M2c” polarization and MerTK induction. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *189*, 3508–3520.
- ◆ Zschauer, T.-C., Matsushima, S., Altschmied, J., Shao, D., Sadoshima, J., and Haendeler, J. (2013). Interacting with thioredoxin-1--disease or no disease? *Antioxid. Redox Signal.* *18*, 1053–1062.

Annexe



Human Plasma Thioredoxin-80 Increases With Age and in ApoE^{-/-} Mice Induces Inflammation, Angiogenesis, and Atherosclerosis

BACKGROUND: Thioredoxin (TRX)-1, a ubiquitous 12-kDa protein, exerts antioxidant and anti-inflammatory effects. In contrast, the truncated form, called TRX80, produced by macrophages induces upregulation of proinflammatory cytokines. TRX80 also promotes the differentiation of mouse peritoneal and human macrophages toward a proinflammatory M1 phenotype.

METHODS: TRX1 and TRX80 plasma levels were determined with a specific ELISA. A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein (ADAM)-10, ADAM-17, and ADAM-10 activities were measured with Sensolyte 520 ADAM10 Activity Assay Kit, Fluorimetric, and InnoZyme TACE Activity Kit, respectively. Western immunoblots were performed with specific antibodies to ADAM-10 or ADAM-17. Angiogenesis study was evaluated in vitro with human microvascular endothelial cells-1 and in vivo with the Matrigel plug angiogenesis assay in mice. The expression of macrophage phenotype markers was investigated with real-time polymerase chain reaction. Phosphorylation of Akt, mechanistic target of rapamycin, and 70S6K was determined with specific antibodies. The effect of TRX80 on NLRP3 inflammasome activity was evaluated by measuring the level of interleukin-1 β and -18 in the supernatants of activated macrophages with ELISA. Hearts were used for lesion surface evaluation and immunohistochemical studies, and whole descending aorta were stained with Oil Red O. For transgenic mice generation, the human scavenger receptor (SR-A) promoter/enhancer was used to drive macrophage-specific expression of human TRX80 in mice.

RESULTS: In this study, we observed a significant increase of plasma levels of TRX80 in old subjects compared with healthy young subjects. In parallel, an increase in expression and activity of ADAM-10 and ADAM-17 in old peripheral blood mononuclear cells compared with those of young subjects was observed. Furthermore, TRX80 was found to colocalize with tumor necrosis factor- α , a macrophage M1 marker, in human atherosclerotic plaque. In addition, TRX80 induced the expression of murine M1 macrophage markers through Akt2/mechanistic target of rapamycin-C1/70S6K pathway and activated the inflammasome NLRP3, leading to the release of interleukin-1 β and -18, potent atherogenic cytokines. Moreover, TRX80 exerts a powerful angiogenic effect in both in vitro and in vivo mouse studies. Finally, transgenic mice that overexpress human TRX80 specifically in macrophages of apoE^{-/-} mice have a significant increase of aortic atherosclerotic lesions.

CONCLUSIONS: TRX80 showed an age-dependent increase in human plasma. In mouse models, TRX80 was associated with a proinflammatory status and increased atherosclerosis.

Dominique Couchie, PhD
Boris Vaisman, PhD
Amna Abderrazak, PhD
Dler Faieeq Darweesh
Mahmood, PhD
Magda M. Hamza, PhD
Fanny Canesi
Vimala Diderot
Khadija El Hadri, PhD
Anne Nègre-Salvayre, PhD
Aurélie Le Page, PhD
Tamas Fulop, MD, PhD
Alan T. Remaley, MD, PhD
Mustapha Rouis, PhD

Correspondence to: Mustapha Rouis, PhD, Biological Adaptation and Ageing (B2A), UMR8256/INSERM-ERL U-1164, Bât A, 6ème étage, Université Pierre et Marie Curie (UPMC, Paris 6), 7, Quai Saint Bernard, 75252 Paris Cedex, France. E-mail mustapha.rouis@upmc.fr

Sources of Funding, see page 473

Key Words: atherosclerosis
 ■ inflammasomes
 ■ inflammation ■ interleukin-1beta ■ macrophages
 ■ neovascularization
 ■ thioredoxins

© 2017 American Heart Association, Inc.

Clinical Perspective

What Is New?

- Plasma levels of thioredoxin (TRX)-80 were significantly increased in healthy old subjects.
- Activities of a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein (ADAM)-10 and ADAM-17, 2 α -secretases responsible for the TRX1 cleavage, were significantly increased in old peripheral blood mononuclear cells.
- A significant activation of the inflammasome NLRP3 by TRX80 was seen, leading to interleukin-1 β and -18 release.
- Transgenic mice that overexpress TRX80, specifically in macrophages, have a significant increase of aortic atherosclerotic lesions.

What Are the Clinical Implications?

- The loss of TRX1 and the increase of TRX80 with age explain, at least in part, the occurrence of oxidative stress and inflammation in old subjects.
- The plasma level of TRX80 could be considered a new parameter for the evaluation of inflammation, angiogenesis, and atherosclerotic lesion development.

The development of atherosclerosis is dependent on both innate and adaptive arms of the immune response, which have been shown to modulate lesion initiation, progression, and potentially devastating thrombotic complications.^{1,2} In this process, macrophages play a central role in the accumulation of lipids in atherosclerotic plaques,³ immune responses⁴ and the maintenance of inflammation.⁵ Therefore, macrophage recruitment and plasticity are key components of atherosclerosis.

Macrophages residing within atherosclerotic lesions represent a heterogeneous cell population, the activation and function of which are influenced by various cytokines and microbial products. For example, interleukin (IL)-1 β , interferon- γ , and endotoxin lipopolysaccharide increase the inflammatory activation profile, yielding the so-called M1 macrophages⁶ that produce proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-6, and IL-12, as well as reactive oxygen species and nitrogen intermediates.⁷ Consistently, M1 macrophages are associated with increased inflammation and tissue damage. In contrast, IL-4, IL-13,⁸ peroxisome proliferator-activated receptor- γ activators,⁸ and adiponectin^{9,10} promote polarization of macrophages into the anti-inflammatory, alternative M2 type. M2 macrophages secrete the anti-inflammatory cytokine IL-10, transforming growth factor- β , and IL-1 receptor antagonist, and they upregulate scavenger receptors, the mannose receptor CD206, and arginase-1. Overall,

the accumulation of M2 macrophages leads to a reduction of inflammation.

Growing evidence indicates that overproduction of reactive oxygen species under pathophysiological conditions is an integral component in the development of cardiovascular diseases such as atherosclerosis, ischemic heart disease, hypertension, cardiomyopathies, cardiac hypertrophy, and congestive heart failure.^{11,12} An imbalance favoring the cellular production of free radicals in amounts exceeding the cellular defense capacities is referred to as oxidative stress,^{11,13} which markedly contributes to arterial inflammation.¹⁴ Therefore, cells have evolved several strategies, both enzymatic and nonenzymatic, to overcome free radical-induced oxidative stress, including preventive and repairing mechanisms, physical barriers, and antioxidant defenses. Nonenzymatic antioxidants are ascorbic acid (vitamin C), α -tocopherol (vitamin E), glutathione, carotenoids, flavonoids, and other antioxidants. Enzymatic antioxidant defenses include superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, glutaredoxin, and the thioredoxin (TRX) system.¹²

The TRX system comprises TRX, truncated TRX (TRX80), TRX reductase, and NADPH. In addition, a natural TRX inhibitor, the TRX-interacting protein, is an important part of this system. The TRX system is essential for maintaining the balance of the cellular redox status and is involved in the regulation of redox signaling. It is also pivotal for growth promotion, neuroprotection, inflammatory modulation, antiapoptosis, immune function, and atherosclerosis. As a ubiquitous and multifunctional protein, TRX1, a 12-kDa highly conserved protein, is expressed in all forms of life and executes its function through its antioxidative, protein-reducing, signal-transducing activities.¹⁵ Several studies reported the beneficial role of TRX1 in cardiovascular diseases.^{16–19} In contrast, the C-terminal truncated form, composed of 1 to 80 or 1 to 84 N-terminal amino acids (TRX80), which is either secreted from cells already truncated or cleaved by 2 α -secretases (a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein [ADAM]-10 and ADAM-17) at the cell surface,²⁰ possesses a proinflammatory cytokine-like activity.²¹ Macrophages have been reported to cleave full-length TRX1 to yield TRX80.²²

The level of TRX80 in plasma has been reported to vary from 2 to 175 ng/mL and is markedly increased under inflammatory conditions.^{23,24} TRX80 activates monocytes and induces upregulation of cell surface pathogen recognition receptors, molecules essential for T-cell activation and function²⁵ and for the release of the proinflammatory cytokines.²⁶ In contrast to the full-length TRX1, which downregulates the expression of a number of inflammatory genes,²⁷ TRX80 promotes mouse peritoneal and human macrophages toward a proinflammatory M1 phenotype and significantly increases aortic lesion surface area in mice.²⁸ Therefore, it

is thought that these 2 different forms of TRX may use different signaling pathway or regulate the same signaling pathway but in different ways. Among the candidate signaling pathways, Akt pathway is most likely to be used by TRX1 and/or TRX80.

Akt, also known as PKB, is a family of 3 serine/threonine protein kinases (Akt1, Akt2, and Akt3) that regulate a host of cellular functions, including cell survival, proliferation, differentiation, and intermediary metabolism.²⁹ In the vascular wall, Akt plays an important role in the proliferation and migration of endothelial cells, regulation of vascular permeability, and angiogenesis.^{30–32} Recent studies of Akt knockout (KO) mice have shown that despite significant sequence homology, the 3 Akt isoforms have some nonredundant functions. Although Akt1-deficient mice exhibit overall growth impairment,³³ Akt2-KO mice have impaired glucose tolerance and insulin resistance,³⁴ and Akt3-null mice display a selective reduction in brain size.³⁵

In addition, it has been reported that a global absence of Akt1 in vivo enhances atherosclerotic lesion burden and promotes coronary atherosclerosis in a mouse model of atherosclerosis, indicating that Akt1 exerts vascular protection against atherogenesis.²⁹ It has been demonstrated that Akt2 ablation results in the M2 polarization of macrophages, whereas Akt1 ablation promotes their M1 polarization.³⁶ Therefore, the implication of Akt pathway has been studied to explore the signaling pathway used by TRX1 and/or TRX80 to induce the macrophages polarization. Because we have observed a significant increase of the plasma level of TRX80 in old subjects compared with young people, we conducted a series of in vitro and in vivo experiments to determine the mechanism underlying the cleavage of the TRX1 and the generation of the TRX80. We also investigated the in vivo role of TRX80 on angiogenesis, inflammation, the oxidative process, and arterial lesion development in mice.

METHODS

Cohort Constitution

A cohort of young and old male and female subjects was collected in collaboration with the Health Professional Department in Ksar Hellal Hospital (Monastir, Tunisia). A total of 283 subjects (male and female) divided into 2 groups, young (n=144 from 20–40 years old [male n=98; female n=46]) and old (n=139, ≥65 years old [male n=94; female n=45]), were recruited after a routine health checkup and were included in the study if they were free of any history of obesity, hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, smoking, or coronary artery diseases. Subjects who had inflammatory diseases, valvular heart disease, cancers, or rheumatoid arthritis were excluded. Heparinized plasma was collected after overnight fasting, centrifuged, and stored at –80°C. TRX1 levels were determined with an ELISA kit from International Office IBL (Hamburg, Germany). TRX80 levels were determined with an

ELISA kit developed in our laboratory (Methods in the online-only Data Supplement). For α-secretase activity, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were purified from 5 young and 5 old subjects, and ADAM-17 and ADAM-10 activities were measured with the Sensolyte 520 ADAM10 Activity Assay Kit, Fluorimetric (Anaspec, France), and InnoZyme TACE Activity Kit (Merck, France), respectively. Aliquots of cell lysates were also used to perform Western immunoblots with specific antibodies to ADAM-10 or ADAM-17 (NeoBiotech, France; Methods in the online-only Data Supplement). All subjects provided written informed consent for the collection and storage of plasma aliquots and PBMCs consistent with the present study. Colocalization of TRX80 and TNF-α on M1 macrophages in human atherosclerotic lesions was conducted on 5-μm sections of vessel specimens obtained from patients undergoing vascular surgery for atherosclerotic complications (Methods in the online-only Data Supplement). For the angiogenesis study, the effect of TRX80 was evaluated in vitro with human microvascular endothelial cells-1 and in vivo with the Matrigel plug angiogenesis assay in mice (Methods in the online-only Data Supplement). The data are presented as mean±SD.

In Vitro Study on Mouse Peritoneal Macrophages

In this study, murine peritoneal macrophages were left untreated or treated with lipopolysaccharide, IL-4, TRX80, or a combination thereof. The expression of the macrophage phenotype markers CD206, myocyte chemoattractant protein-1, IL-10, and TNF-α was investigated at the transcription level with real-time polymerase chain reaction (Table 1 in the online-only Data Supplement). For TRX80 signal pathway determination, murine peritoneal macrophages were untreated or treated with TRX80, PI3K inhibitor, Akt inhibitor, mechanistic target of rapamycin (mTOR) inhibitor, or a combination thereof. Phosphorylation of Akt, mTOR, and 70S6K was determined with specific antibodies (Methods in the online-only Data Supplement). The effect of TRX80 on NLRP3 inflammasome activity was evaluated by measuring the level of IL-1β and IL-18 in the supernatants of activated macrophages (Figure 2 and online-only Data Supplement Figure III) isolated from C57Bl/6.Nlrp3^{+/+} or C57Bl/6.Nlrp3^{-/-} with ELISA. The data are presented as mean±SD.

In Vivo Study on C57Bl/6.apoE^{-/-} Mice

In vivo study was performed on C57Bl/6.apoE^{-/-} mice. Heart and descending aortas were excised and fixed. Hearts were used for lesion surface evaluation and immunohistochemical studies; whole descending aortas were stained (en face) with Oil Red O; the lesion area per animal was quantified (Methods in the online-only Data Supplement); and the data are presented as mean±SD. All procedures involving animal handling and their care were in accordance with the University of Pierre and Marie Curie Guidelines for Husbandry of Laboratory Mice.

Transgenic Mice Generation

The human scavenger receptor (SR-A) promoter/enhancer was used to drive macrophage-specific expression of human TRX80 in mice (Figure 1A in the online-only Data Supplement).

In the created transgenic line, the heterozygous mice had 50 copies of the TRX80 transgene per genome. Expression of human TRX80 was measured in peritoneal macrophages (Figure 1B in the online-only Data Supplement). For the study of the effect of TRX80 transgene on development of atherosclerosis, the transgene was transferred onto an apoE-KO background by crossing the transgenic mice with apoE-KO mice, which were also on a C57Bl/6 N genetic background (stock 2052, Jackson Laboratory).

Statistical Analyses

Statistical significance was calculated with the Mann-Whitney test, unpaired *t* test, or ANOVA and is reported in the legend of each figure and table. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

Baseline Clinical Characteristics

Different parameters of subjects included in this study such as age, body mass index, glycemia, blood pressure, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol, total cholesterol, and triglycerides are reported in the Table.

Plasma Levels of TRX1 and TRX80 in Young and Old Subjects

TRX1 is known to be cleaved at its C-terminal,²¹ producing a truncated protein called TRX80, which accumulates in plasma.²⁴ The conversion of TRX1 to TRX80 appears to be a molecular switch from an anti-inflammatory to a proinflammatory molecule. Two α -secretases (ADAM-10 and ADAM-17) were recently reported to be responsible for its cleavage.²⁰ However, the physiological or patho-

logical condition in which the cleavage process occurs is not known. Because inflammation often increases with age and age is an independent risk factor for cardiovascular diseases, we evaluated the level of both TRX1 and TRX80 in the plasma of young and old male and female subjects. Higher levels of full-length TRX1 were found in young male versus old male subjects (71.96 ± 13.36 versus 24.84 ± 9.26 ng/mL, respectively; $P < 0.001$ [mean \pm SD, Mann-Whitney test]), as well as in young female versus old female subjects (45.42 ± 14.49 versus 25.90 ± 10.05 ng/mL, respectively; $P < 0.001$; Figure 1A). In contrast, TRX80 was lower in young versus old male subjects (9.00 ± 9.01 versus 60.21 ± 18.50 ng/mL; $P < 0.001$) and in young than in old subjects (11.22 ± 15.13 versus 40.41 ± 24.41 ng/mL; $P < 0.001$; Figure 1B). To assess confounding effects, we performed an additional statistical tests with the generalized linear model (GLM-R software, "car" library with gaussian family) using the following model: $TRX1 \approx \text{age} + \text{body mass index} + \text{blood pressure} + \text{glycemia} + \text{LDL-C} + \text{high-density lipoprotein cholesterol} + \text{total cholesterol} + \text{triglycerides}$ and $TRX80 \approx \text{age} + \text{body mass index} + \text{blood pressure} + \text{glycemia} + \text{LDL-C} + \text{high-density lipoprotein cholesterol} + \text{total cholesterol} + \text{triglycerides}$. Then, ANOVA was performed on the results of the generalized linear model. For men, the results stand for both molecules TRX1/TRX80 with a value of $P < 0.001$ in both cases. For women, the results stand for TRX1/TRX80 with a value of $P < 0.05$.

ADAM-10 and ADAM-17 Expression and Activity Increased in PBMC in Old Subjects

The cleavage process of TRX1 into TRX80 could possibly be attributed to the increase of the expression or activities of the 2 α -secretases. Indeed, we showed that

Table. Baseline Clinical Characteristics and TRX-1 and TRX-80 Levels in the Plasma of Young and Old Subjects

	Male			Female		
	Young (n=98)	Old (n=94)	Fold Changes	Young (n=46)	Old (n=45)	Fold Changes
Age, y	32.20 \pm 6.51	75.10 \pm 5.04	2.33	30.72 \pm 4.71	71.09 \pm 10.93	2.31
BMI, kg/m ²	23.45 \pm 1.91	24.69 \pm 1.42	1.05	22.94 \pm 3.95	25.49 \pm 2.22	1.11
Blood pressure, mmHg	12.74 \pm 0.75	13.29 \pm 0.76	1.04	11.41 \pm 0.97	13.56 \pm 1.12	1.19
Glycemia, mmol/L	5.15 \pm 0.37	5.17 \pm 0.44	1.00	4.25 \pm 0.71	5.04 \pm 0.50	1.27
LDL-C, mmol/L	2.11 \pm 0.38	2.74 \pm 0.48	1.30	2.27 \pm 0.22	2.51 \pm 0.28	1.11
HDL-C, mmol/L	1.29 \pm 0.18	1.16 \pm 0.19	0.90	1.61 \pm 0.25	1.49 \pm 0.10	0.92
Total cholesterol, mmol/L	3.75 \pm 0.43	4.35 \pm 0.54	1.16	4.15 \pm 0.57	4.96 \pm 0.36	1.19
Triglycerides, mmol/L	0.97 \pm 0.27	1.17 \pm 0.28	1.21	0.96 \pm 0.34	1.18 \pm 0.17	1.23
TRX1, ng/mL	71.96 \pm 13.36	24.84 \pm 9.26	0.35	45.42 \pm 14.49	25.90 \pm 10.05	0.57
TRX80, ng/mL	9.00 \pm 9.01	60.25 \pm 18.50	6.69	11.22 \pm 15.30	40.41 \pm 24.41	3.60

BMI indicates body mass index; HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol; and TRX, thioredoxin. Statistical tests used the generalized linear model (GLM-R Software; "car" library with gaussian family) with the following model: $TRX1 \approx \text{age} + \text{BMI} + \text{blood pressure} + \text{glycemia} + \text{LDL-C} + \text{HDL-C} + \text{total cholesterol} + \text{triglycerides}$ and $TRX80 \approx \text{age} + \text{BMI} + \text{blood pressure} + \text{glycemia} + \text{LDL-C} + \text{HDL-C} + \text{total cholesterol} + \text{triglycerides}$. Then, an analysis of variance was performed on the results of the generalized linear model. For men, the results stand for both molecules TRX1/TRX80 with values of $P < 0.001$ in both cases. Similarly, for women, the results stand for TRX1/TRX80 with a value of $P < 0.05$.

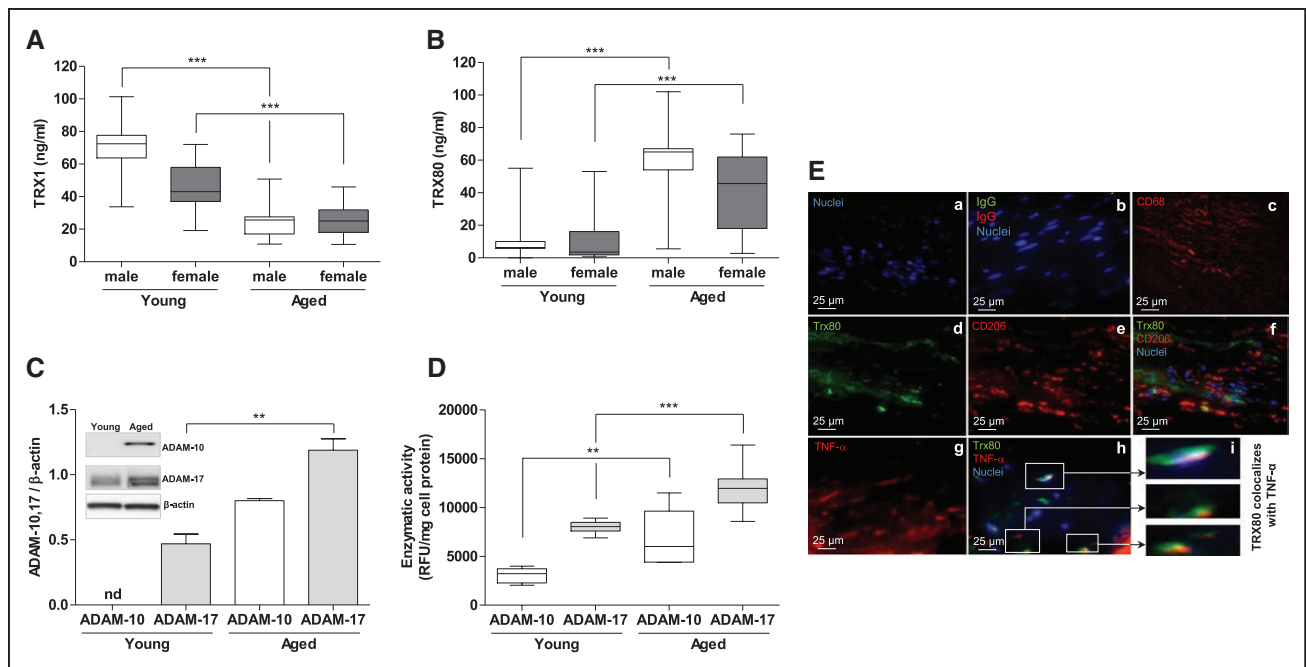


Figure 1. Plasma thioredoxin (TRX)-1, TRX80, a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein (ADAM)-10, and ADAM-17 expression and activity and immunohistochemical studies.

Plasma levels of TRX1 and TRX80 in young and old subjects. Plasma levels of TRX1 (**A**) and TRX80 (**B**) in young (male, $n=98$; and female, $n=46$) and old (male, $n=94$; and female, $n=45$) subjects were determined by ELISA and are represented in box plots indicating the median and lower and upper quartiles. Statistically significant differences are indicated (male, young vs old; $***P<0.001$, Mann-Whitney). **C**, ADAM-10 and ADAM-17 expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from young and old subjects. PBMCs from young ($n=5$) and old ($n=5$) subjects were cultured, lysed, and centrifuged, and 20 μ g protein per lane was separated on 4% to 15% gels and electroblotted onto polyvinylidene difluoride membrane as described in Methods. Specific antibodies against ADAM-10 (1:500), ADAM-17 (1:500), or β -actin for normalization were added. Membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:5000), and specific bands were visualized and scanned. Data are presented as mean \pm SD of 5 young and 5 old subjects. Statistically significant differences are indicated ($**P<0.01$, Mann-Whitney). One representative Western immunoblot was inserted. **D**, Measurement of ADAM-10 and ADAM-17 activities. PBMCs were isolated from healthy young and old donors, washed, lysed, and centrifuged, and the supernatant was collected and used to assay ADAM-10 and ADAM-17 activities with the SensoLyte 520 ADAM10 Activity Assay Kit, Fluorimetric, and InnoZyme TACE Activity Kit, respectively. Results are represented in box plots indicating the median and lower and upper quartiles. Statistically significant differences are indicated ($**P<0.01$, $***P<0.001$, Mann-Whitney). **E**, TRX80 colocalizes with M1 macrophages in human atherosclerotic lesions. Serial sections of paraffin-embedded human atherosclerotic vessel specimens from 3 patients undergoing vascular surgery for atherosclerotic complications were stained with DAPI for nuclei visualization (**a**); the primary antibodies were substituted with control IgG (**b**) or with anti-CD68 (a specific marker for macrophages; **c**); TRX80 monoclonal mouse antibody that reacts exclusively with truncated protein was stained with Cy-5-conjugated secondary antibody (**d**) or anti-human CD206 (**e**), double stained with anti-TRX80 and anti-CD206 (**f**), anti-tumor necrosis factor- α (TNF- α ; **g**), and double stained with anti-TRX80 and anti-TNF- α primary antibodies (**h**). Magnification of selected area in **h** is shown in **i**. Representative images are shown. Original magnifications $\times 400$.

ADAM-10 and ADAM-17 expression (Figure 1C) and activities (Figure 1D) increased in PBMCs isolated from old subjects compared with PBMC isolated from young people. Because oxidative stress, inflammatory cytokines, and oxidized LDL could increase with age, we examined whether H_2O_2 , IL-6, IL-1 β , TNF- α , or oxidized LDL was responsible for the induction of the expression of the 2 α -secretases in cultured murine peritoneal macrophages. None of these treatments, however, had any appreciable effect on the level of either α -secretase (Figure II in the online-only Data Supplement).

TRX80 Colocalizes With M1 Macrophages in Human Atherosclerotic Lesions

Staining of serial sections of human atherosclerotic plaques confirmed that TRX80 expressed by macrophages colocalized with the M1 macrophage marker TNF- α (Figure 1Eh and 1Ei). In contrast, TRX80 does not colocalize with CD206, a marker of M2 macrophages (Figure 1Ef), indicating that TRX80 could promote the M1 polarization in human atherosclerotic vessels.

TRX80 and NLRP3 Inflammasome Activation

Because the NLRP3 inflammasome is involved in the pro-IL-1 β and pro-IL-18 maturation into biologically active IL-1 β and IL-18, we determined whether TRX80 is able to activate the NLRP3 inflammasome. TRX80, however, did not stimulate the generation of mature IL-1 β and IL-18 in the absence of lipopolysaccharide (Figure 2 and Figure III in the online-only Data Supplement, respectively). Of note, lipopolysaccharide is known to activate nuclear factor- κ B, leading to pro-IL-1 β and pro-IL-18 generation. Therefore, cholesterol crystals (CCs), which are specific activators of the NLRP3 inflammasome,³⁷ induced the maturation of pro-IL-1 β and pro-IL-18 into IL-1 β and IL-18. In the presence of TRX80 (1 or 2.5 μ g/mL), CCs (1 mg/mL), or a combination of TRX80 and CCs, the generation of mature IL-1 β and IL-18 was comparable to control cells, indicating that neither TRX80 nor CCs affect nuclear factor- κ B (Figure 2 and Figure III in the online-only Data Supplement). Treatment of macrophages with lipopolysaccharide (10 ng/mL) enhanced the expression of IL-1 β (24.4 \pm 5.2 versus 15.2 \pm 4.4 pg/100 μ g cell protein for the control; P <0.05; Figure 2) and IL-18 (32.3 \pm 6.1 versus 18.6 \pm 0.8 pg/100 μ g cell protein for the control; P <0.05; Figure III in the online-only Data Supplement). Treatment of macrophages with lipopolysaccharide (10 ng/mL) for 4 hours and then with TRX80 (1 μ g/mL) for an additional 24 hours potentiated the level of IL-1 β (41 \pm 4.0 versus 24.4 \pm 5.2 pg/100 μ g cell protein for lipopolysaccharide-treated cells; P <0.05; Figure 2) and IL-18 (49.0 \pm 6.0 versus 32.3 \pm 6.1 pg/100 μ g cell protein

for lipopolysaccharide-treated cells; P <0.05; Figure III in the online-only Data Supplement). Likewise, a marked induction of IL-1 β (44.0 \pm 4.0 pg/100 μ g cell protein versus lipopolysaccharide-stimulated cells; P <0.05; Figure 2) and IL-18 (58.2 \pm 4.0 pg/100 μ g cell protein versus lipopolysaccharide-stimulated cells; P <0.05; Figure III in the online-only Data Supplement) was observed when cells were first activated with lipopolysaccharide (10 ng/mL) for 4 hours and then with CCs (1 mg/mL) for an additional 24 hours. Finally, treatment of macrophages with lipopolysaccharide (10 ng/mL) for 4 hours followed by treatment with CCs (1 mg/mL) and TRX80 (1 μ g/mL) for an additional 24 hours further potentiated the secretion of IL-1 β (52.1 \pm 6 pg/100 μ g cell protein versus lipopolysaccharide-stimulated cells; P <0.01; Figure 2) and IL-18 (75.9 \pm 3.0 pg/100 μ g cell protein versus lipopolysaccharide-stimulated cells; P <0.01; Figure III in the online-only Data Supplement). In contrast, treatment of macrophages isolated from *Nlrp3*^{-/-} with TRX80, lipopolysaccharide, CCs, or a combination thereof did not induce generation of mature IL-1 β (Figure 2) or IL-18 (Figure III in the online-only Data Supplement).

Correlation Between the Plasma Levels of TRX80 and IL-1 β

Because the plasma levels of TRX80 vary with age and because TRX80 contributes to the generation of IL-1 β , we examined whether a correlation exists between the plasma levels of IL-1 β observed in young and old subjects and the plasma levels of TRX80 in the same subjects. We did not observe any significant correlation between TRX80 and IL-1 β (Figure IV in the online-only Data Supplement).

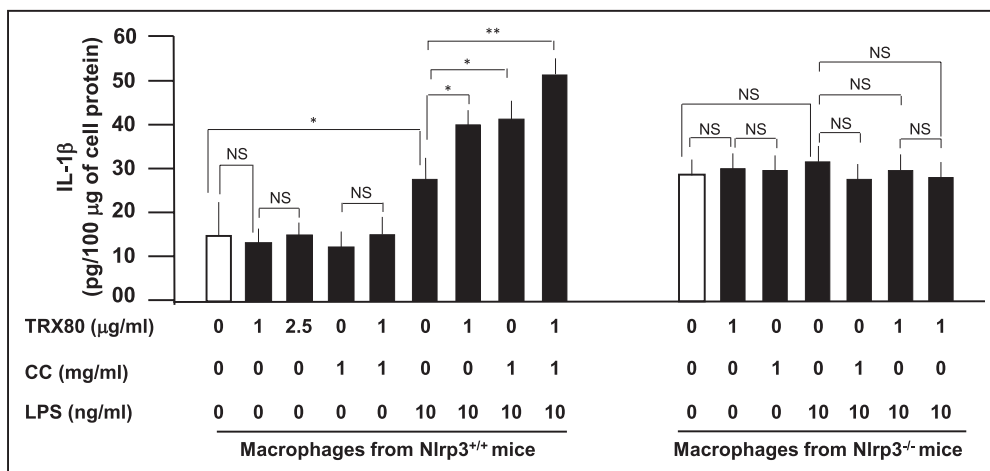


Figure 2. Effect of thioresdoxin (TRX)-80 on inflammasome NLRP3 activation.

Peritoneal macrophages were purified and cultured at 0.5×10^6 cells/mL. The cells were incubated with TRX80 in the absence or presence of cholesterol crystals (CC; 1 mg/mL), lipopolysaccharide (LPS; 10 ng/mL), or both. Data are presented as mean \pm SD of interleukin-1 β (IL-1 β ; pg/100 μ g cell protein) of 3 independent experiments performed in duplicate. Statistically significant differences, using the Mann-Whitney test, are indicated (* P <0.05, ** P <0.01). We also used ANOVA for multiple comparisons to analyze the data obtained on macrophages isolated from *Nlrp3*^{-/-} mice. In all cases, there is no significant difference between samples.

Both TRX1 and TRX80 Activate Akt

TRX1 and TRX80 upregulated Akt activation in non-treated macrophages, as demonstrated by an *in vitro* kinase assay performed on total cellular extracts after exposure to TRX1 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or TRX80 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 15 minutes. These data were confirmed by Western blots, which showed increased levels of the activated form of phosphorylated Akt (Figure V in the online-only Data Supplement). Unlike TRX80, TRX1 did not dampen the downregulation of Akt activity by LY294002. When cells were primed with either IL-4 (15 ng/mL) or lipopolysaccharide (100 ng/mL), treatment with TRX1 or TRX80 did not show any further activation of Akt (Figure V in the online-only Data Supplement). It is possible that they could activate different isoforms of Akt.

TRX80, but Not TRX1, Activates mTOR

To determine which isoform has been activated by TRX1 and TRX80, a specific inhibitor of Akt1/2 kinase (A6730, Sigma), was used. With this inhibitor, we observed an IC_{50} of 58 nmol/L, 210 nmol/L, and 2.12 mmol/L for Akt1, Akt2, and Akt3, respectively. Accordingly, either Akt1 or Akt2 was inhibited, and then the cells were treated with different concentrations (0, 1, 2, and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of TRX1 or TRX80 for 15 minutes. TRX80 significantly activated mTOR in a dose-dependent manner only when Akt1 was inhibited, whereas TRX1 did not activate mTOR (Figure VI in the online-only Data Supplement).

TRX80 Activates mTOR in Dose-Dependent Manner

The p70S6K (Thr389) is known to be a direct substrate of mTORC1. It is often used as functional readout of mTORC1 activity because phosphorylation of this site by mTORC1 has been confirmed both *in vitro* and *in vivo* and is inhibited by rapamycin treatment. Therefore, to confirm our previous results, murine peritoneal macrophages were pretreated with rapamycin (20 nmol/L) for 1 hour, followed by exposure to different concentrations of TRX80 for 30 minutes. Results of Western blot analysis using phospho-p70S6K- and p70S6K-specific antibodies showed that TRX80 activates mTOR in a dose-dependent manner (Figure VII in the online-only Data Supplement).

Inhibition of mTOR Downregulated the Expression of Inflammatory Cytokines

To further explore the role of mTOR in macrophage polarization, isolated murine peritoneal macrophages were pretreated with or without rapamycin (20 nmol/L) for 6 hours and/or exposed to lipopolysaccharide (100

ng/mL) and/or TRX80 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stimulation. Rapamycin attenuated the expression of the inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β , and TNF- α , revealing the role of mTOR signaling in macrophage phenotype orientation. TRX80 positively regulates the expression of these cytokines, most probably by activation of the mTOR pathway (Figure VIII in the online-only Data Supplement).

mTOR Inhibition Orients Resting Macrophages Toward the M2 Phenotype

Freshly isolated murine peritoneal macrophages were pretreated with or without rapamycin (20 nmol/L) for 6 hours and/or exposed to IL-4 (15 ng/mL) and/or TRX80 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) stimulation. Rapamycin stimulated the expression of the anti-inflammatory cytokines IL-10 and CD206, indicating mTOR signaling in macrophage polarization. Of note, TRX80 treatment attenuated the expression of these cytokines, maybe through reactivating mTOR (Figure IX in the online-only Data Supplement).

TRX80 Induced Angiogenesis

TRX80 was also found to be angiogenic *in vitro* and *in vivo*. Indeed, cultured human microvascular endothelial cells-1 treated or not treated with TRX80 showed a significant increase, in a dose-dependent manner, of angiogenesis as measured by capillary tube formation (40 \pm 5%, 73 \pm 10%, and 87 \pm 5% for TRX80 at 0.01, 0.1, and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively; $P<0.001$ versus negative control; Figure 3A and 3B). Of note, the percentage of tube formation obtained with the positive control was 90 \pm 3%, and the negative control was 4 \pm 1% (Figure 3B). Similarly, the Matrigel plug angiogenesis assay in mice was used to investigate the proangiogenic effect of TRX80 *in vivo*. The result in Figure 3C and 3D indicates a significant increase of angiogenesis (157.10 \pm 66.92 for TRX80 (n=17) versus 109.30 \pm 30.08 for the control (n=17; $P=0.02$).

M1 Macrophage Number Increased in Arterial Lesion of TRX80 Transgenic Mice

Immunohistochemical analysis showed that the number of macrophages expressing TNF- α is greater than the number of macrophages expressing CD206 in transgenic mice compared with control mice (Figure 4A and 4B).

Human TRX80, Specifically Expressed in Murine Macrophages, Increased Atherosclerotic Lesions in ApoE-KO Mice

The overexpression of human TRX80, specifically in macrophages of apoE-KO mice, does not change sig-

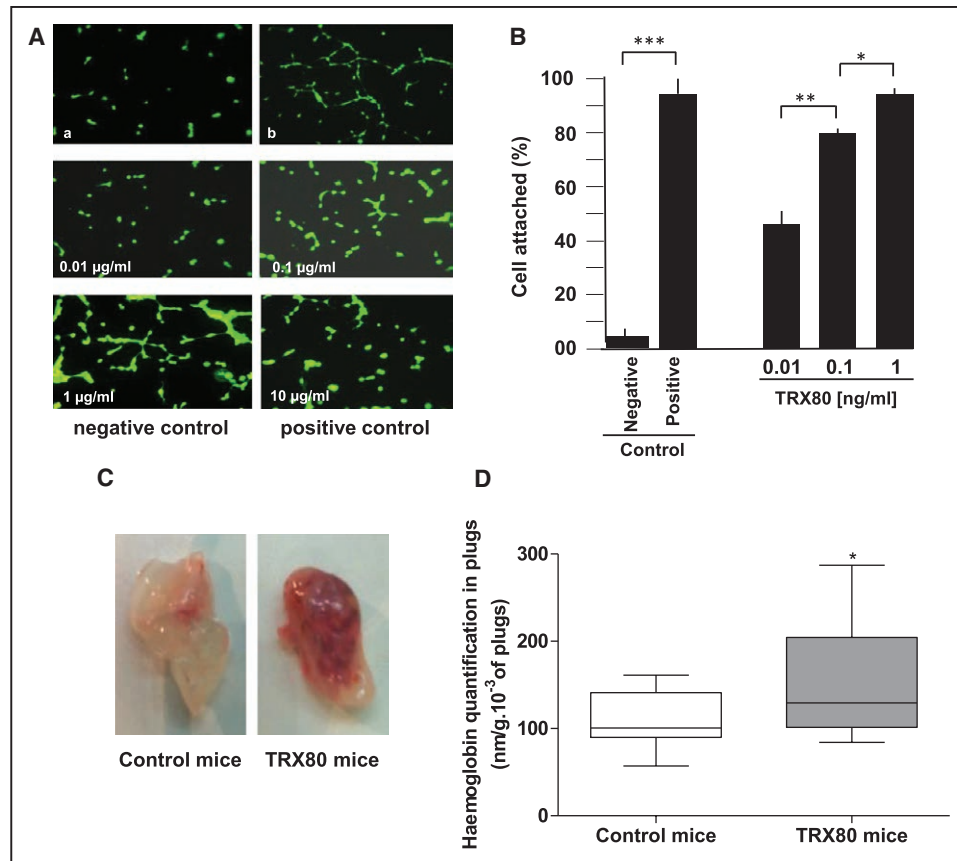


Figure 3. Effect of thioredoxin (TRX)-80 on angiogenesis.

A and **B**, Treatment of cultured human microvascular endothelial cells-1 with TRX80 showed a significant increase, in a dose-dependent manner, of angiogenesis as measured by capillary tube formation. Similarly, the Matrigel plug angiogenesis assay in mice (**C** and **D**) was used to investigate in vivo the proangiogenic effect of TRX80. Data are presented as mean±SD. Statistically significant differences, calculated with the unpaired *t* test, are indicated (**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001).

nificantly change the phenotype of mice. Indeed, we did not observe any obvious differences between control and transgenic mice (eg, body weight, longevity, apparent neurological disorder, hair color, or any visible anatomic differences). It also does not increase the level of TRX80 in plasma (undetectable human TRX80). Of note, the endogenous levels of murine TRX80 cannot be determined because of the lack of specific antibodies. Overexpression of human TRX80 also did not affect the plasma levels of proinflammatory cytokines such as IL-33, IL-6, or myocyte chemoattractant protein-1 or the plasma levels of autoantibodies against oxidized LDL (Figure X in the online-only Data Supplement). However, we observed a difference in aortic atherosclerotic lesions in the transgenic mice compared with the control mice (Figure 4C and 4D). Indeed, the mean total surface lesion area (aortic root, thoracic, and bifurcation) increased significantly only in transgene female mice homozygous for TRX80, which had 100 copies of the transgene per genome (*n*=5), compared with control mice (*n*=5) (40866±7077 versus 27511±2285 µm²; *P*=0.0079; Figure 4C). In addition, in sinus aorta, the mean lesion area in transgenic mice (female, 100

copies) was significantly higher than in control mice (735072±61899; *n*=8 versus 606894±58098; *n*=9; *P*=0.0016; Figure 4D).

DISCUSSION

In this study, we have shown that the level of the TRX80 increased in human plasma with age, whereas the level of full-length TRX1 decreased in the same plasma (Figure 1A and 1B). Such an increase in the level of TRX80 can be attributed to increased expression and activity of ADAM-10 and ADAM-17 on PBMCs (Figure 1C and 1D). We have also shown that TRX80 can upregulate the expression of several proinflammatory genes, including IL-1β, in human macrophages.²⁸ This could, at least in part, explain the “inflam’ageing” phenomenon observed in old subjects. Therefore, we have identified a TRX80 signal pathway involving macrophage M1 phenotype polarization and found that TRX80 induces the expression of murine M1 macrophages markers through the Akt2/mTOR-C1/70S6K pathway (Figures V through IX in

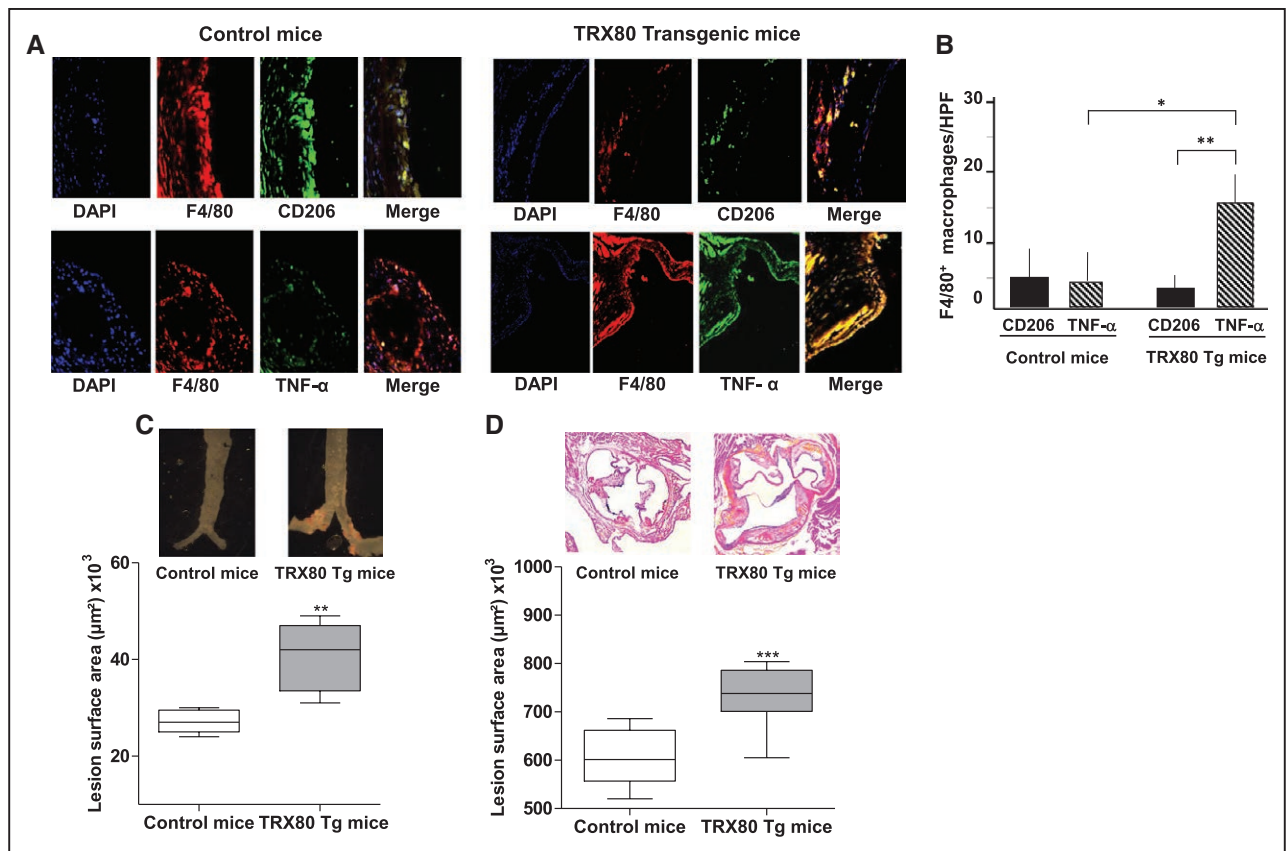


Figure 4. Macrophage phenotype in atherosclerotic lesions of thioredoxin (TRX)-80 transgenic (Tg) mice and lesion surface in the aortic sinus and whole aortas (en face).

C57Bl/6.ApoE^{-/-} mice (control) and TRX80 Tg mice in C57Bl/6.ApoE^{-/-} background were euthanized. Paraffin serial sections (7 μm) of proximal aortas were analyzed by immunohistochemistry using double immunostaining with antibodies against either F4/80 and tumor necrosis factor-α (TNF-α; M1 marker) or CD206 (M2 marker). **A**, Representative images. **B**, Quantification of the number of macrophages (F4/80) that express TNF-α or CD206. Data are mean±SD of 8 mice. Statistically significant differences are indicated (**P*<0.05, ***P*<0.01, unpaired *t* test). At 8 months of age, female ApoE^{-/-} and female TRX80 Tg mice on ApoE^{-/-} background were euthanized, and hearts and proximal aortas were removed and fixed. Hearts were cut directly under and parallel to the leaflet, and the upper portions were embedded in optimum cutting temperature medium. One hundred sections of 7-μm thickness were prepared from the top of the left ventricle. The sections were stained for lipids with Oil Red O and counterstained with Harris hematoxylin. Sections were used for specific morphometric evaluation of intimal lesions. **C**, Ascendant aortas were stained with Sudan IV, and total surface lesion area was evaluated (n=5; ***P*<0.01). **D**, Mean±SD lesion size in these sections was determined (n=5; ****P*<0.001, Mann-Whitney test).

the online-only Data Supplement). In addition, we observed a colocalization of TRX80 with TNF-α, a marker of M1 macrophages, in human atherosclerotic plaque (Figure 1Eh and 1Ei). This may be due to the TRX80-induced activation of proinflammatory Akt2/mTOR-C1/70S6K signaling pathways.

Both TRX1 and TRX80 activate Akt in resting macrophages, whereas in macrophages already polarized toward either M1 or M2, they could not further activate Akt. Previously, it was documented that TRX1 can activate Akt,^{38,39} but here, we show for the first time the effect of TRX80 on Akt/mTOR pathway. As mentioned earlier, we hypothesized that each molecule may activate a different isoform of Akt. Therefore, we have inhibited Akt isoforms separately. It has been found that only TRX80 specifically activates mTOR only when

Akt1 is inhibited. Thus, in this study, we established that TRX80 induced the macrophage M1 phenotype through the phosphorylation of Akt2, mTOR-C1, and 70S6K. In contrast, TRX1 induced the macrophage M2 phenotype through Akt1, mTOR-C2, and 4E-BP1. Taken together, these studies indicate that TRX80 functions as a regulator of macrophage phenotype, tipping the balance toward the proinflammatory M1 state. As a consequence, atherosclerotic plaques become larger and probably more unstable.

From these findings, inhibition of mTOR activity appears to orient resting macrophages toward the M2 phenotype and impairs the polarizing effect of lipopolysaccharide. These results are consistent with recent works by Byles et al⁴⁰ and Pan et al.⁴¹ These studies showed that lipopolysaccharide-induced expression of

IL-1 β and IL-6 was markedly suppressed by INK128, an mTOR inhibitor, at both the mRNA and protein levels.⁴¹ Another recent study showed that rapamycin treatment restores Akt activation simultaneously with rescue of M2 gene expression and arginase activity. Moreover, rapamycin treatment of control bone marrow–derived macrophages modestly increased Akt signaling and M2 response.⁴⁰

Furthermore, our results show that TRX80 uses the mTOR signaling pathway to exert its effect in polarizing macrophages toward the M1 phenotype because it induced mTOR activity in a dose-dependent manner, as demonstrated by the increased phosphorylation of P70S6K. The molecular mechanism by which TRX80 could rescue mTOR from the inhibitory action of rapamycin is still unclear. It may prevent the formation of rapamycin–FK506 binding protein complex because rapamycin first binds to its cellular receptor, FK506 binding protein, and it is the rapamycin–FK506 binding protein complex that inhibits TOR function. This mechanism of action is conserved in eukaryotes.⁴² Further downstream proteins need to be carefully investigated to find out the exact signaling pathway used by either TRX1 or TRX80 to stimulate macrophage polarization because specific macrophage-targeted therapies are now taking the first steps into the clinical arena.

Angiogenesis is a physiological process required for embryonic vascular development, which is also involved in wound healing and in pathophysiological progress of some diseases such as diabetic retinopathy, cancer, and atherosclerosis.⁴³ In the normal arterial wall, the vasa vasorum constitutes a microvascular network in the adventitia. Although no capillaries are found in the intima and the media of normal arteries, neovascularization is seen in the intima of human atherosclerotic lesions.^{44,45} These neocapillaries are thought to favor the progression of the plaque, to promote plaque instability and intraplaque hemorrhage, and finally to increase the risk of atherothrombotic events.^{45–47} Thus, we found that TRX80-induced angiogenesis both in vitro in a human microvascular endothelial cell-1 tube formation model and in vivo in the murine Matrigel plug model (Figure 3A and 3B) may be critical in understanding the link between aging and cardiovascular disease. Indeed, our results with TRX80 transgenic mice indicated an increase in lesion surface area even in the absence of a high-fat diet. This pathological effect can possibly be attributed to the increased number of macrophages with the M1 phenotype and the neovascularization in atherosclerotic lesions in the transgenic mice.

The biological roles of TRX80 are still largely unknown. Previously, TRX80 was called eosinophil cytotoxicity-enhancing factor because of its eosinophil cytotoxicity and was first detected in the plasma of patients with severe schistosomiasis.^{48–50} Of note, these patients

also developed atherosclerosis. It may be valuable to identify other pathologies associated with TRX80 generation and to study in greater detail the molecular mechanisms leading to its generation.

Last, because IL-1 β and IL-18 maturation is under the control of the inflammasome NLRP3 and the plasma level of these cytokines increased in elderly subjects, we investigated the effect of TRX80 on inflammasome NLRP3 activation and IL-1 β and IL-18 generation. Our data showed that TRX80 exerts its effect, at least in part, through the activation of inflammasome NLRP3 (Figure 2 and Figure III in the online-only Data Supplement). However, we did not observe any correlation between the plasma levels of TRX80 and IL-1 β . Furthermore, we have generated transgenic mice that overexpress human TRX80 specifically in macrophages of apoE-KO mice. These mice had a significant increase of aortic surface lesion (Figure 4C and 4D). Taking these results together, we have identified TRX80 as a new pro-inflammatory and proangiogenic actor that, in contrast to TRX1, increases its plasma concentration with age and thus could explain increased associated with aging.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Prof Christopher Glass for providing the pAL1 vector, Prof Onnik Agbulut for performing the mice heart section, Prof Sonia Karabina for providing oxidized LDL, and Prof Hédi Soula for performing statistical tests using a generalized linear model.

SOURCES OF FUNDING

Work by Drs Remaley and Vaisman for this study was supported by intramural National Health, Lung, and Blood Institute research funds. Work by Dr Couchie, Dr Mahmood, Dr Hamza, F. Canesi, V. Diderot, Dr El Hadri, and Dr Rouis was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Center National de la Recherche Scientifique, and Université Pierre et Marie Curie. Work by Dr Nègre-Salvayre was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

DISCLOSURES

None.

AFFILIATIONS

From Biological Adaptation and Ageing (B2A), CNRS UMR-8256/INSERM ERL U-1164, Biological Institute Paris-Seine, Sorbonne University, Paris, France (D.C., A.A., D.F.D.M., M.M.H., F.C., V.D., K.E.H., M.R.); Lipoprotein Metabolism Section, Cardiovascular-Pulmonary Branch, National Heart, Lung, and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD (B.V., A.T.R.); Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (12 MC), INSERM UMR 1048, Toulouse, France

(A.N.-S.); and Centre de Recherche sur le Vieillessement, Service Gériatrique, Département de Médecine, Université de Sherbrooke, Quebec, Canada (A.L.P., T.F.).

FOOTNOTES

Received August 2, 2016; accepted April 26, 2017.

The online-only Data Supplement, podcast, and transcript are available with this article at <http://circ.ahajournals.org/lookup/suppl/doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.117.027612/-/DC1>.

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

REFERENCES

- Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2006;6:508–519. doi: 10.1038/nri1882.
- Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:802–815. doi: 10.1038/nri2415.
- Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell*. 2011;145:341–355. doi: 10.1016/j.cell.2011.04.005.
- Shibata N, Glass CK. Regulation of macrophage function in inflammation and atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009;50(suppl):S277–S281. doi: 10.1194/jlr.R800063-JLR200.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:451–483. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132532.
- Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175–184. doi: 10.1172/JCI29881.
- Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:23–35. doi: 10.1038/nri978.
- Bouhler MA, Derudas B, Rigamonti E, Diévert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. PPAR-gamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*. 2007;6:137–143. doi: 10.1016/j.cmet.2007.06.010.
- Lovren F, Pan Y, Quan A, Szmítko PE, Singh KK, Shukla PC, Gupta M, Chan L, Al-Omran M, Teoh H, Verma S. Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299:H656–H663. doi: 10.1152/ajpheart.00115.2010.
- Ohashi K, Parker JL, Ouchi N, Higuchi A, Vita JA, Gokce N, Pedersen AA, Kalthoff C, Tullin S, Sams A, Sumner R, Walsh K. Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J Biol Chem*. 2010;285:6153–6160. doi: 10.1074/jbc.M109.088708.
- Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:29–38. doi: 10.1161/01.ATV.0000150649.39934.13.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:44–84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001.
- Avery SV. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J*. 2011;434:201–210. doi: 10.1042/BJ20101695.
- Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease. *Pflugers Arch*. 2010;459:923–939. doi: 10.1007/s00424-010-0808-2.
- El Hadri K, Mahmood DF, Couchie D, Jguirim-Souissi I, Genze F, Diderot V, Syrovets T, Lunov O, Simmet T, Rouis M. Thioredoxin-1 promotes anti-inflammatory macrophages of the M2 phenotype and antagonizes atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:1445–1452. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.249334.
- Yamawaki H, Haendeler J, Berk BC. Thioredoxin: a key regulator of cardiovascular homeostasis. *Circ Res*. 2003;93:1029–1033. doi: 10.1161/01.RES.0000102869.39150.23.
- Lu J, Holmgren A. Thioredoxin system in cell death progression. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17:1738–1747. doi: 10.1089/ars.2012.4650.
- Ebrahimiyan T, Touyz RM. Thioredoxin in vascular biology: role in hypertension. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:1127–1136. doi: 10.1089/ars.2007.1985.
- World CJ, Yamawaki H, Berk BC. Thioredoxin in the cardiovascular system. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84:997–1003. doi: 10.1007/s00109-006-0109-6.
- Gil-Bea F, Akterin S, Persson T, Mateos L, Sandebring A, Avila-Cariño J, Gutierrez-Rodriguez A, Sundström E, Holmgren A, Winblad B, Cedazo-Minguez A. Thioredoxin-80 is a product of alpha-secretase cleavage that inhibits amyloid-beta aggregation and is decreased in Alzheimer's disease brain. *EMBO Mol Med*. 2012;4:1097–1111. doi: 10.1002/emmm.201201462.
- Pekkari K, Holmgren A. Truncated thioredoxin: physiological functions and mechanism. *Antioxid Redox Signal*. 2004;6:53–61. doi: 10.1089/152308604771978345.
- Bizzarri C, Holmgren A, Pekkari K, Chang G, Colotta F, Ghezzi P, Bertini R. Requirements for the different cysteines in the chemotactic and desensitizing activity of human thioredoxin. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:1189–1194. doi: 10.1089/ars.2005.7.1189.
- Cortes-Bratti X, Bassères E, Herrera-Rodriguez F, Botero-Kleiven S, Copotelli G, Andersen JB, Masucci MG, Holmgren A, Chaves-Olarte E, Frisan T, Avila-Cariño J. Thioredoxin 80-activated-monocytes (TAMs) inhibit the replication of intracellular pathogens. *PLoS One*. 2011;6:e16960. doi: 10.1371/journal.pone.0016960.
- Pekkari K, Gurunath R, Arner ES, Holmgren A. Truncated thioredoxin is a mitogenic cytokine for resting human peripheral blood mononuclear cells and is present in human plasma. *J Biol Chem*. 2000;275:37474–37480. doi: 10.1074/jbc.M001012200.
- Lemarchal H, Anract P, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D, Ekindjian OG, Borderie D. Impairment of thioredoxin reductase activity by oxidative stress in human rheumatoid synoviocytes. *Free Radic Res*. 2007;41:688–698. doi: 10.1080/10715760701294468.
- Bertini R, Howard OM, Dong HF, Oppenheim JJ, Bizzarri C, Sergi R, Caselli G, Pagliei S, Romines B, Wilshire JA, Mengozzi M, Nakamura H, Yodoi J, Pekkari K, Gurunath R, Holmgren A, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Ghezzi P. Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*. 1999;189:1783–1789.
- Billiet L, Furman C, Larigauderie G, Copin C, Brand K, Fruchart JC, Rouis M. Extracellular human thioredoxin-1 inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta expression in human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*. 2005;280:40310–40318. doi: 10.1074/jbc.M503644200.
- Mahmood DF, Abderrazak A, Couchie D, Lunov O, Diderot V, Syrovets T, Slimane MN, Gosselet F, Simmet T, Rouis M, El Hadri K. Truncated thioredoxin (Trx-80) promotes pro-inflammatory macrophages of the M1 phenotype and enhances atherosclerosis. *J Cell Physiol*. 2013;228:1577–1583. doi: 10.1002/jcp.24319.
- Fernández-Hernando C, Ackah E, Yu J, Suárez Y, Murata T, Iwakiri Y, Prendergast J, Miao RQ, Birnbaum MJ, Sessa WC. Loss of Akt1 leads to severe atherosclerosis and occlusive coronary artery disease. *Cell Metab*. 2007;6:446–457. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.007.
- Ackah E, Yu J, Zoellner S, Iwakiri Y, Skurk C, Shibata R, Ouchi N, Easton RM, Galasso G, Birnbaum MJ, Walsh K, Sessa WC. Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:2119–2127. doi: 10.1172/JCI24726.
- Chen J, Somanath PR, Razorenova O, Chen WS, Hay N, Bornstein P, Byzova TV. Akt1 regulates pathological angiogenesis, vascular maturation and permeability in vivo. *Nat Med*. 2005;11:1188–1196. doi: 10.1038/nm1307.
- Phung TL, Ziv K, Dabydeen D, Eyiah-Mensah G, Riveros M, Perruzzi C, Sun J, Monahan-Earley RA, Shiojima I, Nagy JA, Lin MI, Walsh K, Dvorak AM, Briscoe DM, Neeman M, Sessa WC, Dvorak HF, Benjamin LE. Pathological angiogenesis is induced by sustained Akt signaling and inhibited by rapamycin. *Cancer Cell*. 2006;10:159–170. doi: 10.1016/j.ccr.2006.07.003.
- Chen WS, Xu PZ, Gottlob K, Chen ML, Sokol K, Shiyanova T, Roninson I, Weng W, Suzuki R, Tobe K, Kadowaki T, Hay N. Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene. *Genes Dev*. 2001;15:2203–2208. doi: 10.1101/gad.913901.
- Cho H, Mu J, Kim JK, Thorvaldsen JL, Chu Q, Crenshaw EB 3rd, Kaestner KH, Bartolomei MS, Shulman GI, Birnbaum MJ. Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta). *Science*. 2001;292:1728–1731. doi: 10.1126/science.292.5522.1728.
- Tschopp O, Yang ZZ, Brodbeck D, Dummler BA, Hemmings-Mieszczyk M, Watanabe T, Michaelis T, Frahm J, Hemmings BA. Essential role of protein kinase B gamma (PKB gamma/Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development*. 2005;132:2943–2954. doi: 10.1242/dev.01864.
- Arranz A, Doxaki C, Vergadi E, Martinez de la Torre Y, Vaporidi K, Lagoudaki ED, Ieronymaki E, Androulidaki A, Venihaki M, Margioris AN,

- Stathopoulos EN, Tschlis PN, Tsatsanis C. Akt1 and Akt2 protein kinases differentially contribute to macrophage polarization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:9517–9522.
37. Duiwell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, Abela GS, Franchi L, Nuñez G, Schnurr M, Espevik T, Lien E, Fitzgerald KA, Rock KL, Moore KJ, Wright SD, Hornung V, Latz E. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*. 2010;464:1357–1361. doi: 10.1038/nature08938.
 38. Kaimul Ahsan M, Nakamura H, Tanito M, Yamada K, Utsumi H, Yodoi J. Thioredoxin-1 suppresses lung injury and apoptosis induced by diesel exhaust particles (DEP) by scavenging reactive oxygen species and by inhibiting DEP-induced downregulation of Akt. *Free Radic Biol Med*. 2005;39:1549–1559. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.07.016.
 39. Sartelet H, Rougemont AL, Fabre M, Castaing M, Duval M, Fetni R, Michiels S, Beauvoyer M, Vassal G. Activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT pathway in neuroblastoma and its regulation by thioredoxin 1. *Hum Pathol*. 2011;42:1727–1739. doi: 10.1016/j.humpath.2011.01.019.
 40. Byles V, Covarrubias AJ, Ben-Sahra I, Lamming DW, Sabatini DM, Manning BD, Horng T. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nat Commun*. 2013;4:2834. doi: 10.1038/ncomms3834.
 41. Pan H, Xu LH, Ouyang DY, Wang Y, Zha QB, Hou XF, He XH. The second-generation mTOR kinase inhibitor INK128 exhibits anti-inflammatory activity in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells. *Inflammation*. 2014;37:756–765. doi: 10.1007/s10753-013-9794-9.
 42. Sandmark DK, Pelletier C, Weber JD, Gutmann DH. Mammalian target of rapamycin: master regulator of cell growth in the nervous system. *Histol Histopathol*. 2007;22:895–903. doi: 10.14670/HH-22.895.
 43. Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011;473:298–307. doi: 10.1038/nature10144.
 44. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero IJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med*. 2003;349:2316–2325. doi: 10.1056/NEJMoa035655.
 45. Moreno PR, Purushothaman KR, Sirol M, Levy AP, Fuster V. Neovascularization in human atherosclerosis. *Circulation*. 2006;113:2245–2252. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.578955.
 46. Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation*. 2005;112:1813–1824. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.535294.
 47. Michel JB, Virmani R, Arbustini E, Pasterkamp G. Intraplaque haemorrhages as the trigger of plaque vulnerability. *Eur Heart J*. 2011;32:1977–1985, 1985a–1985c. doi: 10.1093/eurheartj/ehr054.
 48. Dessein AJ, Lenzi HL, Bina JC, Carvalho EM, Weiser WY, Andrade ZA, David JR. Modulation of eosinophil cytotoxicity by blood mononuclear cells from healthy subjects and patients with chronic schistosomiasis mansoni. *Cell Immunol*. 1984;85:100–113.
 49. Lenzi HL, Mednis AD, Dessein AJ. Activation of human eosinophils by monokines and lymphokines: source and biochemical characteristics of the eosinophil cytotoxicity-enhancing activity produced by blood mononuclear cells. *Cell Immunol*. 1985;94:333–346.
 50. Silberstein DS, Ali MH, Baker SL, David JR. Human eosinophil cytotoxicity-enhancing factor. Purification, physical characteristics, and partial amino acid sequence of an active polypeptide. *J Immunol*. 1989;143:979–983.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Human plasma Thioredoxin-80 increases with age and in ApoE^{-/-} mice induces inflammation, angiogenesis and atherosclerosis.

Dominique Couchie PhD¹, Boris Vaisman, PhD², Amna Abderrazak PhD¹, Dler Faieeq Darweesh Mahmood, PhD¹, Magda M. Hamza PhD¹, Fanny Canesi¹, Vimala Diderot¹, Khadija El Hadri PhD¹, Anne Nègre-Salvayre PhD³, Aurélie Le Page PhD⁴, Tamas Fulop⁴ MD, PhD, Alan T. Remaley MD, PhD² and Mustapha Rouis PhD^{1*}

¹Biological Adaptation and Ageing (B2A), CNRS UMR-8256/INSERM ERL U-1164, Biological Institute Paris-Seine, Sorbonne University Paris 06 UPMC. 75252 Paris, France.

²Lipoprotein Metabolism Section, Cardiovascular-Pulmonary Branch, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD 20892-1508, USA.

³Institut des maladies métaboliques et cardiovasculaires (12 MC). INSERM UMR 1048, 31432 Toulouse, France.

⁴Centre de Recherche sur le Vieillissement, Service Gériatrique, Département de Médecine, Université de Sherbrooke, 1036 Sherbrooke, Quebec, Canada.

Running title: *TRX80 induces inflammation, angiogenesis and atherosclerosis.*

*To whom correspondence should be addressed:

Biological Adaptation and Ageing (B2A)

UMR8256/INSERM-ERL U-1164

Bât. A, 6ème étage

Université Pierre et Marie Curie (UPMC, Paris 6)

7, Quai Saint Bernard

75252 Paris Cedex, France

Tel: 33 1 44 27 20 28

E-mail: mustapha.rouis@upmc.fr

Keywords: Macrophage, truncated thioredoxin, atherosclerosis, inflammation, inflammasome, IL-1 β , angiogenesis.

Supplemental Methods

Cohort constitution

A cohort of young and aged males was collected in collaboration with the Health Professional Department in Ksar Hellal Hospital (Monastir, Tunisia). A total of 283 subjects (male and female) divided into two groups, young (n=144 from 20 to 40 years old; (male n= 98; female n=46)) and aged (n=139, \geq 65 years old (male n=94; female n=45)) were recruited after a routine health checkup and were included in the study if free of any history of obesity, hypertension, dyslipidemia, diabetes mellitus, smoking or coronary artery diseases. In addition, subjects who had inflammatory diseases, valvular heart disease, cancers or rheumatoid arthritis were excluded. Heparinized plasma was collected after overnight fasting, centrifuged and stored at -80°C . TRX1 levels were determined using ELISA kit from International office IBL, Hamburg, Germany and TRX80 levels were determined using an ELISA kit developed in our laboratory.

Study approval

All patients provided written informed consent for the collection and storage of plasma aliquots and peripheral blood mononuclear cells consistent with the current study. The protocol was approved by the ethic committees of the hospital. The study was conducted in accordance with the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki and the International Conference on Harmonization Guidelines for Good Clinical Practice.

Specific Sandwich ELISA for TRX80

To measure levels of human TRX1, we used the commercial available ELISA kit from International office IBL, Hamburg, Germany. To measure levels of TRX80 in sera, a specific sandwich ELISA developed in our laboratory was used. 96-well plates were coated with 100 μl /well of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-TRX80 (IMCO, Sweden) in coating buffer (Bicarbonate/carbonate, 100 mM, pH 9.6) and incubated at

+4 °C overnight. The plates were washed four times with washing buffer (PBS-Tween20 0.05%, pH 7.4). Subsequently, to block unspecific protein binding sites, 200 µl/well of blocking solution (1% BSA in PBS-Tween20) was added and plates were incubated for 2h at room temperature. After washing four times, 100 µl/well of standard dilution of TRX80 (diluted in blocking solution) or samples were added in duplicates and incubated for 2h at room temperature. Thereafter, plates were washed four times and 100 µl/well of rabbit polyclonal anti-TRX (N-term) (ABIN356853, antibodies-online GmbH) were added at 2 µg/ml and incubated for 2 h at room temperature. Following washing four times, 100 µl/well of anti-rabbit IgG–peroxidase (A 6154, Sigma) were added and incubated for 1 h at room temperature. Subsequently, plates were washed six times and 150 µl/well of the substrate were added (1-Step™ ABTS, 37615-ThermoScientific). After 30 min of incubation, 100 µl of stop solution (1% SDS in PBS) were added to each well and the absorbance was measured at 405 nm by a microplate reader.

Colocalization of TRX80 and TNF- α on M1 macrophages in human atherosclerotic lesions.

Human atherosclerotic vessel specimens from 3 patients undergoing vascular surgery for atherosclerotic complications were formalin-fixed, paraffin-embedded, and 5 µm sections were prepared for immunohistochemical analysis. M2 macrophages were visualized with anti-CD206 (Sigma, 1/500), TRX80 was stained with an antibody that recognizes only the truncated form of thioredoxin (IMCO Corp, Sweden, 1/500). M1 macrophages were stained with anti-TNF- α antibody (Abcam, 1/250). In control samples, one of the first antibodies or both first antibodies were substituted with control IgG. For fluorescent immunostaining, Cy3- and Cy5-coupled secondary F(ab')₂ (Dianova) were used and visualized with Axioskop 2 plus fluorescence microscope (Carl Zeiss).

Measurement of ADAM-10 and ADAM-17 activities

Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were isolated from buffy-coats of healthy young and aged donors, using Ficoll gradient centrifugation. They were subsequently cultured in RPMI 1640 medium

containing gentamycin (10 µg/ml) (Sigma, France), glutamine (1%) (Invitrogen, France) and pooled human sera (10%) (Promo-Cell, Germany) at a density of 2×10^6 cells/well in 6-well Primaria-plastic culture dishes (Becton-Dickinson, France). After a week of culture, cells were washed and lysed in the CellLytic™ M reagent (Sigma) supplemented with a Protease Inhibitor Cocktail (Roche, France). The cell suspension was incubated on ice for at least 20 min and centrifuged for 10 min at 10,000 X g at 4°C. The supernatant was collected and used to assay ADAM-10 and ADAM-17 activities using respectively SensoLyte® 520 ADAM10 Activity Assay Kit *Fluorimetric* (Anaspec, France) and InnoZyme™ TACE Activity Kit (Merck, France).

Western blotting

PBMC were cultured, lysed and centrifuged as previously described. Proteins (20 µg/lane), evaluated using Pierce™ BCA Protein Assay Kit from Thermo Scientific, were separated on Criterion™ TGX™ Precast Gels 4-15% (Bio-Rad, France). After electroblotting onto PVDF Immobilon®-P Transfer Membrane (Millipore, France), the blot was blocked with 5% non-fat dry milk in Tris Buffered Saline (TBS) for 1 h and incubated overnight at 4°C with specific antibodies, ADAM-10 (1:500) and ADAM-17 (1:500) (NeoBiotech, France) in TBS containing 0.05% Tween® 20 (TBST). After three successive 15 min washes the blot was incubated 1 h with HRP conjugated secondary antibody (1:5000) (Sigma, France) in TBST. Detection of immune complexes was visualized using Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, France) onto an Image Captur LAS-3000 (Fujifilm).

Effects of TRX80 on angiogenesis

Capillary tube formation

Human Microvascular Endothelial Cells-1 (HMEC-1) (Dr. Candal, CDC Atlanta) were grown in MCDB 131 culture medium containing 10 % fetal calf serum (FCS). For capillary tube formation, cells were seeded (30,000 cells/well) on 24-multiwell plates coated with Matrigel (BD Biosciences) and incubated in

MCDB 131 culture medium supplemented with 0.1% FCS (negative control). Recombinant human TRX80 was added to each well at the indicated concentrations. Culture in 2.5% FCS was used as positive control. After 18 h incubation in a 5% CO₂ humidified incubator at 37°C, tubes and isolated cells were labeled with calcein AM (1 μmol/l) for 30 min, then observed using a fluorescence microscope (exc.496 nm/em.516 nm –Fluovert FU, Leica) and microphotographs were captured (10 different pictures per well). The number of capillary tubes (linked cells) was counted and reported to the total cell number, under the previously used conditions ¹.

Matrigel plug angiogenesis assays

The Matrigel plug angiogenesis assay in mice was used to investigate *in vivo* the pro-angiogenic effect of TRX80 ². The experimental animal protocol was approved by the University and INSERM Institutional Committee for animal experiments (Protocol No. 13-1048-1017). C57BL/6 mice (15 animals/group) were injected subcutaneously into the two flanks with 400 μl Matrigel (BD Biosciences) containing or not TRX80 under anaesthesia by inhaled isoflurane. After two weeks, mice were sacrificed (intraperitoneal injection of 150 mg/kg ketamin and 10 mg/kg xylazine, and cervical dislocation), the Matrigel plugs were removed and photographed.

Angiogenesis in the Matrigel plug was evaluated, as previously described ¹, by determining the hemoglobin content with Drabkin's reagent, after plug dissolution in Dispase, according to the manufacturer's protocol (BD Biosciences) and centrifugation (5 min., 13 000 rpm. at room temperature). The absorbance of the supernatants was measured at 540 nm, in 96-well plates, using a microplate reader Infinite M1000 PRO Tecan, and was normalized to the plug weight (OD/mg plug weight).

Isolation and treatment of Mouse Peritoneal Macrophages

Peritoneal macrophages were collected from 8-10 week-old C57Bl/6 mice by peritoneal lavage with 10 ml of phosphate-buffered saline, centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and cultured in RPMI 1640 medium

containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mmol L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (all from Bio Whittaker, France). Before each experiment, cells were placed in RPMI 1640 medium with 2% FBS for 16 h. Cells were left untreated or were treated with LPS (10 ng/ml, *E. coli*, serotype 055:B5, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), IL-4 (10 ng/ml) or recombinant human TRX1 (rhTRX1, 1 µg/mL) or rhTRX80 (1 µg/mL) (all from R&D Systems) or a combination thereof.

Plasma cytokines determination

Blood was collected into EDTA tubes from the retro-orbital sinus apoE.KO or apoE.KO/TRX0 transgenic mice. Plasma samples were separated by centrifugation at 630xg for 20 min at 4°C and frozen in 0.5 ml aliquots at -80°C until tested. For quantification of IL-6, IL-33 and MCP-1, we used the Millipore kit (reference MTH17MAG-47K-04) (Millipore, Billerica, MA, USA) according to the protocol described by the supplier. Briefly, 25 µl from each plasma sample were incubated with 25 µl of beads linked to specific antibodies. This mixture was incubated overnight at 4°C. Thereafter, 25 µl of biotinylated antibody was added for 1 h at room temperature. Finally, 25 µl of streptavidine-phycoerythrin were added for 30 min. Plates were washed twice and 150 µl of buffer and values were determined using a Luminex 200 Millipore apparatus and xPONENT 3.1 software (Millipore, Billerica, MA, USA).

Determination of anti-oxLDL antibodies

- Lipoprotein isolation

Human LDLs ($d=1.030-1.053$ g/ml) were isolated from freshly drawn blood from healthy normolipidemic volunteers as previously described, dialyzed against PBS supplemented with 0.01% EDTA to prevent oxidation, sterilized by filtration and stored at 4°C under nitrogen. The relative electrophoretic mobility of LDL was evaluated on Hydragel (Sebia, France).

- *Lipoprotein oxidation*

Prior to oxidation, EDTA was removed by extensive dialysis of the LDL solution against EDTA free PBS. Oxidation was initiated by incubation at 37°C with 5 µM CuSO₄ for 24 h. Oxidation was stopped by adding 20 µM EDTA. Native and oxLDL were screened for lipopolysaccharide (LPS) contamination by using a limulus amoebocyte lysate assay (Sigma). All the different LDL preparations used in this study contained less than 0.75 IU of LPS/ml. LDL contained 20 ± 4 nmol peroxides/mg protein and 0.163 nmol TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances)/mg protein, whereas oxLDL contained 215.2 ± 32.0 nmol peroxides/mg protein and 46 ± 4 nmol TBARS/mg protein.

Before each assay, 96-well microtitration plates were freshly coated with 100 µl of oxLDL (5 µg/ml) in PBS overnight at 4°C. The wells were blocked with 1% bovine serum albumin for 2 h at room temperature. A 100 µl aliquot of diluted sera (1:40) from each group of mice was added in quadruplicate wells and incubated for 2 h at room temperature. After three washes with PBS containing 0.1% Tween-20, a mixture of goat anti-mouse IgM and IgG conjugated with peroxidase (1:1000 dilution, Beckman-Coulter, Paris, France) was added to each well, and the incubation continued for 2 h at room temperature. Plates were washed again, and the alkaline peroxidase activity was determined using ortho-phenylenediamine dichloride (OPD, Sigma) as a substrate and detected at 492 nm.

TRX1 and TRX80 signal pathways

Murine peritoneal macrophages were isolated from C57Bl/6, cultured at 0.5 x 10⁶ cells/ml and untreated or treated with TRX1 (1 to 5 µg/ml) or TRX80 (1 to 5 µg/ml), PI3K inhibitor, Akt inhibitor, mTOR inhibitor, or a combination thereof. Expressions of macrophage M1 markers, MCP-1, TNF-α, IL-6 and IL-1β and macrophage M2 markers, IL-10 and CD204 were investigated at the transcription levels using real-time polymerase chain reaction (Supplemental Table 1). Phosphorylation of Akt, mTOR and 70S6K was performed using specific antibodies.

Effect of TRX80 on NLRP3 inflammasome activation in cultured peritoneal macrophages

Peritoneal macrophages were collected from 8-10 week-old C57Bl/6.Nlrp3^{+/+} or C57Bl/6.Nlrp3^{-/-} mice (kindly provided by Prof. Jürg Tschopp, Lausanne University, Switzerland) by peritoneal lavage with 10 ml of phosphate-buffered saline, centrifuged at 1000 rpm for 10 min, and cultured in RPMI 1640 medium containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mmol L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (all from BioWhittaker, France). The effect of TRX80 on NLRP3 inflammasome activity was evaluated by measuring the level of biological active IL-1β and IL-18 in the supernatants of activated macrophages using ELISA.

Transgenic mice generation

The human scavenger receptor (SR-A) promoter/enhancer was used to drive macrophage-specific expression of human TRX80 in mice. In the created transgenic line used in our work heterozygous mice had 50 copies of the TRX80 transgene per genome. Expression of human TRX80 was measured in peritoneal macrophages. For the study the effects of TRX80 transgene on development of atherosclerosis, the transgene was transferred onto an apoE-KO background by crossing the transgenic mice with apoE-KO mice, which were also on a C57Bl/6N genetic background (Jackson Lab, stock 2052).

Evaluation of mouse aortic lesions

The circulatory system was perfused with 0.9% NaCl by cardiac intraventricular canalization. Heart and descending aortas were excised and fixed. Hearts were cut directly under and parallel to the leaflet, and the upper portions were embedded in OCT medium. Sections of 7-µm thickness were prepared from the top of the left ventricle. The sections were stained for lipids with Oil-Red O and counterstained with Hematoxylin Harris. Ten sections, each separated by 100 µm, were used for specific morphometric evaluation of intimal lesions. In addition, the entire aortic tree was removed and cleaned of adventitia, split longitudinally to the iliac bifurcation, and pinned flat on a dissection pan for analysis by *en face*

preparation. Images were captured with a CAMIRIS video camera and the surface area covered by lesions was evaluated with ImageJ software.

Immunohistochemical analysis of mouse aortic lesions

Hearts were fixed and paraffin-embedded, and 5 μm sections were stained with rabbit polyclonal anti-TNF- α (SAB4502982, Sigma Aldrich), goat polyclonal anti-CD206 (sc-34577, Santa Cruz), rat monoclonal anti-F4/80 (ab6640, Abcam) at 200-fold dilution in a solution of PBS containing 0.2% TritonX-100 and 1% BSA, overnight at 4°C. After 3 rinses with PBS, the slices were incubated, 1 hour, with mixture of two secondary antibodies Alexa 488-conjugated against rabbit or goat and Alexa594-conjugated against rat (ThermoFisher Scientific). Each secondary antibody was diluted at 1/500 in a solution PBS containing 0.2% TritonX-100 and 1% BSA. The slices were washed 3 times and incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of DAPI (D9542, Sigma Aldrich) for 1min. After 3 rinses with PBS, the slices were mounted coverslip with Fluoroshield (F6182, Sigma Aldrich). The images were acquired using Leica DMi8 microscope.

Supplemental Results

Both Trx-1 and Trx-80 activate Akt

Trx-1 and Trx-80 up-regulated Akt activation in non-treated macrophages (Supplemental Figure 5), as demonstrated by an *in vitro* kinase assay performed on total cellular extracts after exposure to Trx-1 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or Trx-80 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 15 min. These data were confirmed through Western blot, by the increased level of the activated form of pAkt. The Trx-1 did not dampen the down-regulation of Akt activity by LY294002 as Trx-80 did. When cells primed with either IL-4 (15 ng/ml) or LPS (100 ng/ml), treatment with Trx-1 or Trx-80 did not show any further activation of Akt. This may explain that they could activate different isoforms of Akt.

Trx-80, but not Trx-1, activates mTOR

To determine which isoform has been activated by Trx-1 and Trx-80, a specific inhibitor, Akt1/2 kinase inhibitor (A6730 SIGMA), has been used. It shows IC₅₀ = 58 nM, 210 nM, and 2.12 mM for Akt1, Akt2, and Akt3, respectively. Accordingly, either Akt1 or Akt2 has been inhibited then the cells were treated with different concentrations (0, 1, 2, and 5 µg/ml) of Trx-1 or Trx-80 for 15 min. As shown in Supplemental Figure II, hrTrx-80 significantly activated mTOR in a dose-dependent manner only when Akt1 is inhibited whereas Trx-1 did not activate it (Supplemental Figure 6).

Inhibition of mTOR downregulated the expression of inflammatory cytokines

To further explore the role of mTOR in macrophage polarization, isolated murine peritoneal macrophages were pretreated with or without rapamycin (20 nM) for 6 hrs and/or exposed to LPS (100 ng/ml) and/or hrTrx-80 (1 µg/ml) stimulation. As shown in Supplemental Figure 7, rapamycin (RAPA) attenuated the expression of inflammatory cytokines, IL-6 (A), IL-1β (B), and TNF-α (C) revealing the role of mTOR signaling in macrophage phenotype orientation. Interestingly, Trx-80 upregulated the expression of these cytokines may be through reactivating mTOR pathway.

Trx-80 activates mTOR in dose-dependent manner

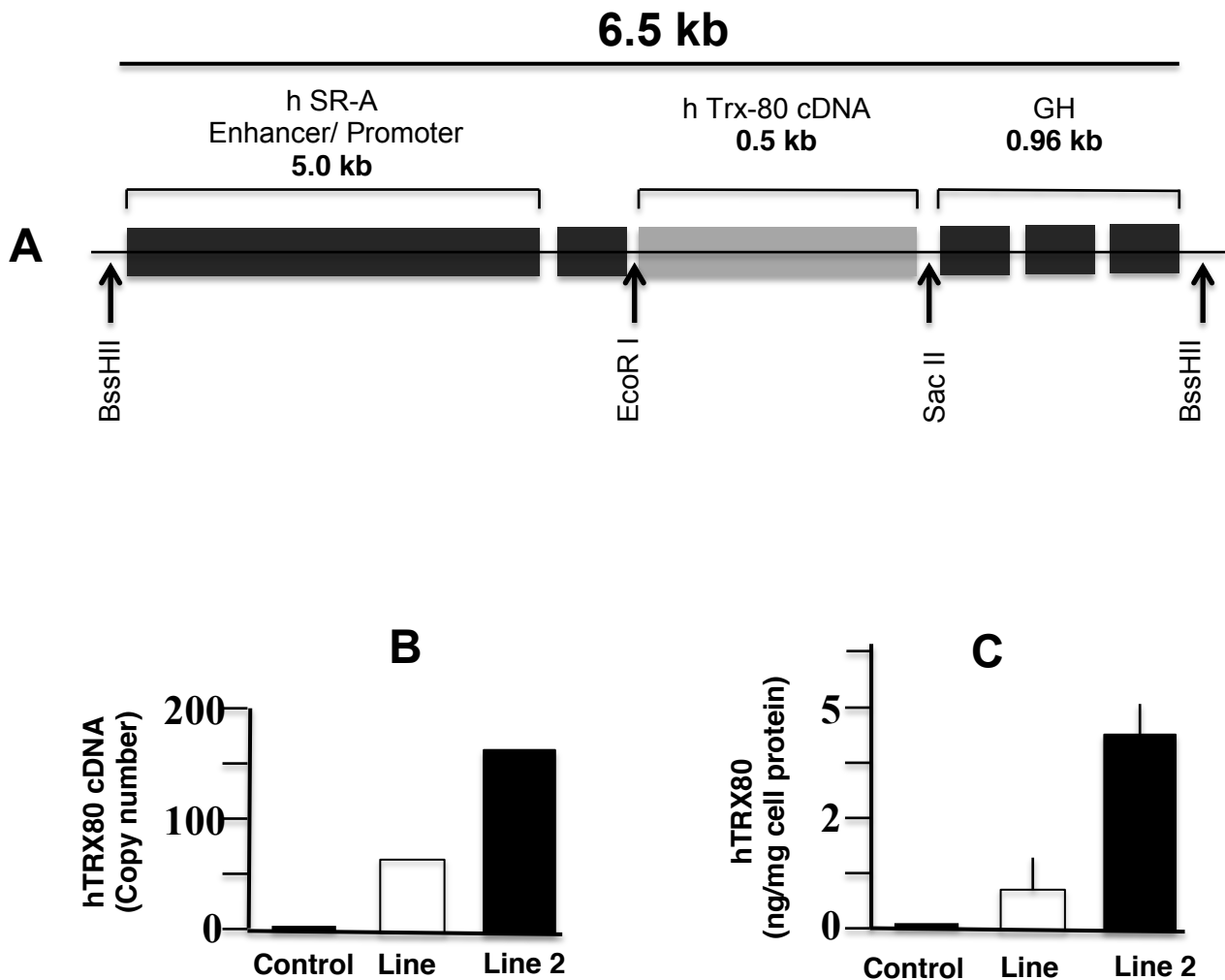
The p70S6K (Thr389) is known to be a convincing direct substrate of mTORC1. It is often used as functional readout of mTORC1 activity, as phosphorylation of these sites by mTORC1 has been confirmed both *in vitro* and *in vivo* and is inhibited by rapamycin treatment. Therefore, to confirm our previous results, murine peritoneal macrophages have been pretreated with RAPA (20 nM) for 1 hr followed by exposure to different concentrations of hrTrx-80 for 30 min. Results of Western blot analysis using phospho-P70S6K and p70S6K specific antibodies showed that Trx-80 activates mTOR in a dose-dependent manner (Supplemental Figure 8).

mTOR inhibition orients resting macrophages toward M2 phenotypes

Freshly isolated murine peritoneal macrophages were pretreated with or without rapamycin (20 nM) for 6 hrs and/or exposed to IL-4 (15 ng/ml) and/or hrTrx80 (1 µg/ml) stimulation. As shown in Supplemental Figure 9, rapamycin (RAPA) stimulated the expression of anti-inflammatory cytokines, IL-10 (A) and CD206 (B) indicating the implication of mTOR signaling in macrophage polarization. Of note, Trx-80 treatment attenuated the expression of these cytokines may be through reactivating mTOR.

Supplemental Table 1. Mouse sequences of primers used for qPCR analysis

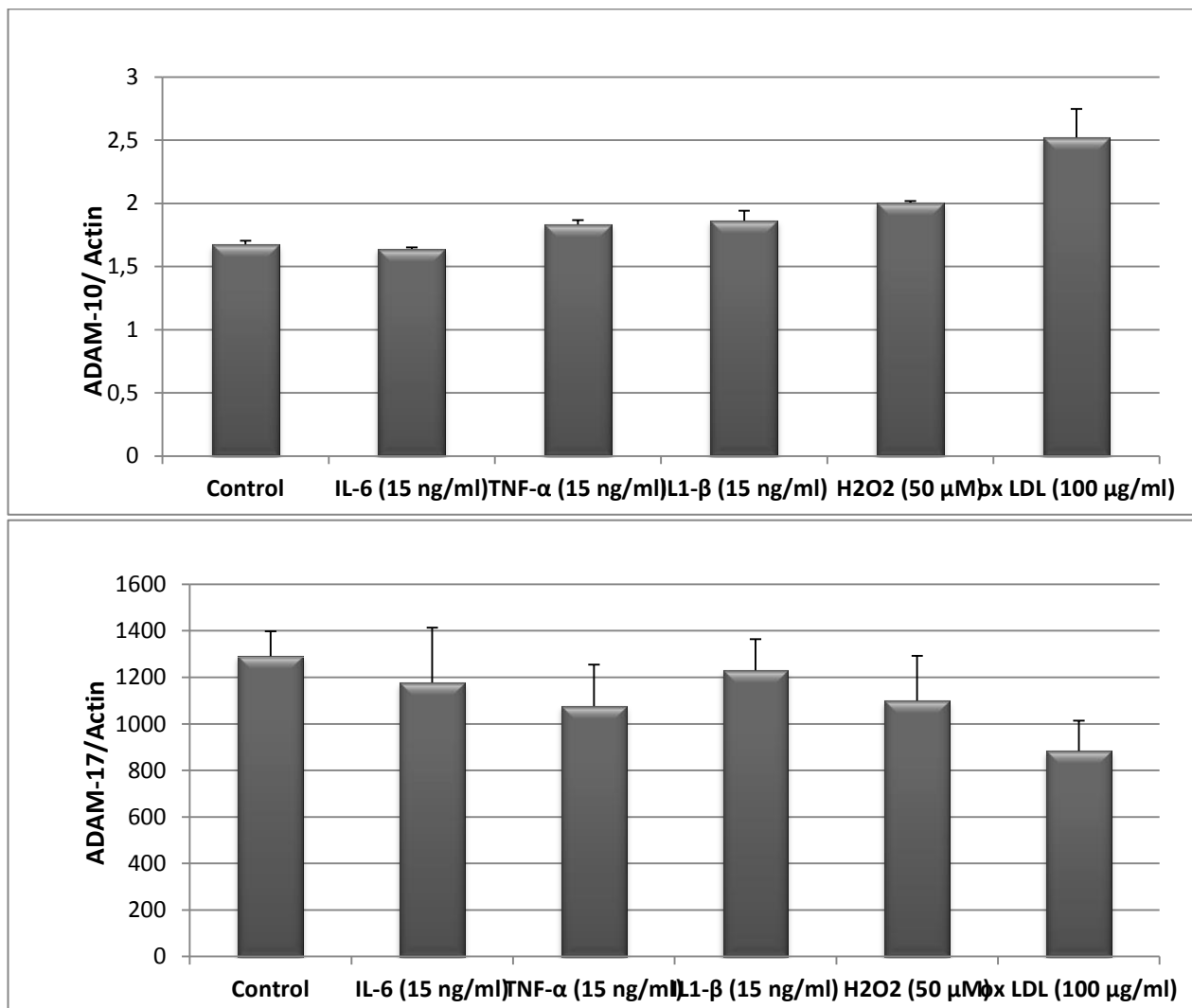
IL-6	Forwards Reverse	5'-ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3' 5'-TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT-3'
CD206	Forwards Reverse	5'-TGGGCACAGGAGACCCAACTTT-3' 5'-GCAGTGGCATTGATGCTGCTGTTA-3'
TNF- α	Forwards Reverse	5'-AATGGCCTCCCTCTCATCAGTT-3' 5'-CCACTTGGTGGTTTGCTACGA-3'
MCP-1	Forwards Reverse	5'-TCACCTGCTGCTACTCATTACCA-3' 5'-TACAGCTTCTTTGGGACACCTGCT-3'
Il-1 β	Forwards Reverse	5'-AAGGGCTGCTTCCAAACCTTTGAC-3' 5'-ATACTGCCTGCCTGAAGCTTGT-3'
IL-10	Forwards Reverse	5'-GCTCTTGCACTACCAAAGCCACAA-3' 5'-AGTAAGAGCAGGCAGCATAGCAGT-3'
GAPDH	Forwards Reverse	5'-TCAACGCACAGTCAAGG-3' 5'-ACTCCACGACATACTCAGC-3'



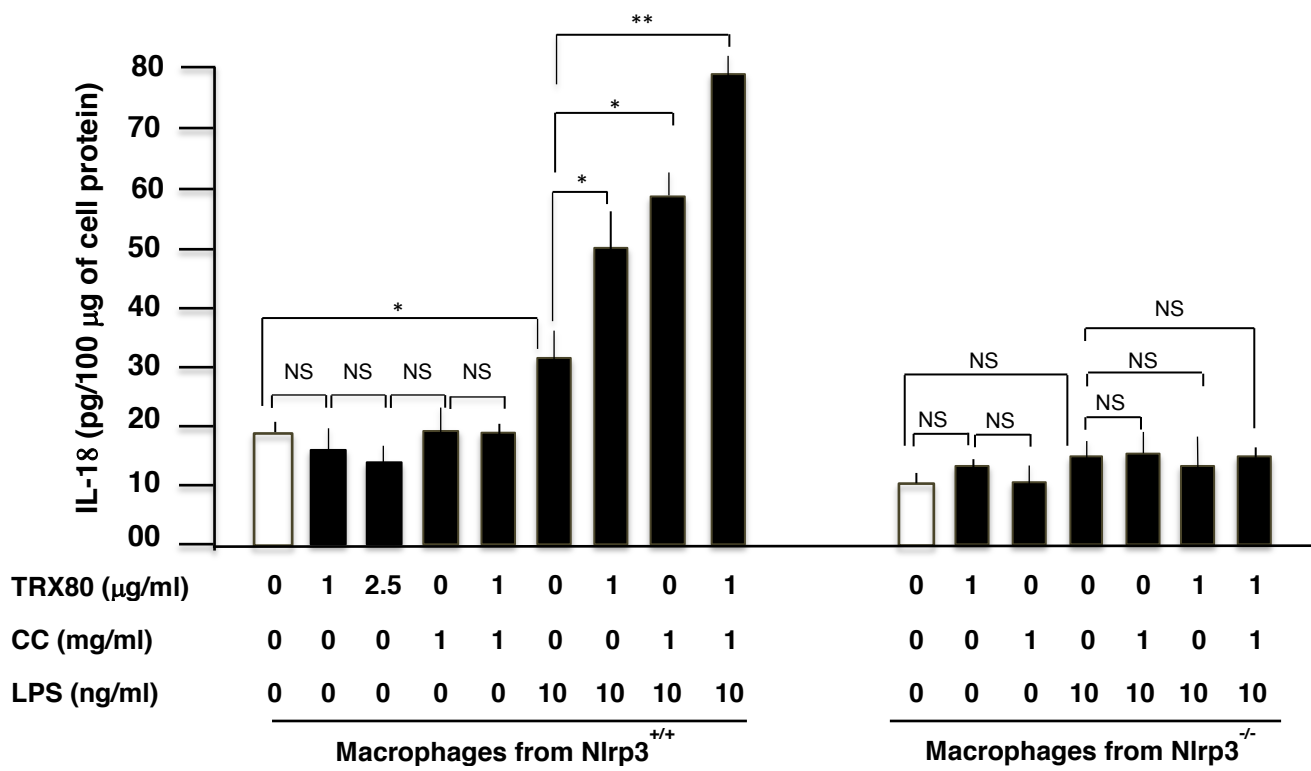
Supplemental Figure 1 - Transgene construction and transgenic mice generation.

A-The human scavenger receptor (SR-A) promoter/enhancer was used to drive macrophage-specific expression of human TRX80 in mice. The plasmid pAL1 containing the SR-A promoter/enhancer and all the necessary elements for chimeric transgene construction (poly linker region and heterologous intron) was obtained from Christopher Glass (UCSD, La Jolla, California, USA). Full-length human TRX80 cDNA (~0.5 kb) with an in frame stop codon was cloned into the EcoRI and the SacII sites in the poly-linker region of the plasmid pAL1. The sequence of the chimeric transgene was confirmed by sequencing. The SRA-TRX80 chimeric transgene of 6.5 kb was separated from the vector sequence by digestion with BssHII, following agarose gel electrophoresis, the fragment was purified through CsCl gradient ultracentrifugation, dialyzed against 10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4 buffer and microinjected into the pronuclei of fertilized mouse eggs obtained from superovulated female mice which had C57Bl/6N genetic background (Jackson Lab, stock 0664). The injected eggs were surgically transferred to oviducts of surrogate females. Two different methods were used for genotyping the transgenic mice: usual end-point PCR with forward primer 5'-CCATTTCCATCGGTCCTTAC-3' located in Exon 1 and reverse primer 5'-GTGGCTGAGAAGTCAACTAC-3' located in Exon2 of human *TRX* gene; and real-time PCR with TaqMan assay (Thermo Scientific, assay No. Hs00828652_m1).

B-Two transgenic lines were established. In heterozygous condition one line had ~20 copies/genome; second line had ~50 copies/genome. Because expression of TRX80 in peritoneal macrophages was significantly higher in second line all following work was done only on this line (with 50 and 100 copies/genome in, respectively, heterozygous and homozygous conditions). C- Mice were injected intraperitoneally with 4% thioglycollate solution, and macrophages were harvested 4 days later by lavage of the peritoneal cavity. The peritoneal macrophages were suspended in RPMI containing 10% fetal bovine serum. Human TRX80 was determined in the supernatant using specific ELISA Kit as described earlier

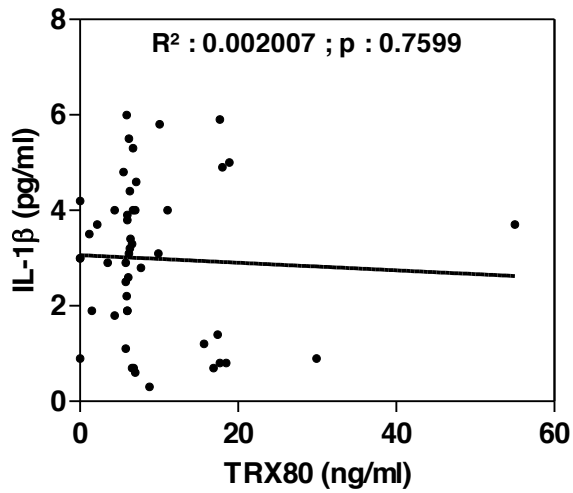


Supplemental Figure 2 - Effect of inflammatory cytokines, H₂O₂ and OxLDL on ADAM-10 and ADAM-17 expression in cultured peritoneal macrophages. The Cells were purified and cultured at 0.5x10⁶ cells/ml. Thereafter, they were incubated with IL-6 (15 ng/ml), TNF-α (15 ng/ml), IL-1β (15 ng/ml), H₂O₂ (50 μM) and oxLDL (100 μg/ml) for 24 h at 37°C. The cells were then washed, lysed and 35 μg protein were loaded into each well of SDS-PAGE gradient (Long Shelf life Precast Gels (Any KD™)). Following transfer, each nitrocellulose membrane was incubated with specific ADAM-10 (1/1000) or ADAM-17 (1/1000). The specific bands were scanned. Each membrane was stripped and re-hybridized with specific βactin antibody (1/10000) for normalisation. The results are presented as the ratio of ADAM-10 /β-actin or ADAM-17/β-actin. No significant effect, using Mann-Whitney test, was observed for each condition vs the control.

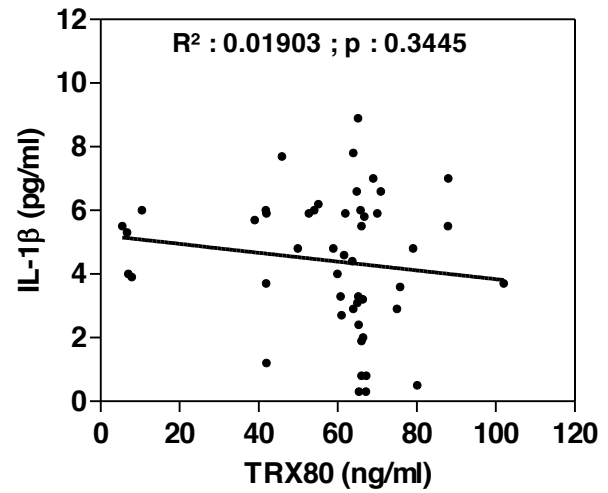


Supplemental Figure 3 - Effect of TRX80 on inflammasome NLRP3 activation and IL-18 production. Peritoneal macrophages were purified and cultured at 0.5×10^6 cells/ml. The cells were incubated with hrTRX80 in the absence or presence of either CC (1 mg/ml) or LPS (10 ng/ml) or both. Data are presented as mean \pm SD of IL-18 (pg/100 μ g cell protein) of three independent experiments performed in duplicate. Statistically significant differences are indicated (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; Mann-Whitney test and ANOVA for multiple comparisons).

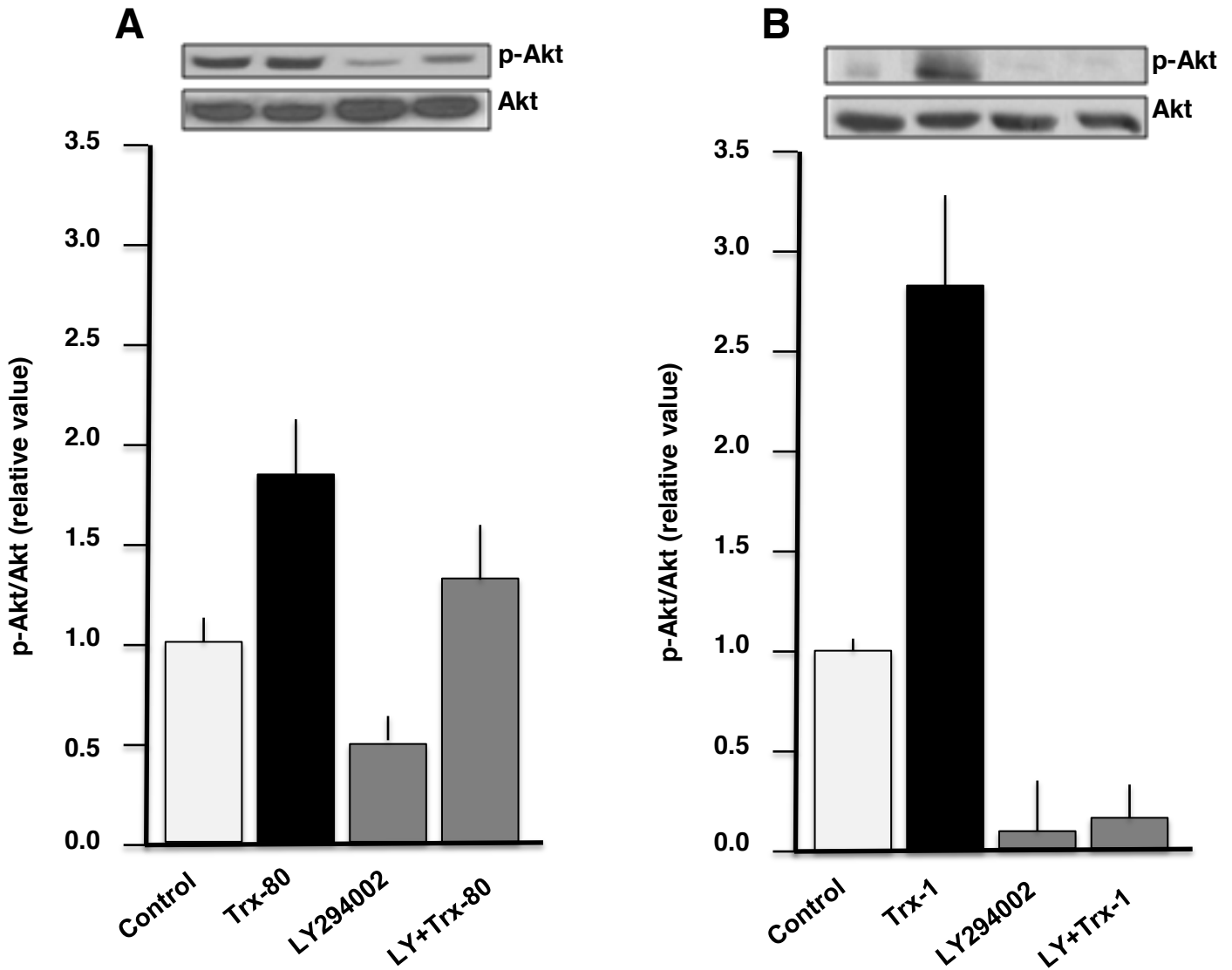
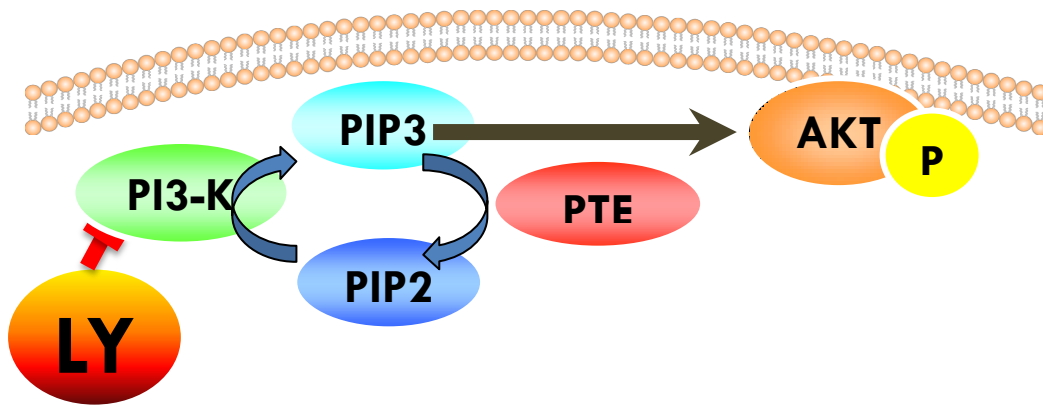
A (Young)



B (Aged)

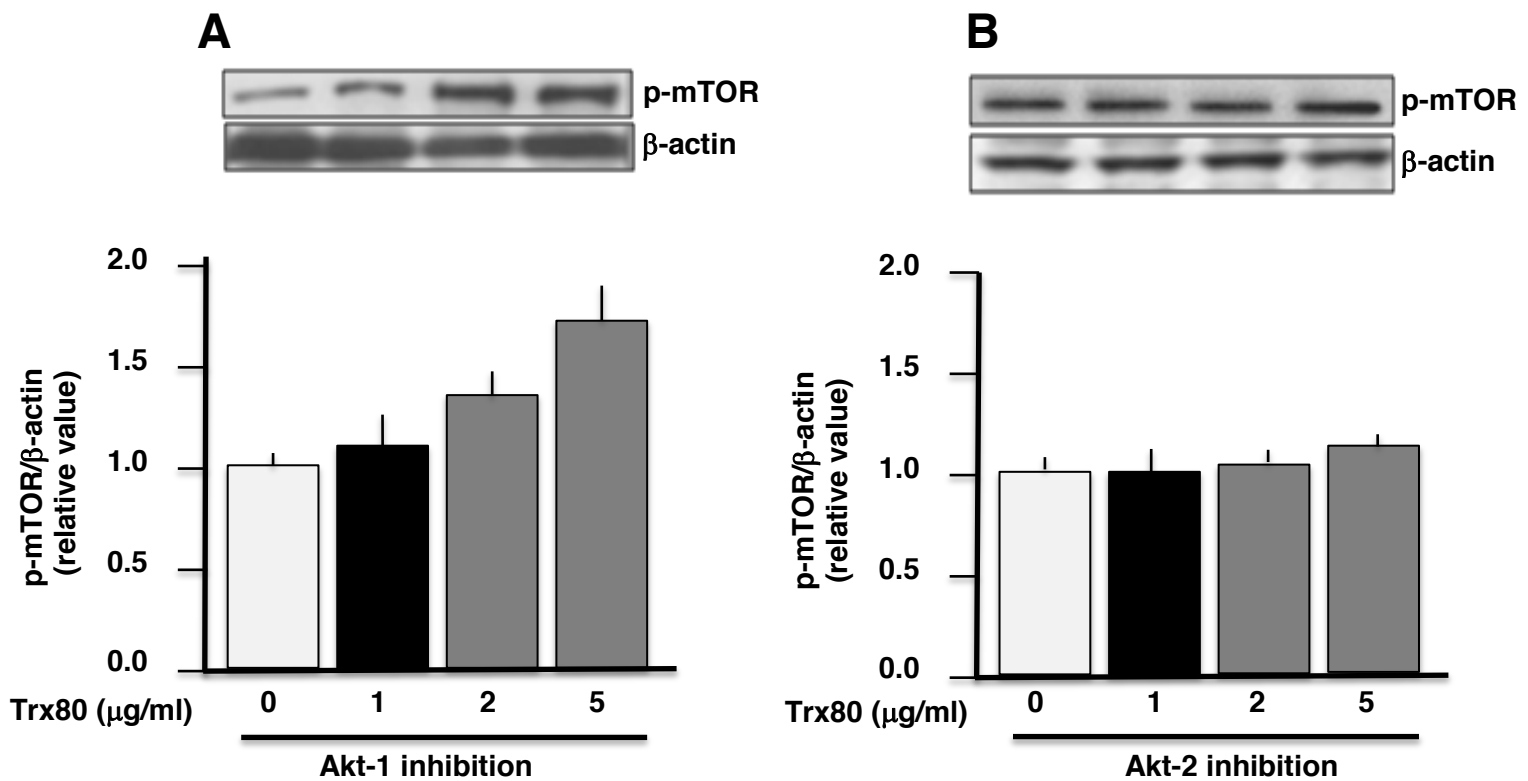
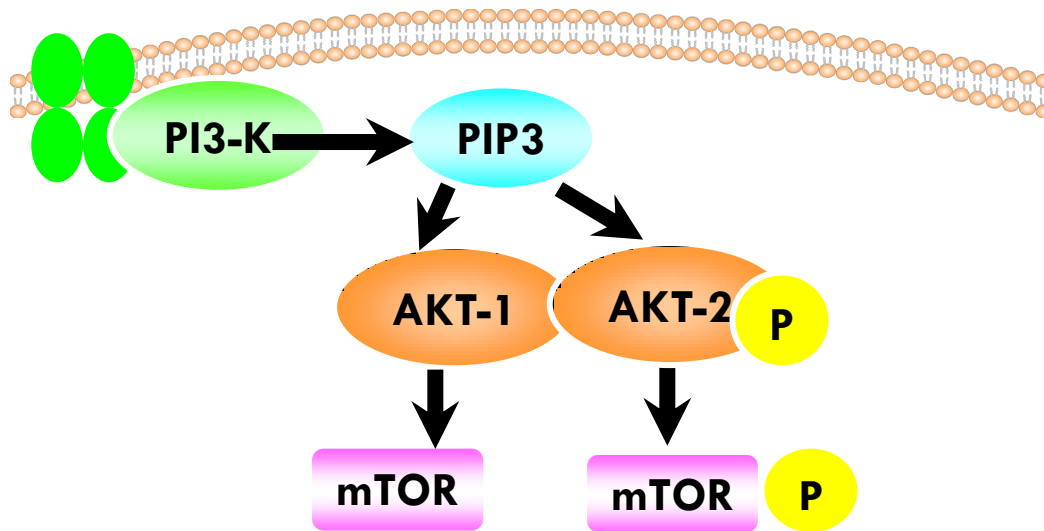


Supplemental Figure 4 - Correlation between TRX80 and IL-1 β levels in plasmas of young and aged subjects. Plasma levels of TRX80 and IL-1 β in young (A) and aged (B) male were determined using ELISA approach as described in the method section. No correlation was observed.



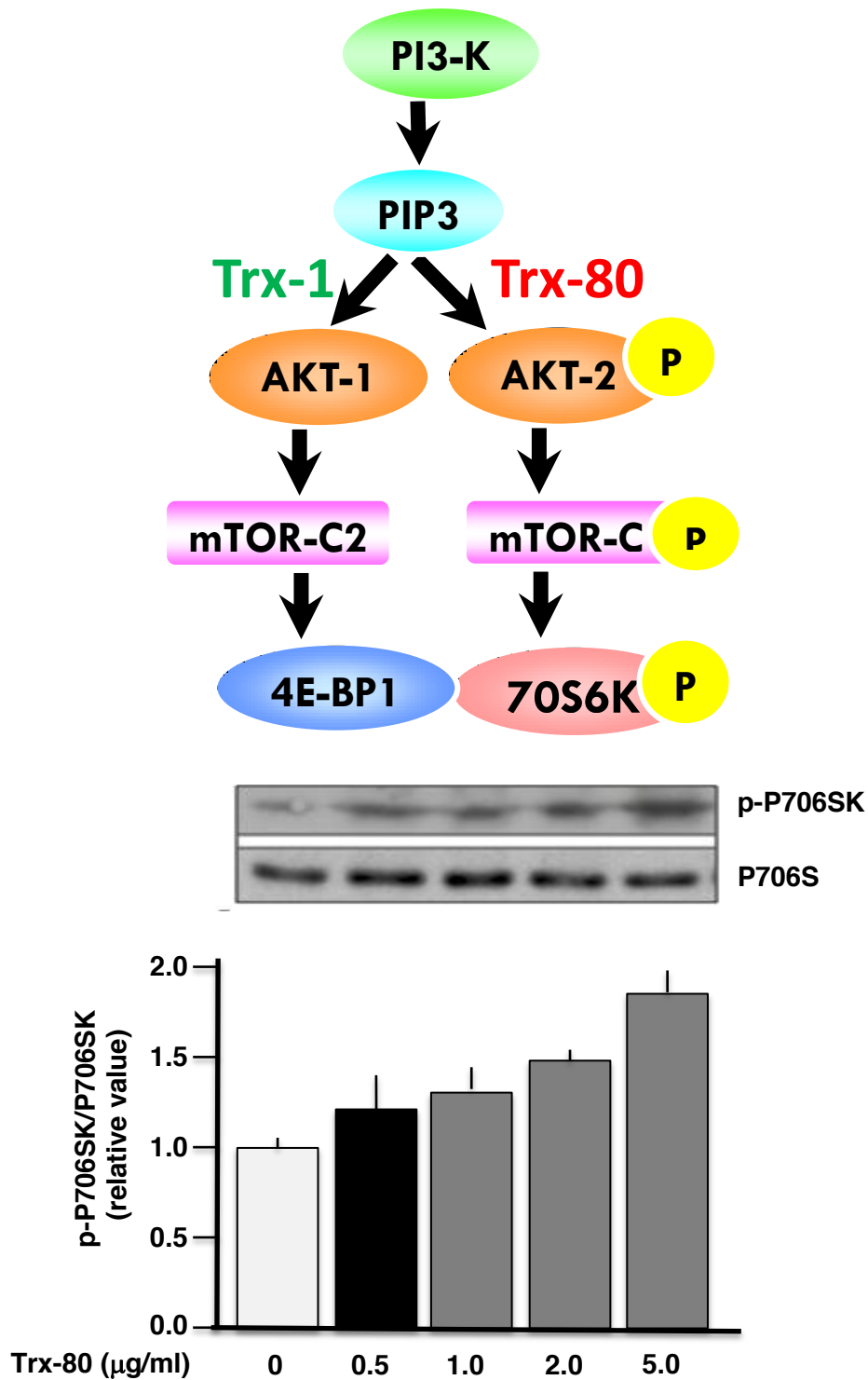
Supplemental Figure 5 - Both Trx-1 and Trx-80 activate Akt

Isolated murine peritoneal macrophages were preincubated with LY294002 (50 μ M) for 1h prior to the stimulation by either Trx-80 (1 μ g/ml) (A) or Trx-1 (1 μ g/ml) (B) for 15 min. Cell lysates were used in western blotting and probed for Akt (Ser473) phosphorylation and total Akt as well. The relative amounts of pAkt/Akt were quantified and normalized to an untreated control. Data are presented as mean \pm SEM of three independent Western immunoblots.



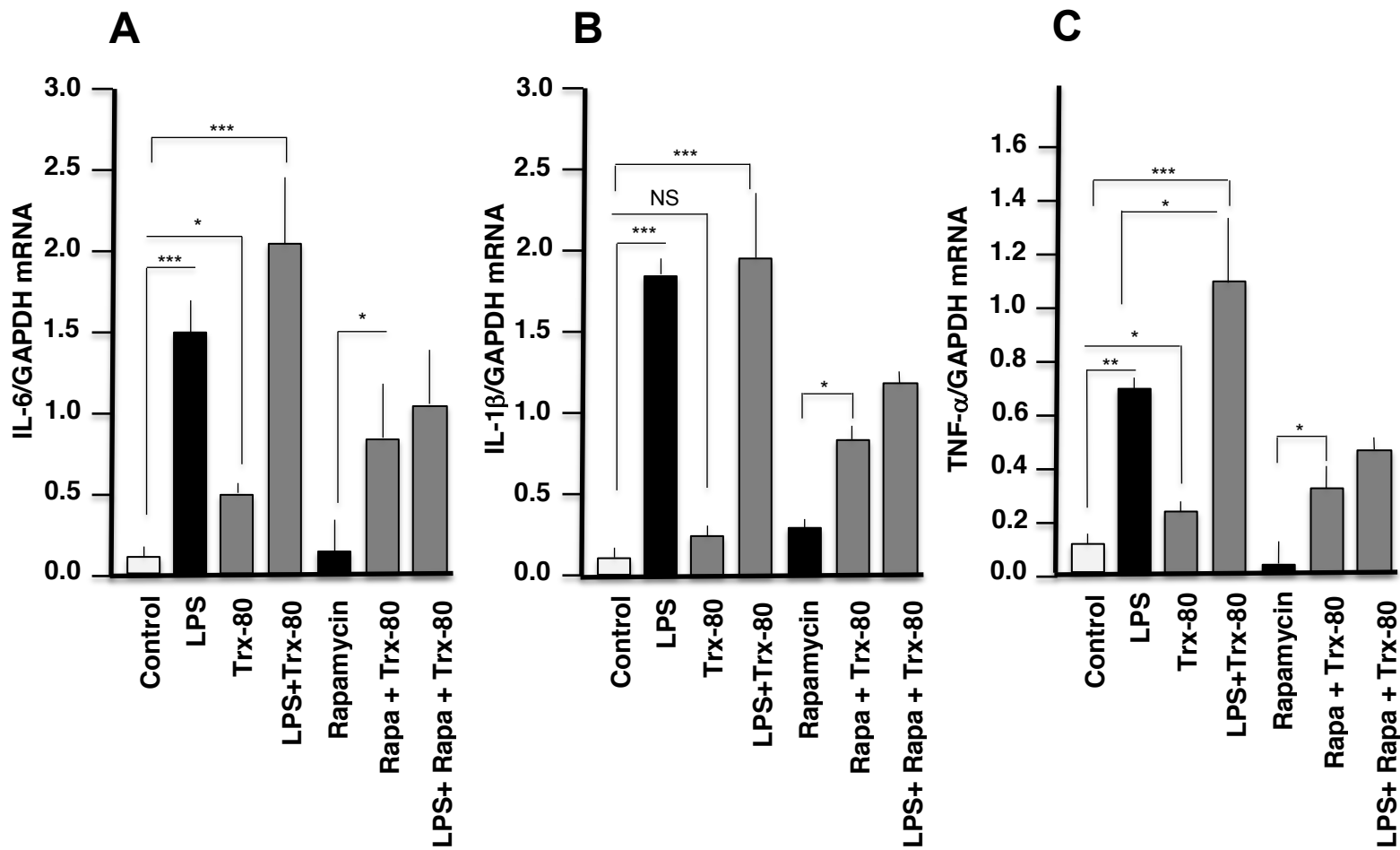
Supplemental Figure 6 - Trx-80 significantly activates mTOR in a dose-dependent manner only when Akt-1 is inhibited.

Prior to the stimulation of murine macrophages with different concentrations of Trx80 (0, 1, 2, and 5 μg/ml), either Akt1 (A) or Akt2 (B) has been inhibited specifically for 24 hrs with Akt1/2 inhibitor using 58 nM or 210 nM, respectively. Protein lysates were prepared and subjected to an immunoblot analysis with specific antibody against p-mTOR (Ser2448). The relative amounts of p-mTOR/β-actin were quantified and normalized to an untreated control. Data are presented as mean ± SEM of three independent Western immunoblots.

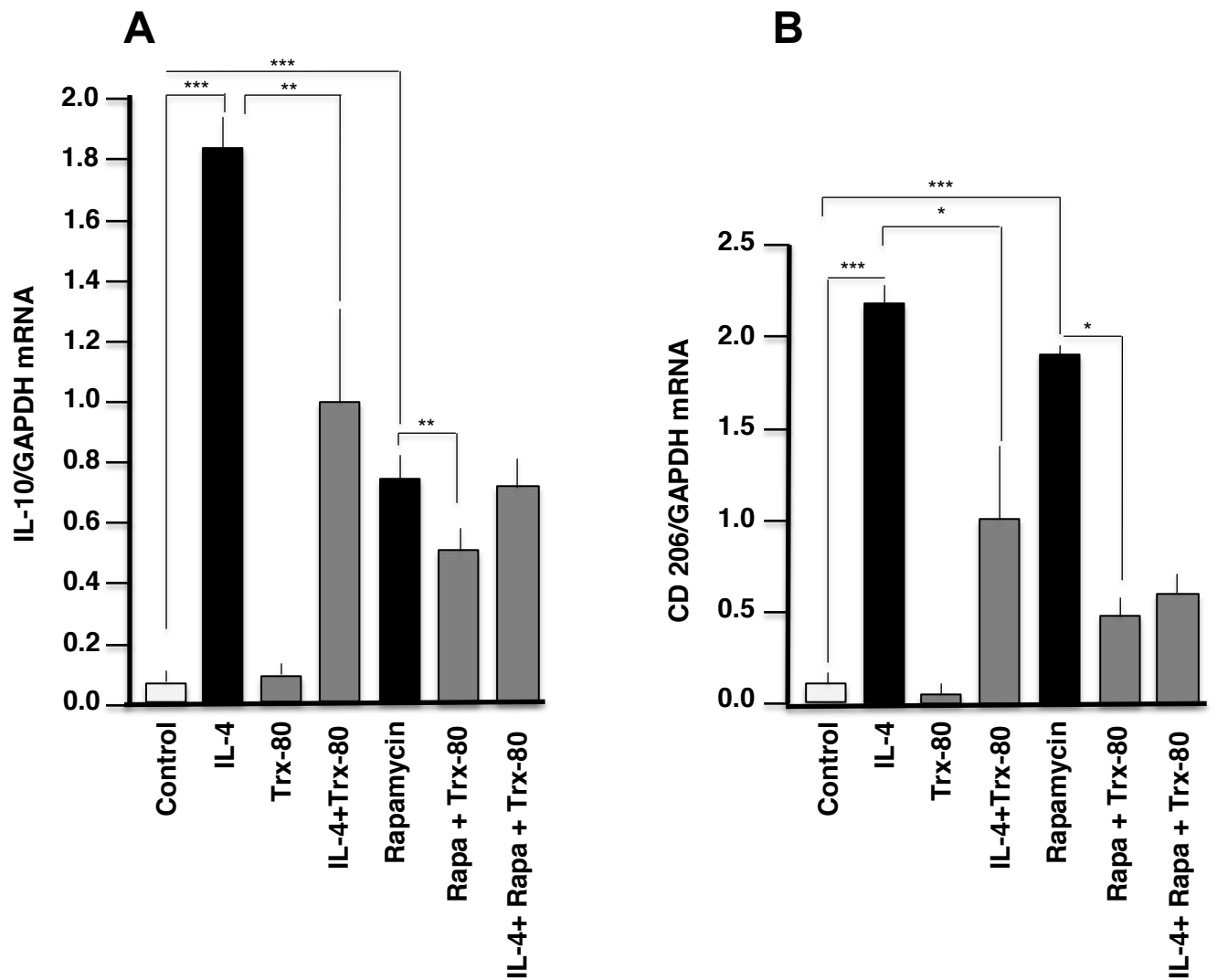


Supplemental Figure 7 - Trx-80 activates mTOR in a dose-dependent manner.

Murine peritoneal macrophages have been pretreated with RAPA (20 nM) for 1 hr followed by stimulation with different concentrations (0, 0.5, 1, and 5 µg/ml) of hrTrx-80 for 30 min. Results represent quantification of Western blots of phosphorylated p70S6K normalized to total p70S6K. Data are expressed as mean ± SEM of relative values for three independent experiments.

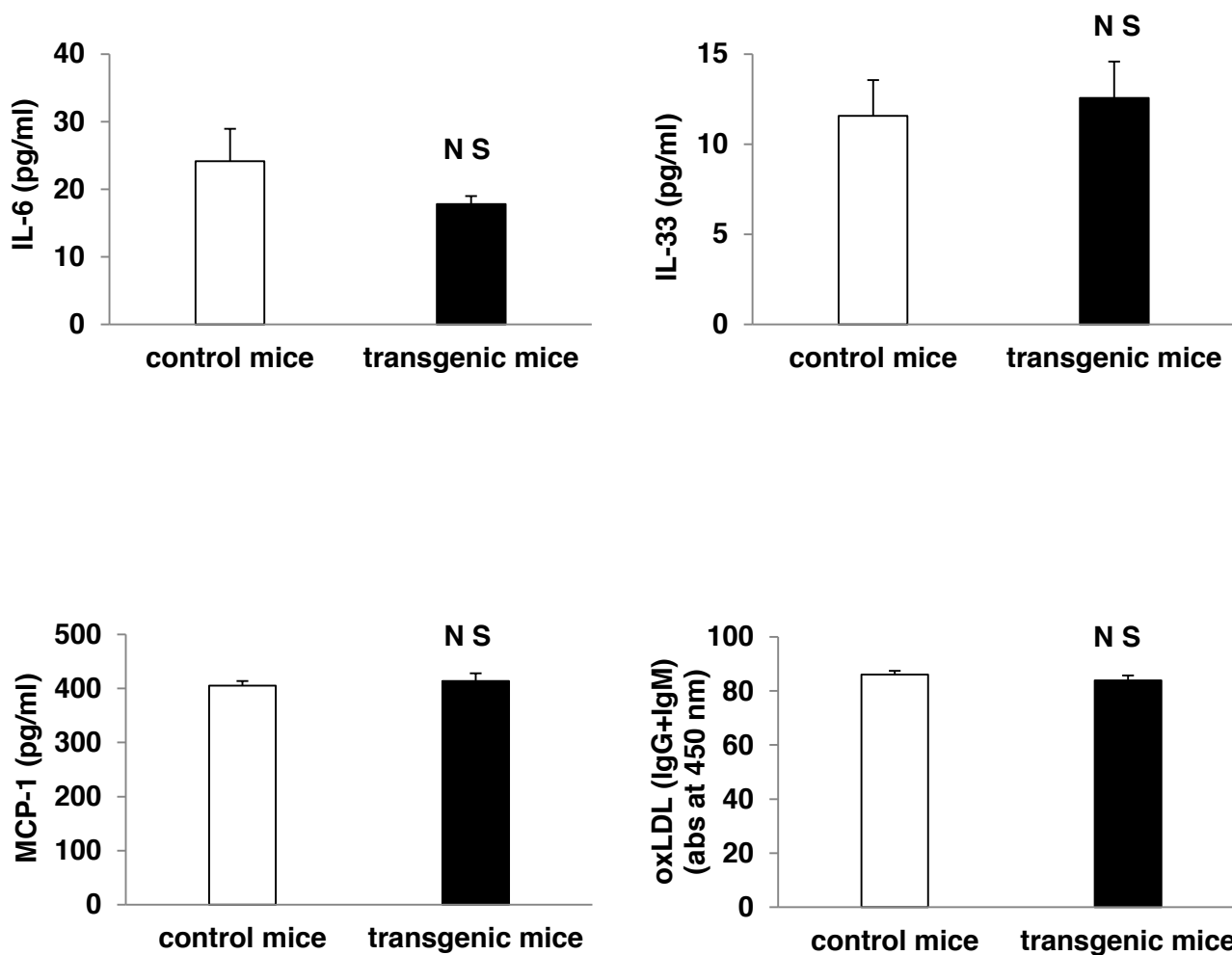


Supplemental Figure 8 - mTOR inhibition attenuated the expression of inflammatory cytokines. Murine peritoneal macrophages have been pretreated with or without rapamycin (20 nM) for 6 hrs then they were stimulated with or without LPS (100 ng/ml) and/or hrTrx-80 (1 μ g/ml) for 18 hrs. The level of gene expression of IL-6 (A), IL-1 β (B), and TNF- α (C) were quantified with real-time PCR and normalized to GAPDH. Data are expressed as mean \pm SEM of relative expression for three independent experiments. Statistical significance (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; Mann-Whitney test).



Supplemental Figure 9 - mTOR inhibition upregulates M2 phenotype markers.

Murine peritoneal macrophages have been pretreated with or without rapamycin (20 nM) for 6 hrs and they were stimulated with or without LPS (100 ng/ml) and/or hrTrx-80 (1 μ g/ml) for the indicated period. The mRNA levels of IL-10 (A) and CD206 (B) were quantified with qPCR and normalized to GAPDH. Data are expressed as mean \pm SEM of relative expression for three independent experiments. Statistical significance (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001; Mann-Whitney test).



Supplemental Figure 10 - Plasma levels of IL-6, IL-33, MCP-1 and antibodies (IgG + IgM) against oxLDL in control and TRX80 transgenic mice.

Blood was collected into EDTA tubes from the retro-orbital sinus apoE.KO (n=9) or apoE.KO/TRX0 transgenic mice (n=8). Plasma samples were separated by centrifugation at 630xg for 20 min at 4°C. For quantification of IL-6, IL-33 and MCP-1, we used the Millipore kit. Briefly, 25 µl from each plasma sample were incubated with 25 µl of beads linked to specific antibodies. This mixture was incubated overnight at 4°C. Thereafter, 25 µl of biotinylated antibody was added for 1 h at room temperature. Finally, 25 µl of streptavidine-phycoerythrine were added for 30 min. Plates were washed twice and 150 µl of buffer and values were determined using a Luminex 200 Millipore apparatus and xPONENT 3.1 software.

For the quantification of IgG and IgM against oxLDL, 96-well microtitration plates were freshly coated with 100 µl of oxLDL (5 µg/ml) in PBS overnight at 4°C. The wells were blocked with 1% bovine serum albumin for 2 h at room temperature. A 100 µl aliquot of diluted sera (1:40) from each group of mice was added in quadruplicate wells and incubated for 2 h at room temperature. After three washes with PBS containing 0.1% Tween-20, a mixture of goat anti-mouse IgM and IgG conjugated with peroxidase (1:1000) was added to each well, and the incubation continued for 2 h at room temperature. Plates were washed again, and the alkaline peroxidase activity was determined using ortho-phenylenediamine dichloride as a substrate and detected at 492 nm. The data are presented as mean ± SD; Statistical analyses, using the t-test, are indicated; NS (not significant).

Supplemental References

1. Camare C, Trayssac M, Garmy-Susini B, Mucher E, Sabbadini R, Salvayre R, Negre-Salvayre A. Oxidized LDL-induced angiogenesis involves sphingosine 1-phosphate: prevention by anti-S1P antibody. *Br J Pharmacol.* 2015;172:106-118.
2. Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR. A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Lab Invest.* 1992;67:519-528.

Résumé

Les maladies cardiovasculaires (MCV), résultant de complications de l'athérosclérose, constituent la première cause de mortalité dans le monde. L'athérosclérose, maladie inflammatoire chronique, implique à la fois les systèmes immunitaires inné et adaptatif. Les macrophages jouent un rôle majeur dans l'initiation de la lésion, sa progression et dans les complications thrombotiques. Un grand nombre de données rapporte l'implication du stress oxydatif, conséquence d'un déséquilibre entre antioxydants et espèces réactives de l'oxygène (ROS), dans les MCV. En outre, ces pathologies sont fréquemment associées à des changements dynamiques de l'activation des macrophages, soit vers le phénotype pro-inflammatoire M1 (activation classique), soit vers le phénotype anti-inflammatoire M2 (activation alternative).

La Thiorédoxine-1 (Trx-1), protéine ubiquitaire, joue un rôle majeur dans le maintien de l'équilibre redox et également impliquée dans le métabolisme énergétique, les réponses inflammatoires, la croissance cellulaire et la survie. La Trx-1 possède des propriétés anti-inflammatoires et anti athérogènes faisant d'elle une protéine de choix pour lutter contre les effets délétères des ROS et des agents pro-inflammatoires. La Trx-1 peut être clivée, dans des conditions non encore bien élucidées, pour générer une forme tronquée, la Trx-80, pro-inflammatoire et dépourvue d'effet antioxydant. Malgré ses multiples effets bénéfiques, le clivage potentiel de la Trx-1 empêche son utilisation en thérapie chez l'Homme. L'objectif de ma thèse consiste à faire émerger une nouvelle approche thérapeutique à la fois anti-inflammatoire et antioxydante, basée sur l'utilisation de peptides mimétiques de la Trx-1 (TxMP).

Nous avons ciblé le site catalytique, fondamental pour les interactions spécifiques de la Trx-1 avec ses partenaires cellulaires, pour la conception et la synthèse d'un peptide de 3 acides aminés, le CB3. Nos principaux résultats obtenus *in vitro* sur des cultures primaires de macrophages humains ou de macrophages péritonéaux murins, dans des conditions pro-oxydantes, ont clairement montré les effets antioxydants du CB3. Les macrophages de phénotype M1, induit par le lipopolysaccharide (LPS), sont réorientés vers un phénotype M2 anti-inflammatoire sous l'effet du peptide. Cet effet anti-inflammatoire passe au moins en partie par l'inhibition de la voie de signalisation NF- κ B. La validation fonctionnelle des CB3 *in vivo* pour son pouvoir thérapeutique a été réalisée chez les souris ApoE2.Ki, développant l'athérosclérose sous régime alimentaire riche en graisses. Nous avons clairement montré que l'injection intrapéritonéale du CB3 (10 μ g/g/j) diminue les marqueurs oxydatifs (anticorps anti-LDLox) et inflammatoires (TNF- α , MCP-1, IL-33) circulants. Au niveau de la paroi aortique nous avons décrit une diminution de la taille de la lésion, une diminution du nombre des macrophages M1 inflammatoires, une augmentation du nombre des macrophages M2 anti-inflammatoires et une diminution de l'expression du TNF- α .

La mise en place et la validation de cette approche, très prometteuse, trouvera un champ d'application thérapeutique et appliquée très large dans le domaine des maladies inflammatoires et particulièrement l'athérosclérose.