



HAL
open science

Régulation de la VE-Cadhérine dans les conséquences vasculaires du Syndrome d'Apnées du Sommeil

Anne Briançon-Marjollet

► **To cite this version:**

Anne Briançon-Marjollet. Régulation de la VE-Cadhérine dans les conséquences vasculaires du Syndrome d'Apnées du Sommeil. Physiologie [q-bio.TO]. Université Grenoble Alpes (2016-2019), 2019. tel-03418984

HAL Id: tel-03418984

<https://hal.univ-grenoble-alpes.fr/tel-03418984v1>

Submitted on 8 Nov 2021

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.

Habilitation à diriger des recherches

REGULATION DE LA VE-CADHERINE DANS LES CONSEQUENCES VASCULAIRES DU SYNDROME D'APNEES DU SOMMEIL

Présentée par Anne BRIANCON-MARJOLLET

Maître de conférences
Laboratoire HP2
Université Grenoble Alpes
Directeur: Pr Jean-Louis Pépin

Soutenue le 8 Octobre 2019 devant le jury composé de :

Muriel Laffargue	Directrice de recherche INSERM, Toulouse	Rapporteur, Présidente
Carmen Martinez	Directrice de Recherche CNRS, Angers	Rapporteur
Roger Marthan	PU-PH, Université Bordeaux	Rapporteur
Laurent Loufrani	Directeur de Recherche INSERM, Angers	Examineur
Isabelle Vilgrain	Directrice de Recherche INSERM, Grenoble	Examinatrice
Jean-Louis Pépin	PU-PH, Grenoble	Invité

SOMMAIRE

Sommaire.....	2
Remerciements.....	4
Liste des abréviations.....	6
Liste des tableaux et figures.....	7
I- CURRICULUM VITAE.....	8
1. FORMATION UNIVERSITAIRE.....	9
2. FORMATION CONTINUE.....	10
3. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT ET DE PEDAGOGIE.....	11
3.1. Enseignement.....	11
3.2. Activités et responsabilités pédagogiques.....	13
3.3. Participation à des conférences de pédagogie.....	14
3.4. Financements pour la pédagogie.....	14
4. TRAVAUX DE RECHERCHE.....	15
4.1. Expérience professionnelle.....	15
4.2 Publications.....	16
4.3 Encadrement.....	19
4.4 Financements.....	20
4.5 Congrès scientifiques.....	21
4.6 Bourses et prix.....	23
4.7 Diffusion scientifique.....	23
II- SYNTHESE DES ACTIVITES DE RECHERCHE.....	25
1. TRAVAUX ANTERIEURS AU LABORATOIRE HP2.....	26
1.1. Travaux de thèse : role de Trio dans le guidage axonal induit par la nétrine-1.....	26
1.2. Travaux de premier post-doctorat: contrôle de la traversée de la plaque basale par les neurones commissuraux de la moelle épinière.....	29
1.3. Travaux de second post-doctorat: les precurseurs d'oligodendrocytes dans la gliomagenèse.....	32
2. TRAVAUX AU LABORATOIRE HP2.....	33
2.1. Rôle du facteur de transcription HIF-1 et de l'endothéline-1 dans les conséquences de l'hypoxie intermittente.....	34

2.2. Mise au point d'un modèle innovant d'hypoxie intermittente	39
2.3. Impact de l'hypoxie intermittente sur la fonction endothéliale : <i>VEGF et CRP, 2 cytokines circulantes de sérum de patients SAOS régulant la migration endothéliale</i>	41
III. PROJETS EN COURS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE	45
1. SAOS et dysfonction endothéliale: vers l'identification de la VE-Cadhérine comme biomarqueur et comme nouvelle cible thérapeutique dans l'athérogenèse?.....	46
Contexte et objectifs.....	46
Objectif 1: Recherche du clivage de la VE-Cadhérine chez les patients SAOS.....	50
Objectif 2: Mise en évidence du clivage de la VE-Cadhérine dans les modèles cellulaires et animaux d'Hi et conséquences sur la perméabilité endothéliale	53
Objectif 3: Caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans ce clivage	55
Objectif 4A: Comprendre l'impact du clivage sur l'athérogenèse.....	57
Objectifs 4B et 5: Réduire l'impact du clivage sur la perméabilité endothéliale et l'athérogenèse.	58
2. SAOS et dysfonction endothéliale: rôle de la VE-Cadhérine dans la dissémination métastatique et l'angiogenèse tumorale?	59
Objectif 1 : Impact de l'Hi sur l'angiogenèse tumorale.....	59
Objectif 2 : Impact de l'Hi sur la dissémination métastatique.....	61
3. Impact de l'hypoxie intermittente sur la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique.....	62
4. Caractérisation fonctionnelle de la croissance de neurones sur graphène	64
IV- CONCLUSIONS	65
V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	67

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury: les Dr Carmen Martinez, Roger Marthan et Muriel Laffargue qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail, les Dr Laurent Loufrani et Isabelle Vilgrain pour leur travail d'examineurs. Merci à vous tous d'avoir accepté de juger ce travail.

Ce manuscrit est l'aboutissement de plusieurs années de formation à la recherche. Je tiens à remercier ma directrice de thèse, le Dr Anne Debant, qui m'a accueillie dans son laboratoire voici déjà longtemps et qui m'a accompagnée avec bienveillance dans cette aventure qu'est la thèse. Je remercie également le Dr Valérie Castellani qui m'a accueillie pour une courte mais enthousiasmante année de post-doc à Lyon, puis le Dr Jacques Baudier qui m'a permis de revenir à Grenoble et d'approcher le monde de la cancérogenèse.

Au sein du laboratoire HP2, je tiens à remercier en tout premier lieu le Pr Jean-Louis Pépin, directeur du laboratoire, pour son accompagnement et sa confiance sur mon projet. Au-delà du soutien du directeur, le point de vue du clinicien est un apport précieux pour la biologiste cellulaire que je suis à l'origine. Je remercie également le Pr Diane Godin-Ribuot, qui m'a accueillie dans son équipe lors de mon recrutement au laboratoire et qui m'a donné l'opportunité de participer à plusieurs projets scientifiques, notamment avec ses doctorants Denis Monneret et Jessica Morand. Nous sommes aussi enseignantes et merci aussi à Diane pour m'avoir guidée dans les méandres de la fac à mon arrivée!

J'adresse évidemment mes remerciements chaleureux aux collègues avec qui nous interagissons au laboratoire, pour les discussions scientifiques aussi bien que pour les discussions amicales ! Merci pour les idées qui émergent autour d'un café ou d'un resto, pour les sourires et les yeux qui pétillent quand ça marche, pour les encouragements quand ça va moins bien. Merci particulièrement à celles qui sont devenues des amies et qui se reconnaîtront.

Un merci tout particulier à Isabelle Vilgrain avec qui, au détour d'une discussion lors d'un jury de thèse, nous avons décidé d'aller voir si on trouvait de la VE-cadhérine soluble chez les patients apnéiques. Ca a été le point de départ de ce projet qui m'anime maintenant. Merci pour cette collaboration qui se développe, ton aide et ta confiance.

Merci bien sûr à Olfa, qui me fait confiance pour encadrer sa thèse. Sans une très bonne étudiante ce projet de recherche ne serait pas grand-chose... Je suis très heureuse que nous ayons réussi à trouver un financement et j'espère que cette thèse continuera à se passer aussi bien que maintenant, grâce à ton sourire associé à ta rigueur et son sérieux.

J'y associe aussi les autres étudiants, les doctorants qui m'ont fait confiance (Denis, Manue, Jessica, Mélanie), les étudiants de Licence et Master avec qui j'ai pu commencer à apprendre à encadrer. Et j'ajoute également

les nombreux doctorants enseignants dont j'ai été tutrice d'enseignement depuis plusieurs années, avec qui nous avons pu échanger sur le plaisir d'enseigner. C'est grâce à vous tous que je souhaite aujourd'hui devenir "officiellement" encadrante, parce que transmettre aux jeunes est une des missions les plus stimulantes de notre métier !

Merci aux collègues enseignants aussi, notamment Michel Sève et Christine Demeilliers qui m'ont fait la confiance de me proposer d'être assesseur pédagogique, et qui me laissent carte blanche pour animer la vie pédagogique de l'UFR. J'ai beaucoup appris ces 4 dernières années à vos côtés dans l'équipe de l'UFR.

Enfin sur un plan plus personnel, merci à tous les amis hors de l'université, à ma famille et mes proches, mon père et mes frères et sœurs, pour leur confiance dans mes projets, pour leur soutien dans les moments difficiles et notamment lors de cet automne 2018, pour me booster quand ça va pas, et pour m'avoir poussée à me décider à écrire (enfin) cette fameuse HDR! Une pensée émue pour ma mère dont la présence m'a tant manqué et qui serait heureuse et fière aujourd'hui. Merci enfin et surtout à Julien et mes deux petits gars pour leur joie de vivre, pour ce que nous avons construit tous les quatre, et pour me rappeler quotidiennement ce qui compte vraiment dans la vie.

LISTE DES ABREVIATIONS

2-ME	2-Methoxyestradiol
APMC	Agir Pour les Maladies Chroniques
CRP	C-Reactive Protein
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
ENSL	Ecole Normale Supérieure Lyon
Eln	Elastine
ET-1	Endothelin-1
GTP	Guanosine TriPhosphate
HAoEC	Human Aortic Endothelial Cell
Hi	Hypoxie Intermittente
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor -1
HMVEC	Human Microvascular Endothelial Cell
HP2	Hypoxie et Physiopathologie cardiovasculaire et respiratoire
LDL	Low Density Lipoprotein
MMP	Matrix MetalloProteases
MS	Metabolic Syndrome
NFkB	Nuclear Factor kappa B
NG2	Neural/Glial antigen 2
PAT	Peripheral Arterial Tone
PP2	4-Amino-5(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine
PPC	Pression positive continue
QPES	Questions de Pédagogie dans l'Enseignement Supérieur
Rho-GEF	Rho Guanine nucleotide Exchange Factor
ROS	Reactive Oxygen Species
SAOS	Syndrome d'Apnées du Sommeil
Sema3B	Semaphorin 3B
SEP	Synthetic Elastic Protein
Src	Rous sarcoma oncogene
sVE	Soluble VE-Cadherin
TEER	TransEndothelial Electric Resistance
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridinylmethyl)-1,2-ethanediamine
UJF	Université Joseph Fourier
UGA	Université Grenoble Alpes
VE-Cadhérine	Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
YC-1	3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableau 1: Synthèse des enseignements effectués à mes différents postes.....	11
Tableau 2: Détail des enseignements effectués à l'UFR de Pharmacie de Grenoble, depuis 2008.....	12
Tableau 3: Nombre de publications en fonction de la position en tant qu'auteur.....	18
Tableau 4: Nombre de publications en fonction de l'Impact Factor.....	18
Figure 1: Trio médie le guidage axonal induit par la nétrine-1.....	27
Figure 2: Le contrôle de la traversée de la plaque basale par Sema3B	30
Figure 3: Schéma récapitulatif illustrant le mécanisme de gain de réponse à Sema3B mis en jeu lors de la traversée de la ligne médiane.....	31
Figure 4: Rôle de l'endothéline-1 dans la lipolyse induite par l'HI.....	35
Figure 5: Schéma résumant le mécanisme proposé par lequel l'ET-1 pourrait induire la lipolyse chez les animaux exposés à l'HI.....	38
Figure 6: La chélation du zinc induit la migration cellulaire via HIF-1 et l'endothéline-1.....	38
Figure 7: Caractérisation du dispositif d'hypoxie intermittente cellulaire.....	40
Figure 8: Régulation de la migration endothéliale et de la migration de monocytes par le VEGF et la CRP contenus dans le sérum de patients SAOS.....	43
Figure 9. Voie de signalisation liant le VEGF au clivage de la VE-Cadhérine	47
Figure 10. Rôle du stress oxydant et de l'inflammation dans la dysfonction endothéliale induite par l'hypoxie intermittente.....	47
Figure 11. Voies de signalisation et hypothèse mécanistique sous-tendant l'implication du clivage de la VE-Cadhérine dans les conséquences athérogènes du SAOS.....	49
Figure 12: Le taux de sVE sérique est élevé chez les patients SAOS non traités.....	51
Figure 13: Le taux de sVE augmente chez des volontaires sains soumis à 14 nuits d'Hi.....	52
Figure 14: L'hypoxie intermittente provoque le clivage de la VE-Cadhérine <i>in vitro</i>	54
Figure 15: Voie mécanistique hypothétique simplifiée menant au clivage de la vE-Cadhérine induit par l'hypoxie intermittente, et place des différents inhibiteurs utilisés dans cette étude.....	55
Figure 16: L'inhibition de HIF-1 par le 2-Méthoxyestradiol abolit les effets de l'hypoxie intermittente.....	56
Figure 17: Rôle du clivage de la VE-Cadhérine dans l'angiogenèse et la dissémination de métastases: hypothèses mécanistiques	59
Figure 18: Synthèse des axes de recherche proposés afin de mettre en évidence le rôle du clivage de la VE-Cadhérine dans les conséquences vasculaires du syndrome d'apnées du sommeil.....	65

I- CURRICULUM VITAE

Dr Anne BRIANCON-MARJOLLET, PhD

Née le 29/11/1979

2 enfants (nés en 2008 et 2010)

Position actuelle: Maître de conférences, section CNU 86, depuis le 01/09/2008

Adresse professionnelle:

Laboratoire HP2: Hypoxie et Physiopathologies cardiovasculaires et respiratoires

Université Grenoble Alpes, INSERM U1042

Domaine de la Merci

38700 La Tronche

04 76 63 74 75

anne.briancon@univ-grenoble-alpes.fr

1. FORMATION UNIVERSITAIRE

1996	Obtention du baccalauréat série S, mention TB
1996-1998	Classe préparatoire BCPST1 et 2 au lycée Champollion, Grenoble
1998-1999	Elève normalienne à l'École Normale Supérieure de Lyon Licence de Biologie Moléculaire et Cellulaire (ENS Lyon/Université Lyon 1) Mention Bien, rang : 1
1999-2000	Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie, (ENS Lyon/Université Lyon 1), Mention Bien, rang : 1. Un semestre Erasmus suivi à l'Université de Leiden (Pays-Bas)
2000-2001	Agrégation de Sciences de la Vie et de la Terre , spécialité biologie animale. Admission, rang national: 2 ^{ème}
2001-2002	DEA Biologie-Santé (Université Montpellier II) Mention Bien, rang: 1
2002-2006	Doctorat au Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire de Montpellier (Université Montpellier II), dirigé par le Dr Anne DEBANT : «Rôle du RhoGEF Trio dans la différenciation neuronale et la réponse à la nétrine-1»
2002-2005	Monitorat à l'Université Montpellier II, section CNU 64, Département Biologie-Physiologie

2. FORMATION CONTINUE

- **Scientifique**

- 2004 Formation expérimentation animale Niveau I, Marseille
- 2008 Formation Chirurgie expérimentale, Ecole Vétérinaire de Lyon
- 2014 Workshop INSERM "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue"

- **Pédagogie** (toutes proposées par l'ex-Service Universitaire de Pédagogie de l'UJF, sauf les MOOC)

- 2011 Construire et évaluer des TP à l'aide de grilles critériées
- 2011 Bien communiquer son cours
- 2012 Construire des diaporamas réellement pédagogiques
- 2012 Concevoir une évaluation par des QCM
- 2013 Favoriser l'apprentissage interactif en s'appuyant sur des boitiers de vote
- 2013 Favoriser le travail des étudiants : en TD, en groupes, à la maison
- 2015 Apprendre en profitant du travail en groupes
- 2015 F.O.I.R.E. : « Un tuteur pour les doctorants-enseignants : pour quoi faire ? »
- 2015 Constructivisme et pratiques enseignantes à l'université
- 2016 Méthodologie du travail universitaire
- 2016 MOOC Enseigner et Former dans le Supérieur
- 2018 MOOC Apprendre et Enseigner avec les Sciences Cognitives
- 2018-.. Cafés pédagogiques UFR de pharmacie (1 fois/mois)

- **Hygiène et sécurité**

- 2004 Premiers secours (Croix rouge)
- 2011 Sauveteur secouriste du Travail (UJF puis UGA) - formation initiale puis recyclage tous les 2 ans

3. ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT ET DE PEDAGOGIE

3.1. ENSEIGNEMENT

- **Synthèse des enseignements effectués**

Depuis l'obtention de mon agrégation de SVT en 2002, j'ai toujours enseigné dans le supérieur. J'ai enseigné essentiellement en licence de biologie à Montpellier en tant que moniteur pendant ma thèse, puis en tant qu'ATER lors de mon post-doctorat à Lyon. Pendant ces années, de 2002 à 2008, j'ai aussi réalisé des heures de "colles" en classe préparatoire BCPST, et des interventions ponctuelles dans les préparations à l'agrégation de Montpellier, de Lyon et de Grenoble.

Depuis 2008, je suis Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Grenoble, section CNU 86, où je réalise mon enseignement essentiellement en physiologie, plus ponctuellement en pharmacologie. J'ai bénéficié de décharges de jeune entrant lors des premières années, et ai exercé à 80% pendant 3 ans (suite maternité). Depuis 2014, j'effectue un service complet entre 220 et 240h équivalent TD /an.

Mes enseignements sont synthétisés dans le tableau ci-dessous, puis les enseignements réalisés en tant que MCF sont détaillés dans le second tableau.

Tableau 1: Synthèse des enseignements effectués à mes différents postes

Années	Université	Statut	Disciplines	Types de cours	Niveau des étudiants
Depuis 2008	UJF puis UGA, Grenoble	MCF CNU 86	Physiologie Pharmacologie	Cours magistraux, TD, TP	2e à 5 ^e année de pharmacie, Master 1 et 2, IFSI, Polytech
2006-2007	Lyon I	1/2 ATER CNU 65	Génétique Biologie du développement Biologie Moléculaire Biologie cellulaire	TD, TP	L1, L2, L3, prépa agreg SVT de l'ENS
2002-2005	Montpellier II	Monitrice CNU 64	Biologie cellulaire Biologie Moléculaire Physiologie animale	TD, TP, cours magistraux	L2, L3, M2, "colles" en classe prépa, prépa agreg SVT

- **Détail des enseignements effectués à l'UFR de Pharmacie de l'UGA, département de physiologie-pharmacologie, depuis 2008**

210 à 240h d'enseignement /an répartis comme suit, essentiellement en physiologie:

Tableau 2: Détail des enseignements effectués à l'UFR de Pharmacie de Grenoble, depuis 2008

	2eA Pharma	3eA Pharma	4eA Pharma	5 ^e année Pharma	Master 1	Master 2
Cours Magistraux	Système nerveux, Biologie du développement	Endocrinologie, grossesse	Système Nerveux		Pharmacologie générale, pharmacologie expérimentale, Physiologie intégrée	Culture cellulaire en pharmacologie
TP	Système nerveux, Histologie, Réactivité vasculaire, agonistes et antagonistes	Benzodiazépines		Projet Médicament, phase Etudes Précliniques Pharmacologiques		
TD	Système nerveux, Biologie du développement	Diabétologie, Compétences officinales et PEC, Anglais *			Pharmacologie générale, Physiologie Intégrée.	Analyse bibliographique, Anglais *
Encadrement de stages		Stage d'application officinal	Stage industriel			Participation aux jurys de M2
Encadrement de thèses d'exercice	Thèses d'exercice de Pharmacie: 5 thèses en tant que directrice depuis 2014					

* anglais: enseignement en collaboration avec une enseignante d'anglais, j'assure pour ma part l'encadrement et l'évaluation de la partie Physiologie-Pharmacologie de ces enseignements

- **Autres enseignements à l'Université Grenoble Alpes :**

-Polytech Grenoble, Cursus TIS (Technologies et Ingénieries pour la Santé) : Endocrinologie, Reproduction et contraception, Système Nerveux

- Institut de Formation en Soins Infirmiers (IFSI) : Système Nerveux

- **Encadrement de thèses d'exercice de Pharmacie**

- 2014 Rémi Samain: Ciblage thérapeutique du microenvironnement tumoral: exemple du cancer du pancréas
- 2015 Sami Bouhlafa (Tutrice universitaire): Prokinéticine 1, nouvel acteur de la physiologie ovocytaire humaine
- 2017 Célia Peltier : Les molécules tératogènes à dispensation réglementée en officine
- 2017 Mathilde Richard: Sclérose en plaques et perspectives thérapeutiques
- 2019 Mathilde Paquet: Comment améliorer, à l'officine, la prévention de la consommation d'alcool chez la femme enceinte

3.2. ACTIVITES ET RESPONSABILITES PEDAGOGIQUES

- 2016- présent Membre du bureau de l'UFR de Pharmacie, élue (collège MCF) au conseil d'UFR de Pharmacie
- 2016- présent Adjointe de la directrice des études, en charge particulièrement de la pédagogie: parcours officine, mise en place du Portefeuille d'Expériences et de Compétences, organisation et animation de cafés pédagogiques, lien avec le service pédagogique de l'université,...
- 2014-présent Responsable de la commission d'évaluation des enseignements de l'UFR de Pharmacie
- 2011-présent Responsable de 5 UEs de pharmacie et de Master Ingénierie Santé
- 2009-présent Tutrice de plusieurs Doctorants Contractuels Enseignants (ex moniteurs)
- 2010-présent Membre de l'Association des Enseignants de Physiologie dans les Facultés de Pharmacie (AEPFP)
- 2014-2017 Membre des « émulateurs du SUP », groupe de réflexion et de travail pédagogique
- 2014-présent Membre de la Communauté de Pratiques "Boitiers de votes" (2 rencontres / an environ)
- 2018- Membre de la Communauté de Pratiques "Classe inversée" (2 rencontres / an environ)
- 2019-... Co-pilote du groupe de travail "Innovation pédagogique" dans le cadre de la fusion de l'UFR de Pharmacie avec 5 autres composantes dans l'Université Intégrée

3.3. PARTICIPATION A DES CONFERENCES DE PEDAGOGIE

2014 : TICE Alpes

Participation à la présentation orale de C. Hoffmann et al. "Vers des pédagogies plus actives : petits et grands pas avec les boitiers de vote".

2015. Conférence QPES (Questions de pédagogie dans l'Enseignement Supérieur).

Participation à la communication écrite et à la présentation orale de C. Hoffmann et al. « Les émulateurs pédagogiques, une source d'innovations qui se construit à l'Université Joseph Fourier de Grenoble ».

2017. Conférence QPES (Questions de pédagogie dans l'Enseignement Supérieur). Proposition et animation d'un atelier autour de l'Evaluation par les Pairs.

Communication écrite: Briançon-Marjollet et al. "Construire et expérimenter une évaluation par les pairs".

Membre du comité d'organisation de ce congrès, et du comité de lecture chargé de sélectionner les communications.

2017. Etats généraux Recherche et Formation médicales, Caen

2019. Conférence QPES (Questions de pédagogie dans l'Enseignement Supérieur). Membre du comité de lecture chargé de sélectionner les communications.

3.4. FINANCEMENTS POUR LA PEDAGOGIE

Réponses aux appels d'offres UFR (2010, mars 2017, octobre 2017, mars 2019) - 7500 €.

2017- Participation à la demande de financement Idex formation portée par le Pr Pascal Mossuz, pour l'achat de tablettes et l'aménagement de salles de TD interactives et modulables - Projet Clipharma financé 148k€

4. TRAVAUX DE RECHERCHE

4.1. EXPERIENCE PROFESSIONNELLE

- 2001-2002 Stage de DEA (5 mois) au CCIPE, Université Montpellier II, dans l'équipe du Dr LAURENT JOURNOT: «Etude de la régulation transcriptionnelle et des gènes cibles de ZAC»
- 2001-2002 Stage de DEA (5 mois) au CRBM à l'Université Montpellier II, dans l'équipe du Dr ANNE DEBANT. «Recherche d'inhibiteurs de Trio, un facteur d'échange de RhoGTPases».
- 2002-2006 **Doctorat** au Centre de Recherche en Biochimie Macromoléculaire (CRBM) à l'Université Montpellier II, sous la direction du Dr ANNE DEBANT. "Rôle du RhoGEF Trio dans la différenciation neuronale et la réponse à la nétrine-1".

Thèse soutenue en Juin 2006, mention Très Honorable avec Félicitations du jury.
- 2006-2007 **Post-doctorat** au Centre de Génétique Moléculaire et Cellulaire (CGMC, Université Lyon I) dans l'équipe du Dr VALERIE CASTELLANI. "Caractérisation des signaux de guidage axonal dans un modèle de croisement de la commissure médiane".
- 2007-2008 **Post-doctorat** au Laboratoire de Transduction du Signal (iRTSV, CEA Grenoble) dans l'équipe du Dr JACQUES BAUDIER. rôle de progéniteurs de la lignée oligodendrogliale dans des tumeurs cérébrales chimioinduites".
- Depuis 2008 : **Maître de conférences à l'UFR de Pharmacie** de l'Université Grenoble Alpes, recrutée au **Laboratoire HP2** (Hypoxie et Physiopathologie), INSERM U1042 (Direction P. Lévy puis J-L. Pépin).

A noter:

2 congés maternité en 2008 et 2010

Activité à 80% de 2010 à 2013 (congé parental à temps partiel pour enfant de moins de 3 ans)

Arrêt maladie de 6 mois entre juin 2018 et janvier 2019.

4.2 PUBLICATIONS

* indique une position de co-auteur, \$ indique la position d'auteur correspondant. Les étudiants encadrés sont soulignés dans la liste des auteurs

1. Bellanger JM, Estrach S, Schmidt S, **Briançon-Marjollet A**, Zugasti O, Fromont S, Debant A. Different regulation of the Trio Dbl-Homology domains by their associated PH domains. *Biol Cell*. 2003 Dec;95(9):625-34. PMID:14720465 (IF:3.9)
2. Salinas S, **Briançon-Marjollet A**, Bossis G, Lopez MA, Piechaczyk M, Jariel-Encontre I, Debant A, Hipskind RA. SUMOylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling of Elk-1. *J Cell Biol*. 2004 Jun 21;165(6):767-73. PMID: 15210726 (IF: 10.2)
3. Portales-Casamar E, **Briançon-Marjollet A**, Fromont S, Triboulet R, Debant A. Identification of novel neuronal isoforms of the Rho-GEF Trio. *Biol Cell*. 2006 Mar;98(3):183-93. MID:16033331 (IF:3.9)
4. **Briançon-Marjollet A**, Ghogha A, Nawabi H, Triki I, Auziol C, Fromont S, Piché C, Enslin H, Chebli K, Cloutier JF, Castellani V, Debant A, Lamarche-Vane N. Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. *Mol Cell Biol*. 2008 Apr;28(7):2314-23. PMID:18212043 (IF:5.5)
5. Nawabi H*, **Briançon-Marjollet A***, Clark C, Sanyas I, Takamatsu H, Okuno T, Kumanogoh A, Bozon M, Takeshima K, Yoshida Y, Moret F, Abouzid K, Castellani V. A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes Dev*. 2010 Feb 15;24(4):396-410. PMID:20159958 (IF: 11.65)
6. **Briançon-Marjollet A**, Balenci L, Fernandez M, Estève F, Honnorat J, Farion R, Beaumont M, Barbier E, Rémy C, Baudier J. NG2-expressing glial precursor cells are a new potential oligodendrogloma cell initiating population in N-ethyl-N-nitrosourea-induced gliomagenesis. *Carcinogenesis*. 2010 Oct;31(10):1718-25. PMID:20651032 (IF: 5.7)
7. **Briançon-Marjollet A**^{\$}, Henri M, Pépin JL, Lemarié E, Lévy P, Tamisier R. Altered in vitro endothelial repair and monocyte migration in Obstructive Sleep Apnea: implication of VEGF and CRP. *Sleep* 2014, Nov 1;37(11):1825-32. PMID: 25364078 (IF: 5.1)
8. **Briançon-Marjollet A**^{\$}, Pépin JL, Weiss JW, Lévy P, Tamisier R. Intermittent Hypoxia upregulates serum VEGF. *Sleep Med*. 2014 Nov;15(11):1425-6. PMID 25277661 (IF : 3.6)
9. **Briançon-Marjollet A**, Weizenstein M, Henri M, Thomas A, Godin-Ribuot D, Polak J. The Impact of Sleep Disorders on Glucose Metabolism: Endocrine and Molecular Mechanisms. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2015 Mar 24; 7:25. PMID: 25834642 (IF: 2.5)

10. **Briançon-Marjollet A[§]**, Monneret D, Henri M, Hazane-Puch F, Faure P, Pépin JL, Godin-Ribuot D. Endothelin regulates intermittent hypoxia-induced lipolytic remodelling of adipose tissue and phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *Journal of Physiology*, 2015 Dec 12. PMID:26663321 (IF: 5)
11. Gras E, Belaidi-Corsat E, **Briançon-Marjollet A**, Pépin JL, Arnaud C, Godin-Ribuot D. The endothelin system promotes IH-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *Journal of Applied Physiology*, 2016 Feb 15;120(4):437-43. PMID: 26679613 (IF: 3.1)
12. Veliev F, **Briançon-Marjollet A**, Bouchiat V, Delacour C. Impact of crystalline quality on neuronal affinity of pristine graphene. *Biomaterials*, 2016 Apr;86:33-41. PMID 26878439 (IF: 8.5)
13. **Briançon-Marjollet A[§]**, Monneret D, Henri M, Joyeux-Faure M, Totoson P, Cachot S, Faure P, Godin-Ribuot D. Intermittent hypoxia in obese Zucker rats: cardiometabolic and inflammatory effects. *Exp physiol* 2016, Nov 1;101(11):1432-1442. PMID: 27615447 (IF 2.7)
14. Minoves M, Morand J, Perriot F, Chatard M, Gonthier B, Lemarié E, Menut JB, Polak J, Pepin JL, Godin-Ribuot D, **Briançon-Marjollet A[§]**. An innovative intermittent hypoxia model in cell cultures allowing fast PO₂ oscillations with minimal gas consumption. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2017 Oct 1;313(4):C460-C468 PMID:28747336 (IF: 3.6)
15. Veliev F, Han Z, Kalita D, **Briançon-Marjollet A**, Bouchiat V, Delacour C. Recording Spikes Activity in Cultured Hippocampal Neurons Using Flexible or Transparent Graphene Transistors. *Front Neurosci*. 2017 Aug 28;11:466 PMID:28894412 (IF: 3.5)
16. Arnaud C , Bouyon S, Recoquillon S, Brasseur S, Lemarié E, **Briançon-Marjollet A**, Gonthier B, Toral M, Faury G, Martinez MC, Andriantsitohaina R and Pepin JL. nmMLCK: a key player in intermittent hypoxia-induced vascular alterations. *JAHA*, 2018 Jan 25;7(3) PMID: 29371201 (IF: 4.9)
17. Veliev F, Kalita D, Bourrier A, Belloir T, **Briançon-Marjollet A**, Albrieux M, Bouchiat V, Delacour C. Sensing ion channels in neuronal networks with graphene transistors. *2D Materials*, 2018 Oct, 5(4) (IF: 7)
18. Morand J*, **Briançon-Marjollet A*[§]**, Lemarie E, Gonthier B, Arnaud J, Korichneva I, Godin-Ribuot D. Zinc deficiency up-regulates ET-1 mediated secretion and endothelial cell migration through nuclear HIF-1 translocation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2019, in press. (IF: 3.6)

Chapitre de livre

Tamisier R, **Briançon-Marjollet A**, Lévy P, Pépin JL. Animal and Physiological settings of IH Exposure. ERS Monograph edition: 67: Sleep Apnoea. 2015.

Résumé des publications

H-index = 10 (Web of Science™, Juillet 2019)

Tableau 3: Nombre de publications en fonction de la position en tant qu'auteur

	Publications Indexées
1er auteur	9
2ème auteur	3
Dernier auteur	1
Autre position	5
Total	18
Dont auteur correspondant	6

Tableau 4: Nombre de publications en fonction de l'Impact Factor

Impact Factor	Nombre de publications
IF > 10	2
7 < IF < 10	2
5 < IF < 7	4
3 < IF < 5	8
IF < 3	2

4.3 ENCADREMENT

- Encadrement régulier d'étudiants en L3 et M1 (9 depuis 2008).
- Encadrement de 5 thèses d'exercice de pharmacie depuis 2014 (voir partie Enseignements)
- Co-encadrement d'étudiants de M2 :
 - 2012 Jessica Morand (50% avec le Pr Diane Godin-Ribuot)
 - 2013 Mélanie Minoves (50% avec le Pr Diane Godin-Ribuot)
- Encadrement de M2 à 100%:
 - 2015 Frédéric Perriot, M2 CHIP Université Grenoble Alpes: « HI et risque de resténose ». 1 publication commune
 - 2018 Olfa Harki, M2 CHIP Université Grenoble Alpes: "Rôle de la VE Cadhérine soluble dans la perméabilité endothéliale induite par l'hypoxie intermittente". 1 poster à la fin de son M2.
- Participation à l'encadrement de doctorants depuis 2009
 - Denis Monneret (Thèse soutenue en 2012, dirigée par le Pr Godin-Ribuot) : « Le Syndrome d'Apnées Obstructives du Sommeil : Biomarqueurs et évaluation du risque cardiovasculaire. ». 2 publications communes.
 - Jessica Morand (Thèse soutenue en 2017, dirigée par le Pr Godin-Ribuot) : « Effets protecteurs vasculaires et cardiaques du zinc lors de l'hypoxie intermittente ». 1 publication commune, 1 publication en cours de rédaction.
 - Mélanie Minovès (Thèse en cours, dirigée par le Pr Godin-Ribuot) : « Etude des mécanismes physiopathologiques et prévention des effets délétères de l'hypoxie intermittente chronique sur le développement tumoral ». 1 publication commune, 1 publication en cours de rédaction.
- Encadrement de doctorants
 - Olfa Harki, thèse débutée au 1er Novembre 2018, dirigée par le Pr Gilles-Faury, et co-encadrée par moi-même: "Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et dysfonction endothéliale: vers l'identification de la VE-Cadhérine comme biomarqueur et comme nouvelle cible thérapeutique?" Mon objectif est de co-diriger cette thèse avec le Pr Faury à partir du moment où j'aurai soutenu mon HDR.
- Encadrement d'une post-doctorante:
 - Marion Henri, 2013-2015. 4 publications communes.

4.4 FINANCEMENTS

Financements obtenus en mon nom

2009 Fonds d'intervention du Pôle CSVSB: 30.000€.

Projet : *Interactions entre adipocytes et cellules endothéliales en réponse à l'hypoxie chronique et intermittente : étude du rôle de l'endothéline-1*

2011 Agir@Dom (Anne Briançon-Marjollet et Renaud Tamisier) 30.000€. Projet: *Impact du Syndrome d'Apnées du Sommeil (SAOS) sur la fonction endothéliale et l'activation monocyttaire.*

2012 Agir@Dom; 36.000€. Projet: *Mécanismes physiopathologiques associés au Syndrome d'Apnées du Sommeil : hypoxie intermittente & recherche expérimentale*

2018 Bourse de thèse FRSR/FDS (3 ans, 85.000€), Anne Briançon-Marjollet et Gilles Faury (co-demandeurs). Projet: *Syndrome d'apnées obstructives du sommeil et dysfonction endothéliale: vers l'identification de la VE-Cadhérine comme biomarqueur et comme nouvelle cible thérapeutique?*

Financements obtenus avec d'autres chercheurs

2009 Agir@Dom (Diane Godin-Ribuot et Anne Briançon-Marjollet); 20.000€. Projet: *Régulation du tissu adipeux par l'endothéline en réponse à l'hypoxie intermittente : impact cardio-vasculaire et métabolique*

2012 Participation à la demande de Bourse de doctorat CIBLE région Rhône-Alpes pour Jessica Morand, portée par Diane Godin Ribuot.

2016 Fondation APMC (Gilles Faury et Anne Briançon-Marjollet); 40.000€. Projet: *Hypoxie Intermittente et Risque de resténose*

4.5 CONGRES SCIENTIFIQUES

2019	Printemps de la Cardiologie, Lille (poster, O. Harki)
2018	Journées de la Recherche Médicale, Grenoble (poster sélectionné pour une session "poster walk" avec présentation orale du poster devant jury, O. Harki)
2017	Printemps de la Cardiologie (poster M. Minoves)
2016	Printemps de la Cardiologie, Toulouse
2014	Printemps de la Cardiologie, Marseille (3 posters)
2013	Congrès de l'European Respiratory Society, Barcelone, Spain (communication orale + obtention d'une bourse de voyage)
	Congrès de l'American Thoracic Society, Philadelphia, USA (poster)
2012	Printemps de la Cardiologie, Bordeaux
2011	Printemps de la Cardiologie, Lyon (poster)
	Congrès de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique (oral)
2008	Journées scientifiques de la cancéropole Rhône-Alpes (CLARA)(poster)
2007	Colloque de la Société des Neurosciences, Montpellier, France (poster)
2006	Axon Guidance Meeting, Cold Spring Harbor Laboratories, USA (poster)
2005	Colloque « Petites Protéines G », Toulouse, France (poster)
2004	FEBS Workshop on Cytoskeleton Dynamics, Helsinki, Finlande (poster)
2003	Colloque « Petites Protéines G », Le Croisic, France (poster)
2003	FEBS Workshop on Cytoskeleton Dynamics, Gosau, Autriche (oral)

Présentations orales lors de conférences (dans les 6 dernières années)

1. Briançon-Marjollet A, Henri M, Lemarié E, Pépin JL, Lévy P and Tamisier R. Assessment Of Impaired *In Vitro* Endothelial Repair Function In Obstructive Sleep Apnea Patients And Impact Of Associated Metabolic Syndrom. Congrès de l'European Respiratory Society, Barcelone 2013.

2. Briançon-Marjollet A, M. Henri, E. Lemarié, JL. Pépin, R. Tamisier and P. Lévy. Assessment Of Impaired *In Vitro* Endothelial Repair Function In Obstructive Sleep Apnea Patients And Impact Of Associated Metabolic Syndrome. Congrès de la Société Française de Pharmacologie et Thérapeutique, Angers 2013.

Résumés de conférences (avec comité de lecture)

-Baudier J, Balenci L, Assard N, Briançon-Marjollet A et al. Cancerous stem cells and glioblastoma. Bulletin du Cancer 95 Sp. Iss.: S61-S61 : Mar 2008

- Briançon-Marjollet A, Balenci L, Farion R, et al. Implication of oligodendrocyte progenitor cells in central nervous system tumors bulletin du cancer 95 Sp. Iss.: S61-S61 Mar 2008

- Briançon-Marjollet A, Monneret D, Joyeux-Faure M, Cachot S., Lévy P. and Godin-Ribuot D. Cardiovascular and metabolic consequences of chronic intermittent hypoxia in lean vs. obese zucker rats, American Journal of Critical Care Medicine 2011 Vol 183 Meeting Abstract: A2474

- Briançon-Marjollet A, Monneret D, Joyeux-Faure M, Cachot S., Lévy P. and Godin-Ribuot D. Cardiovascular and metabolic consequences of chronic intermittent hypoxia in lean vs. obese zucker rats, Fundamental & Clinical Pharmacology 25: 48-48 Suppl. 1, Apr 2011

- Gras, E.; Arnaud, C.; Briançon-Marjollet, A.; et al. Involvement of the HIF-1 transcription factor and of endothelin-1 in systemic inflammation and vascular remodelling induced by chronic intermittent hypoxia. Fundamental & Clinical Pharmacology 26 :19- Suppl 1, Apr 2012

- Briançon-Marjollet A, Henri M, Lemarié E, Pépin JL, Lévy P and Tamisier R. Assessment of impaired in vitro endothelial repair function in obstructive sleep apnea patients and impact of associated metabolic syndrome. American Journal of Critical Care Medicine 2013 Vol 187 Meeting Abstract: A2323

- Briançon-Marjollet A, Henri M, Lemarié E, Pépin JL, Lévy P and Tamisier R. Assessment of impaired in vitro endothelial repair function in obstructive sleep apnea patients and impact of associated metabolic syndrome. European Respiratory Journal 2013, European Respiratory Journal Vol42 Supplement 57, Meeting Abstract 712

- Briançon-Marjollet A, Henri M, Lemarié E, Pépin JL, Lévy P and Tamisier R. Assessment of impaired in vitro endothelial repair function in obstructive sleep apnea patients and impact of associated metabolic syndrome. Fundamental & Clinical Pharmacology 27 (SI) : 28-29 Suppl 1, Jun 2013

- Netchitailo, M Fabre, F; Briançon-Marjollet, A; Belaidi, E; Arnaud, C; Borel, A ; Levy, P; Pepin, JL; Tamisier, R
Two Weeks Of Intermittent Hypoxic Exposure Induce Lipolysis At The Fat Tissue Level In Healthy Human Subjects. American Journal of Critical Care Medicine 2017 Vol 195 Meeting abstract A7342
- Chatard M, Puech C , Briançon-Marjollet A, Perek N, Roche F. Étude des conséquences d’une hypoxie intermittente sur l’intégrité d’un modèle in vitro de barrière-hémato-encéphalique (BHE). Médecine du sommeil Vol 14 (2017):57
- M. Minoves, J. Morand, J. Polak, F. Perriot, E. Lemarié, B. Gonthier, J.B. Menut, J.L. Pépin, D. Godin-Ribuot, A. Briançon-Marjollet. A new and economic device for cellular intermittent hypoxia exposure Archives of Cardiovascular diseases supplements, Vol 9 (2017):185
- Harki O, Gonthier B, Pepin JL, Tamisier R, Faury G, Vilgrain I, Briançon-Marjollet A. Intermittent hypoxia increases VE-Cadherine cleavage in OSAS through ROS and HIF-1 pathways. Archives of Cardiovascular diseases supplements, Vol 11 (2019):195-196

4.6 BOURSES ET PRIX

1998-2002	Bourse d’études (élève normalien) à l’Ecole Normale Supérieure de Lyon
2002-2005	Bourse de thèse du Ministère de la Recherche et de l’Enseignement Supérieur
2005-2006	Bourse de 4e année de thèse, Ligue contre le Cancer
2006-2007	ATER (Attaché Temporaire d’Enseignement et de Recherche) temps partiel, Université Lyon I.
2012	Bourse de l’Association des Enseignants de Physiologie dans les Facultés de Pharmacie pour un court séjour dans le laboratoire de Larissa Shimoda (Baltimore, USA) pour établir une collaboration
2013	ERS Young Scientist Fellowship pour assister au congrès de l’ERS (Barcelone)

4.7 DIFFUSION SCIENTIFIQUE

- **Activité de reviewer**

Reviewer pour plusieurs journaux : Molecular and Cellular Endocrinology, Atherosclerosis, Hypoxia, Journal of the American Society of Hypertension, American Journal of Physiology, Cancer immunology, Oxidative Medicine and Cellular Longevity...

- **Participation à des jurys / comités de sélection**

- 2009 Poste PRAG Chimie, UFR de Pharmacie Grenoble
- 2016 Thèse de Wael Traboulsi, Université Grenoble Alpes
- 2017 Thèse de Morgane Chatard, Université St Etienne
- 2018 Poste MCU Pharmacologie, UFR de Pharmacie Grenoble

Depuis 2010: Membre du jury de 3 thèses d'exercice de pharmacie (en plus de celles que j'ai dirigées)

- **Collaborations scientifiques nationales et internationales**

Dr Isabelle Vilgrain, Grenoble

Pr Frédéric Roche et Dr Nathalie Perek, St Etienne

Dr Romain Debret, Lyon

Dr Larissa Shimoda, Baltimore et Dr Jan Polak, Prague

Dr Cécile Delacour, Grenoble

Dr Florence Puch, Grenoble

- **Fonctions d'intérêt collectif au sein de l'unité**

Membre élue du conseil d'UFR depuis 2015, et du conseil de laboratoire (collège MCF) entre 2012 et 2018

Responsable de la culture cellulaire (gestion de la salle de culture, formation des usagers,...)

Responsable du développement du dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente cellulaire au sein de la plateforme HyPE.

II- SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE

1. TRAVAUX ANTERIEURS AU LABORATOIRE HP2

1.1. TRAVAUX DE THESE : ROLE DE TRIO DANS LE GUIDAGE AXONAL INDUIT PAR LA NETRINE-1

Ma thèse s'est déroulée dans l'équipe du Dr Anne Debant à Montpellier. Cette équipe étudiait la structure, la régulation et les rôles d'une protéine appelée Trio, capable d'activer certaines protéines de la famille des petites protéines G telles que Rac ou RhoG. En effet Trio est un Rho-GEF c'est-à-dire un facteur d'échange des petites protéines G, qui remplace le GDP par du GTP et active donc les petites G. Les petites protéines G ont de multiples fonctions, notamment dans la signalisation cellulaire et la régulation de la dynamique du cytosquelette. Les membres de l'équipe, plutôt spécialisés en biologie moléculaire et cellulaire, avaient déjà pu identifier la structure complexe de Trio ¹, et montrer un certain nombre de rôles de Trio dans la dynamique du cytosquelette et dans la différenciation cellulaire ^{2, 3}, y compris sur un modèle pseudo-neuronal de cellules PC12 ⁴. A mon arrivée, l'équipe souhaitait aller plus loin sur le rôle de Trio dans les neurones, mais ne maîtrisait pas de modèle cellulaire adéquat. Par contre, un modèle de souris déficiente Trio^{-/-} avait été développé et était disponible en élevage au laboratoire. La double délétion étant létale vers E18.5, nous avons la possibilité de travailler avec des embryons KO en les prenant avant ce stade.

L'objectif principal de ma thèse a donc été de caractériser le rôle de Trio dans la différenciation neuronale, et ce en utilisant une combinaison de méthodes biochimiques, des modèles *in vitro* (culture de neurones primaires issus de souris déficientes pour Trio) ainsi qu'*in vivo* (guidage chez les embryons de souris déficientes pour Trio). Après avoir été formée aux techniques de culture primaire de neurones de cortex et d'hippocampe de souris dans un laboratoire parisien avec lequel nous collaborions (équipe de Hervé Enslin, Institut du Fer à Moulin), j'ai implanté cette compétence dans mon laboratoire de thèse.

Dans un premier temps, j'ai observé que les neurones primaires issus de souris Trio^{-/-} avaient un défaut de croissance par rapport aux neurones issus de souris Trio^{+/+}, et que de plus ils présentaient un défaut de réponse *in vitro* à la nétrine-1, un facteur de guidage axonal, alors qu'ils restent capables de répondre à une stimulation par du glutamate (figure 1C). De même, la croissance axonale induite par la nétrine est altérée dans des explants de moelle épinière d'embryons Trio^{-/-}. Nous avons mis en évidence une interaction entre Trio et le récepteur de la nétrine-1, DCC, dans des lysats de cerveau embryonnaire (figure 1A). Trio est indispensable à l'activation de Rac par la nétrine-1, puisque cette activation est absente dans les cerveaux issus de souris Trio^{-/-} (figure 1B). Enfin, grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr V. Castellani, nous avons également observé par immunohistochimie que les embryons Trio^{-/-} présentaient des défauts de

guidage axonal notamment au niveau des neurones commissuraux de la moelle épinière (figure 1D), du corps calleux ou du striatum (figure 1E), qui sont des zones pour lesquelles la nétrine et son récepteur DCC jouent un rôle de guidage important.

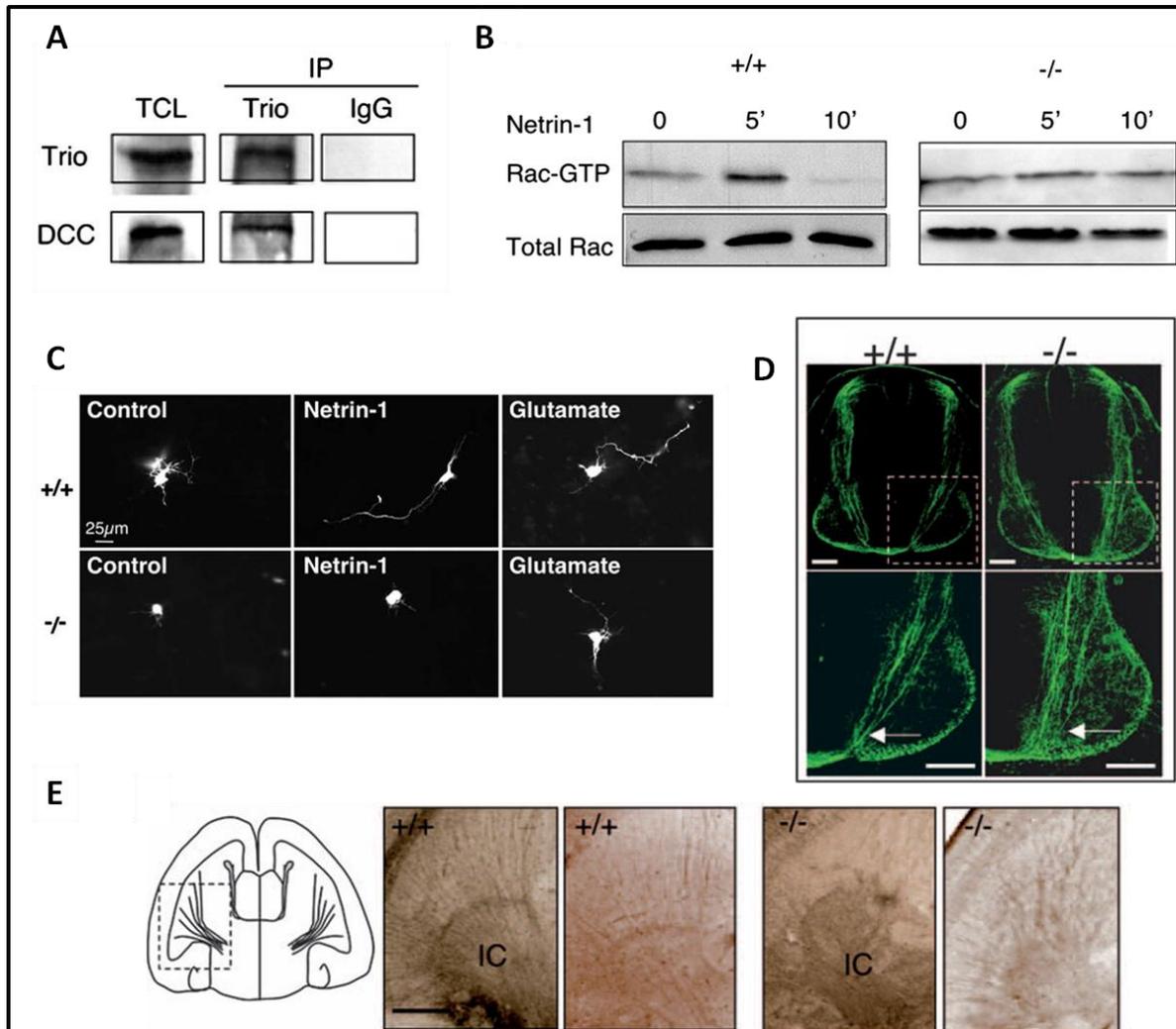


Figure 1: Trio médie le guidage axonal induit par la nétrine-1. A) Interaction de Trio et DCC dans des cerveaux de souris. Immunoprécipitation sur lysats de cerveau d'embryons de souris avec des anticorps anti-Trio ou anti-IgG, révélation par western blot anti-Trio ou anti-DCC (TCL: Total Cell Lysate). **B) Activation de Rac par la nétrine médiée par Trio.** Méthode de "GTP-trapping" permettant de distinguer Rac actif, lié au GTP, de Rac total, sur des lysats de cerveau d'embryon Trio +/+ ou Trio -/- incubés en présence de nétrine-1 pendant 5 ou 10 minutes. **C) Les neurones Trio -/- ont déficients pour la réponse à la nétrine-1.** Croissance in vitro de neurones corticaux issus d'embryons de souris Trio +/+ ou Trio -/-, en présence de nétrine-1 ou de glutamate pendant 24h. **D) Altérations du guidage des axones commissuraux de la moelle épinière en l'absence de Trio.** Immunofluorescence sur coupes de moelle épinière d'embryon de souris Trio +/+ ou Trio -/-, mettant en évidence des défauts de la trajectoire des neurones commissuraux à l'abord de la ligne médiane (flèches). **E) Altérations du guidage des axones de la capsule interne cérébrale en l'absence de Trio.** Immunohistochimie sur coupes de cerveau d'embryon de souris Trio +/+ ou Trio -/-, mettant en évidence des défauts de la trajectoire des axones qui apparaissent désorganisés. D'après Briançon-Marjollet et al.⁵

Ainsi, nous avons mis en évidence le rôle crucial de Trio dans la voie de signalisation de la nétrine-1 au cours de la croissance axonale. Trio, en activant la petite protéine G Rac, fait le lien entre un facteur de guidage

extracellulaire et les remaniements du cytosquelette, essentiels au guidage du cône de croissance axonal.

La principale publication issue de ce travail de thèse est la suivante ⁵:

Briançon-Marjollet A, Ghogha A, Nawabi H, Triki I, Auziol C, Fromont S, Piché C, Enslin H, Chebli K, Cloutier JF, Castellani V, Debant A, Lamarche-Vane N. Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. *Mol Cell Biol*. 2008 Apr;28(7):2314-23

Par ailleurs, j'ai participé à d'autres études en cours au laboratoire, visant à caractériser la structure et la régulation de Trio. Ainsi, j'ai participé au projet de thèse d'Elodie Portales-Casamar, qui a identifié des isoformes neuronales de Trio issues de mécanismes d'épissage alternatif ⁶. J'ai aussi contribué à la caractérisation de la structure de Trio, grosse protéine de plus de 300kD et formée de nombreux domaines, et à l'étude de la régulation de ces différents domaines ⁷. Deux publications ont donné suite à ces travaux:

Bellanger JM, Estrach S, Schmidt S, **Briançon-Marjollet A**, Zugasti O, Fromont S, Debant A. Different regulation of the Trio Dbl-Homology domains by their associated PH domains. *Biol Cell*. 2003 Dec;95(9):625-34. PMID:14720465

Portales-Casamar E, **Briançon-Marjollet A**, Fromont S, Triboulet R, Debant A. Identification of novel neuronal isoforms of the Rho-GEF Trio. *Biol Cell*. 2006 Mar;98(3):183-93. MID:16033331

Enfin, une équipe s'intéressant aux mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de type SUMOylation a collaboré avec nous en vue de comprendre l'impact de la SUMOylation du facteur de transcription Elk-1 dans le modèle pseudo-neuronal PC-12, et cette étude a donné lieu à une publication ⁸ à laquelle j'ai participé en mettant à profit ma maîtrise du modèle PC12.

Salinas S, **Briançon-Marjollet A**, Bossis G, Lopez MA, Piechaczyk M, Jariel-Encontre I, Debant A, Hipkind RA. SUMOylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling of Elk-1. *J Cell Biol*. 2004 Jun 21;165(6):767-73. PMID: 15210726

Globalement, cette thèse m'a permis de me former à un grand nombre de techniques complémentaires en biologie cellulaire: culture cellulaire de lignées et de neurones primaires, techniques d'immunohistochimie sur cellules et sur coupes d'embryons, techniques de biochimie (western blot, coimmunoprécipitation, GST Pull-down et "GTP-Trapping"), biologie moléculaire (clonage enzymatique, PCR, Q-PCR). J'ai également participé à la gestion des croisements d'animaux de notre lignée transgénique Trio^{-/-} et aux et génotypages.

Par ailleurs, ma thèse a bien évidemment été un lieu de formation indispensable m'ayant permis d'acquérir une démarche scientifique, des compétences de rédaction d'articles et de demandes de financement (pour ma 4e année de thèse par exemple), des compétences de travail en équipe, et enfin une connaissance du milieu de la recherche et de ses instances (CNRS, Université).

1.2. TRAVAUX DE PREMIER POST-DOCTORAT: CONTROLE DE LA TRAVERSEE DE LA PLAQUE BASALE PAR LES NEURONES COMMISSURAUX DE LA MOELLE EPINIÈRE

Pour mon premier post-doctorat à Lyon en 2006-2007, j'ai souhaité rejoindre l'équipe du Dr Valérie Castellani à Lyon, spécialisée dans le guidage axonal et avec laquelle nous avons collaboré pendant ma thèse pour l'étude des défauts de guidage chez les embryons Trio $-/-$. J'ai donc pu continuer à développer mes compétences dans l'étude du guidage axonal au cours du développement embryonnaire.

L'équipe du Dr Castellani travaillait essentiellement sur les facteurs de guidage neuronaux de la famille des sémaphorines. Les sémaphorines sont des facteurs de guidage axonal (attractif ou répulsifs) essentiels dans le développement du système nerveux central et périphérique et notamment pour le contrôle du croisement de la ligne médiane dans la moelle épinière⁹. En 2006, l'équipe du Dr Castellani s'intéressait à leur régulation et leurs rôles au cours du développement embryonnaire du SNC, en utilisant des modèles murins et de poulet.

J'ai donc travaillé sur le contrôle du croisement de la ligne médiane de la moelle épinière, au cours du développement embryonnaire, par les axones dits commissuraux, dont les corps cellulaires se situent en zone dorsale de la moelle épinière et qui doivent décrosser (c'est-à-dire traverser la ligne médiane). En effet, ce croisement est finement régulé, puisque des facteurs attractifs attirent les axones pour qu'ils croisent la ligne médiane au niveau de la plaque basale ("floor plate"), mais il faut ensuite que cette plaque basale cesse d'être attractive afin que les axones poursuivent leur chemin et ne la recroisent pas à nouveau. Les mécanismes contrôlant cette perte d'attractivité/gain de répulsivité des cibles intermédiaires telles que la plaque basale étaient alors largement méconnus.

Nous avons montré des défauts de guidage au niveau de la plaque basale et après sa traversée chez des embryons déficients pour Sema3B, suggérant bien un rôle de ce facteur dans le guidage au niveau du croisement de la ligne médiane (figure 2A). Les embryons déficients pour la plexine A1, un corécepteur de Sema3B, présentent des défauts similaires. J'ai mis au point des cultures de cellules de la plaque basale ainsi que des cultures de neurones commissuraux, et j'ai pu montrer que des signaux émis par la plaque basale rendaient les axones sensibles à la Sema3B, qui provoquait alors un collapse du cône de croissance axonal

caractéristique de l'effet d'un facteur répulsif, alors que les axones non mis en présence de milieu conditionné issu de plaque basale y étaient insensibles (figure 2B). Nous avons alors démontré que le taux d'expression de plexine A1, très faible avant le croisement de la plaque basale car la plexine A1 est dégradée par des mécanismes calpaïnes-dépendants, devient nettement plus élevé après le croisement de la ligne médiane (figure 2 C-E). Enfin, nous avons identifié NrCam comme la molécule présente au niveau de la plaque basale qui provoque ce switch d'expression de plexine A1 (figure 2F).

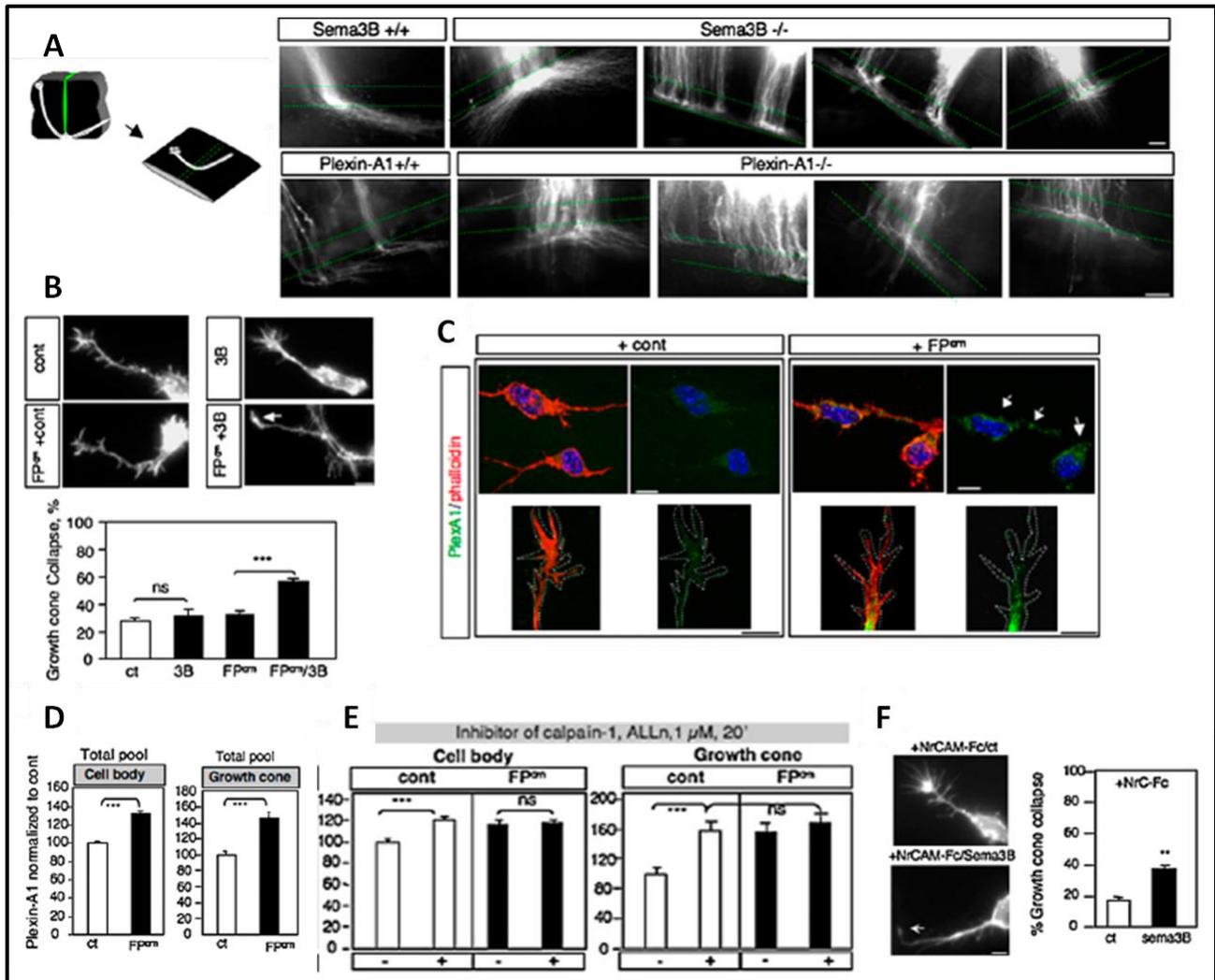


Figure 2: Le contrôle de la traversée de la plaque basale par Sema3B. **A)** Les embryons délétés pour Sema3B ou pour Plexine A1 présentent des défauts de guidage axonal similaires au niveau de la plaque basale de la moelle épinière. Expériences de traçage des axones commissuraux avec du Dil sur une préparation de moelle épinière en "open book". **B)** Les axones de neurones commissuraux cultivés en présence de milieu conditionné de plaque basale (Fpcm) deviennent sensibles à la présence de Sema3B qui induit lors un collapse du cône de croissance. **C)** L'expression de la plexine A1 augmente dans les neurones commissuraux cultivés en présence de milieu conditionné de plaque basale (FMcm). Immunofluorescence sur neurones commissuraux en culture, la plexine A1 est en vert et l'actine en rouge (marquée par la phalloïdine). **D)** Quantification des images présentées en C. **E)** Cette augmentation de plexine A1 induite par la plaque basale disparaît en présence d'un inhibiteur de calpaïne-1. **F)** NrCam est le médiateur produit par la plaque basale qui provoque le gain de réponse à Sema3B (collapse du cône de croissance). D'après Nawabi et al.¹⁰

Ainsi, ce travail démontrait pour la première fois que les axones qui traversent la ligne médiane sont mis au contact de NrCam qui diminue l'expression de calpaïnes et permet alors l'élévation du taux de Plexine A1. La plexine A1 étant un corécepteur du facteur de guidage répulsif Sema3B, les neurones acquièrent alors une capacité de réponse à Sema3B et sont repoussés hors de la plaque basale. Nous avons donc décrypté les mécanismes moléculaires impliqués dans le contrôle du croisement de la ligne médiane. Ce mécanisme est récapitulé sur la figure 3.

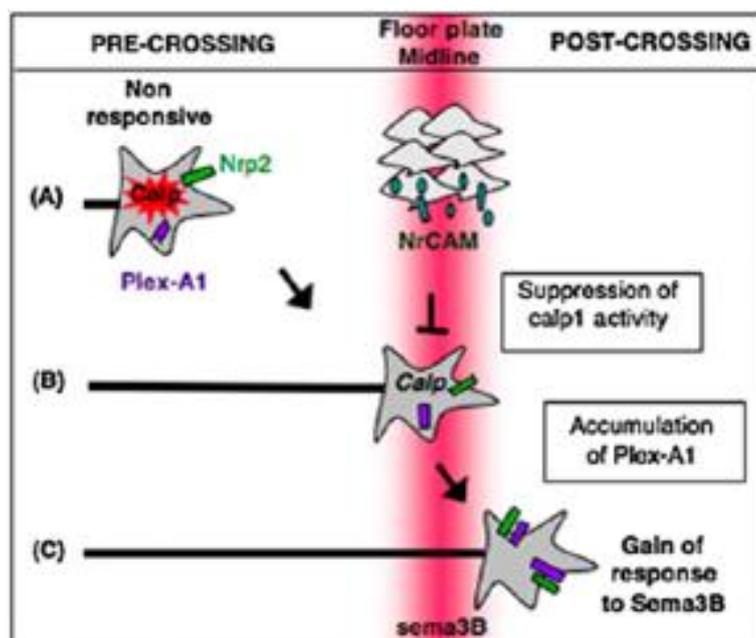


Figure 3: Schéma récapitulatif illustrant le mécanisme de gain de réponse à Sema3B mis en jeu lors de la traversée de la ligne médiane, démontré dans Nawabi et al.¹⁰

Ce travail a combiné plusieurs modèles *in vitro* (axones primaires commissuraux, modèle de co-culture avec explants de moelle épinière dorsale, gain de fonction dans l'embryon de poulet,...) ainsi que des techniques de biochimie et l'étude du développement des embryons déficients pour la sémaphorine 3B et la plexine A1. J'ai eu l'opportunité, pendant ce post-doctorat, de travailler avec une doctorante (H. Nawabi, dirigée par le Dr Valérie Castellani). Elle a ensuite continué le travail que j'avais initié lors de mon post-doc.

Ce travail commun a abouti à la signature en co-1er auteur de la publication que nous avons faite ensemble¹⁰.

Nawabi H*, Briançon-Marjollet A*, Clark C, Sanyas I, Takamatsu H, Okuno T, Kumanogoh A, Bozon M, Takeshima K, Yoshida Y, Moret F, Abouzid K, Castellani V. A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes Dev.* 2010 Feb 15;24(4):396-410.

1.3. TRAVAUX DE SECOND POST-DOCTORAT: LES PRECURSEURS D'OLIGODENDROCYTES DANS LA GLIOMAGENESE

Enfin, j'ai eu l'opportunité en 2007-2008 de bénéficier d'un contrat d'ingénieur-chercheur au CEA Grenoble, dans l'équipe du Dr Jacques Baudier. Ce 2e post-doctorat s'est inscrit dans une thématique de neurosciences au sens large, puisqu'il s'est intéressé non plus aux neurones mais aux cellules gliales dans un contexte de cancérogenèse.

En effet l'équipe du Dr Baudier étudiait alors l'origine des gliomes, qui sont des tumeurs du système nerveux central issues de cellules gliales. Parmi les gliomes on trouve les astrocytomes (parmi lesquels se classent les glioblastomes, les plus graves) mais également les oligodendrogliomes ou les oligoastrocytomes mixtes. La diversité de ces tumeurs provient de la diversité des cellules qui les engendrent. L'enjeu était de mieux comprendre l'origine de ces tumeurs, afin de pouvoir mieux les traiter en adaptant les thérapies aux types de cellules les composant.

Ainsi, j'ai étudié le rôle des progéniteurs d'oligodendrocytes dans un modèle de tumorigenèse d'oligodendrogliomes induite chez le rat par l'injection transplacentaire de N-ethyl-N-nitrosourée (ENU), un agent alkylant hautement mutagène ¹¹.

En collaboration avec l'équipe de Chantal Rémy et Emmanuel Barbier au GIN, nous avons réalisé un suivi longitudinal sur 11 mois de rats nés après une injection d'ENU chez la ratte gestante. Nous avons mis en évidence dans les gliomes de bas grade une population de cellules se divisant lentement et exprimant NG2, un marqueur de progéniteurs d'oligodendrocytes. J'ai mis au point un modèle de culture à partir de ces tumeurs, et montré que ces cellules avaient des capacités multipotentes in vitro. Nous avons ainsi suggéré que ces précurseurs NG2+ multipotents aient un rôle dans la genèse et la récurrence des gliomes de bas grade.

Au cours de ce second post-doctorat, j'ai eu une première expérience d'encadrement, avec un étudiant de M1 qui a contribué à mes travaux.

Ce travail a été publié en 2010:

Briançon-Marjollet A, Balenci L, Fernandez M, Estève F, Honorat J, Farion R, Beaumont M, Barbier E, Rémy C, Baudier J. NG2-expressing glial precursor cells are a new potential oligodendroglioma cell initiating population in N-ethyl-N-nitrosourea-induced gliomagenesis. *Carcinogenesis*. 2010 Oct;31(10):1718-25

2. TRAVAUX AU LABORATOIRE HP2

Avec mon recrutement au laboratoire HP2 fin 2008, j'ai effectué un changement thématique important. J'ai en effet apporté des compétences de culture cellulaire et de biologie moléculaire au laboratoire, que j'ai appliquées dans un tout autre contexte : le laboratoire travaille sur les conséquences physiopathologiques, notamment cardiovasculaires et métaboliques, du Syndrome d'Apnées du Sommeil (SAOS). Le laboratoire est structuré autour de 3 équipes de recherche: une équipe clinique, une équipe "hypoxie-exercice", et enfin une équipe de recherche fondamentale dont je fais partie.

Le syndrome d'apnées obstructive du sommeil (SAOS) est une pathologie touchant 5-20% de la population générale, caractérisée par un collapsus cyclique des voies aériennes supérieures pendant le sommeil conduisant à des efforts respiratoires, une fragmentation du sommeil, et surtout des cycles répétés d'hypoxie-réoxygénation ¹². Cette pathologie entraîne une fatigue et une somnolence diurne pouvant avoir des répercussions lourdes sur la qualité de vie. De plus, il est aujourd'hui bien démontré que les cycles d'hypoxie-réoxygénation pendant la nuit ont des conséquences importantes au niveau cardiovasculaire (athérosclérose, hypertension, risque accru d'infarctus du myocarde) et au niveau métabolique (risque accru d'obésité, syndrome métabolique, diabète de type II), entraînant une morbidité et une mortalité élevées. Il s'agit donc d'un problème de santé publique.

Le seul traitement aujourd'hui disponible est la Pression Positive Continue (PPC), appareillage qui consiste à fournir de l'air pour rouvrir les voies aériennes pendant le sommeil. Cependant, ce traitement assez lourd est parfois mal supporté. De plus, si son efficacité pour réduire la fatigue quotidienne est démontrée, son impact sur les conséquences cardiométaboliques de la maladie est encore discuté. Ainsi, les objectifs globaux de l'équipe de recherche fondamentale du laboratoire sont de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des conséquences cardiométaboliques de la maladie, afin de proposer des pistes de traitement pour les patients. Nous utilisons l'hypoxie intermittente (HI) comme modèle de SAOS, en effet l'HI mime les cycles d'hypoxie-réoxygénation nocturnes qui sont connus pour être des contributeurs majeurs aux conséquences délétères du SAOS.

J'ai organisé mon travail autour de 3 grands axes:

- Rôle du facteur de transcription HIF-1 et de l'endothéline-1 (ET-1) dans les conséquences cardiovasculaires et métaboliques de l'hypoxie intermittente,
- Mise au point d'un modèle innovant d'hypoxie intermittente,
- Impact de l'hypoxie intermittente sur la fonction endothéliale.

2.1. ROLE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF-1 ET DE L'ENDOTHELIN-1 DANS LES CONSEQUENCES DE L'HYPOXIE INTERMITTENTE.

Cette thématique était à mon arrivée développée par le Pr Diane Godin-Ribuot, dont j'ai rejoint le groupe.

Le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) est très largement connu pour être activé à l'hypoxie, induisant alors une cascade d'expression génique permettant à l'organisme de s'adapter au manque d'oxygène¹³. Dans le contexte particulier de l'hypoxie intermittente, le laboratoire a démontré que HIF-1 était également activé et participait aux conséquences délétères de la pathologie¹⁴.

HIF-1 a de nombreux gènes cibles dont VEGF, EPO, Angiotensine 1 et 2, PDGF,... Parmi eux on trouve également l'endothéline-1 (ET-1), petit peptide connu pour être un puissant vasoconstricteur. Le laboratoire avait déjà démontré le rôle de HIF-1 et ET-1 dans l'infarctus du myocarde induit par l'HI¹⁵ et cherchait alors à caractériser d'autres fonctions.

2.1.1 ROLE DE HIF-1 ET ET-1 DANS LE REMODELAGE VASCULAIRE INDUIT PAR L'HI

A mon arrivée, une doctorante encadrée par le Pr Godin-Ribuot commençait l'étude du rôle de HIF-1 et de ET-1 sur le remodelage vasculaire induit par l'HI, notamment en utilisant des souris partiellement délétées pour HIF-1 α (la sous-unité régulatrice de HIF-1). La doctorante a pu montrer que l'HI induit une inflammation de la paroi aortique caractérisée par une augmentation de l'épaisseur intima-media, une activité accrue de HIF-1 et de NF κ B, ainsi que l'expression de cytokines proinflammatoires. Ces effets sont abolis chez les souris partiellement délétées pour HIF-1 α , ainsi que chez les souris traitées par bosentan, un inhibiteur des récepteurs à l'ET-1. J'ai participé à cette étude, notamment en menant des études cellulaires complémentaires aux études animales, permettant de montrer l'activation et la prolifération de splénocytes par l'HI chez les animaux non mutés, mais pas chez ceux partiellement délétés pour HIF-1 α ou traités par bosentan. Cette étude a été publiée en 2016¹⁶.

Gras E, Belaidi E, **Briancon-Marjollet A**, Pepin JL, Arnaud C, Godin-Ribuot D. (2016) Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *J Appl Physiol* (1985) 120(4): 437-443

2.1.2 ROLE DE ET-1 ET DE L'OBESITE DANS LES EFFETS METABOLIQUES DE L'HI

De plus, des études suggéraient que ET-1 pouvait aussi avoir un effet au niveau du tissu adipeux¹⁷, or l'HI est connue pour être associée au syndrome métabolique, à une dyslipidémie et une insulino-résistance¹⁸⁻²⁰.

Ainsi, nous avons examiné le rôle métabolique de l'endothéline-1 dans la lipolyse induite par l'hypoxie intermittente. Cette étude faisait partie du travail de thèse de Denis Monneret, que j'ai contribué à encadrer pendant sa thèse. Après son départ du laboratoire, j'ai poursuivi et terminé les travaux, avec l'aide d'une post-doctorante (Marion Henri) que j'ai également encadrée.

Nous avons montré que l'hypoxie intermittente induisait une lipolyse du tissu adipeux chez des rats, qui est médiée par l'endothéline-1 puisqu'elle est abolie par le bosentan (Figure 4A-4B). L'HI induit également une augmentation de la transcription de ET-1 et de l'expression de ses récepteurs ETA-R dans le tissu adipeux (Figure 4C-4D). En utilisant un modèle de culture cellulaire d'adipocytes in vitro, nous avons montré que ET-1 induit un relargage de glycérol ainsi qu'une diminution de la consommation de glucose. Nous avons pu détailler les mécanismes d'action de l'endothéline-1 et montrer qu'elle activait l'Hormone-Sensitive Lipase (HSL) en provoquant sa phosphorylation sur la sérine activatrice Ser⁶⁶⁰ (Figure 4E-4F).

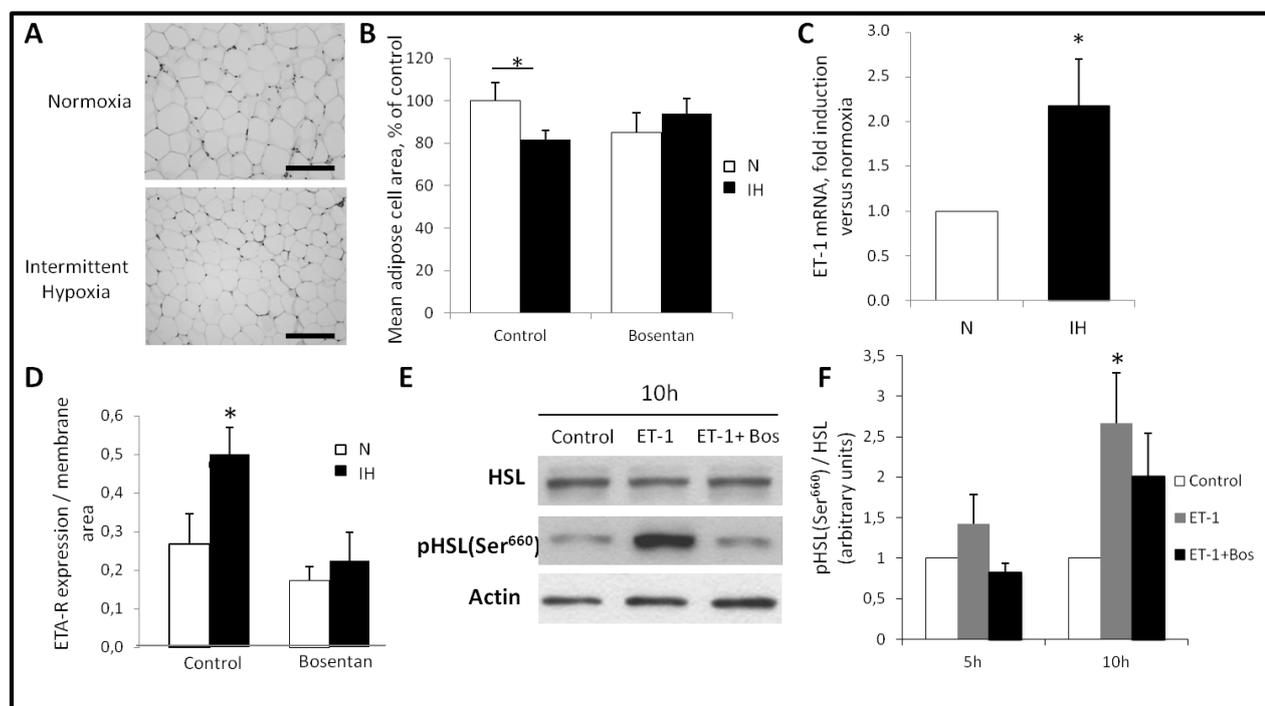
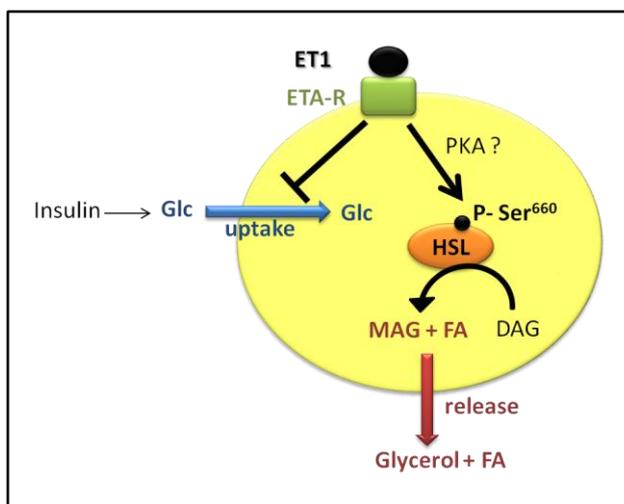


Figure 4: Rôle de l'endothéline-1 dans la lipolyse induite par l'HI. A) Microscopie optique sur coupe de tissu adipeux de rats exposés pendant 2 semaines à la normoxie ou à l'hypoxie intermittente (IH). Barre= 40μm. B) Quantification de la surface moyenne des cellules adipeuses montrant une lipolyse induite par l'HI et abolie par le bosentan. C) Quantification de la quantité d'ARN de ET-1 dans le tissu adipeux de rats N ou IH. D) Expression membranaire du récepteur ETA-R quantifiée sur coupes de tissu adipeux après immunohistochimie. E) Western blot montrant la phosphorylation de HSL sur sa sérine activatrice 660 après stimulation par ET-1 de cellules 3T3-L1 différenciées en adipocytes in vitro. F) Quantification des western blots. * p<0.05. D'après Briançon-Marjollet et al ²¹.

Figure 5: Schéma résumant le mécanisme proposé par lequel l'ET-1 pourrait induire la lipolyse chez les animaux exposés à l'HI. D'après Briançon-Marjollet et al ²¹.



Ainsi nous avons démontré une nouvelle action de l'endothéline-1 dans les conséquences physiopathologiques de l'hypoxie intermittente, et mis en évidence que son mécanisme d'action implique l'activation de HSL. Ce travail, résumé sur la figure 5, a été publié en 2015 ²¹ et a fait l'objet d'un financement Agir@Dom (20.000€).

Briançon-Marjollet A, Monneret D, Henri M, Hazane-Puch F, Pepin JL, Faure P, Godin-Ribuot D. (2015) Endothelin regulates intermittent hypoxia-induced lipolytic remodelling of adipose tissue and phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *J Physiol* 594(6): 1727-1740

En parallèle de ce travail, la thèse de Denis Monneret prévoyait de caractériser les effets métaboliques de l'HI chez des rats obèses. En effet, une grande partie des patients atteints de SAOS sont en surpoids ou obèses, et le SAOS aussi bien que l'obésité sont des facteurs de risque cardiovasculaire indépendants ^{12, 22}. Il semblait donc intéressant d'évaluer l'impact respectif de l'HI et de l'obésité sur l'atteinte inflammatoire, métabolique et cardiovasculaire des animaux. Nous faisons l'hypothèse, en débutant ce travail, que l'HI et l'obésité auraient des effets délétères additionnels sur ces paramètres.

Nous avons utilisé le modèle de rats génétiquement obèses Zucker (*fa/fa*), et leurs homologues non obèses (*Fa/Fa*), soumis à hypoxie intermittente. Nous avons mesuré des paramètres métaboliques et inflammatoires tels que glucose et lipides sanguins, les adipokines leptine et adiponectine, des cytokines dans le foie (TNF α , IL-6), l'activité de NF κ B, ainsi que la sensibilité à l'infarctus du myocarde par un modèle d'ischémie-reperfusion in vitro et enfin la quantité d'ET-1 cardiaque.

Globalement, nous avons observé des effets soit de l'HI, soit de l'obésité sur ces paramètres, mais très peu d'effets synergiques. Ainsi, les paramètres métaboliques (lipides, insuline, adipokines) sont affectés par l'obésité mais pas par l'HI, tandis que l'HI provoque une inflammation et une augmentation de l'infarctus du myocarde qui ne sont pas affectés par l'obésité. La glycémie et la résistance à l'insuline (mesurée par le

HOMA-IR) augmentent sous HI seulement chez les rats obèses, montrant ici un effet synergique des deux paramètres. Mais à l'inverse, pour certains paramètres tels que le taux d'IL-6 hépatique et le taux d'ET-1 cardiaque, nous avons montré que l'obésité protégeait des effets de l'HI observés chez les rats maigres.

Ainsi, notre étude suggère que chez ces rats génétiquement obèses, l'association d'obésité et d'HI n'a pas d'effets synergiques majeurs. Si ce résultat était confirmé chez des patients, il pourrait suggérer que les mécanismes physiopathologiques puissent être différents chez des patients SAOS ayant une obésité due au régime alimentaire ou d'origine génétique.

Ce travail, au cours duquel j'ai contribué à l'encadrement du doctorant et d'une post-doctorante, a été publié en 2016²³.

Briancon-Marjollet A, Monneret D, Henri M, Joyeux-Faure M, Totoson P, Cachot , Faure P, Godin-Ribuot D. (2016) Intermittent hypoxia in obese Zucker rats: cardiometabolic and inflammatory effects. *Exp Physiol* 101(11): 1432-1442.

Enfin, suite à ces travaux sur les troubles métaboliques associés à l'HI, nous avons également écrit une revue de la littérature portant sur la régulation du métabolisme glucidique dans les troubles de sommeil, incluant le SAOS, en collaboration avec le Dr Polak à Prague²⁴.

Briancon-Marjollet A, Weiszenstein M, Henri M, Thomas A, Godin-Ribuot D., Polak J. (2015) The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms. *Diabetol Metab Syndr* 7: 25

2.1.3 EFFETS DE LA DEPLETION EN ZINC SUR HIF-1, ET-1 ET LA MIGRATION DES CELLULES ENDOTHELIALES

En 2012, j'ai co-encadré une étudiante de M2, Jessica Morand, dont le sujet principal était d'étudier l'homéostasie du zinc dans notre modèle de SAOS. J'ai ensuite participé à l'encadrement de sa thèse (dirigée par le Pr Godin-Ribuot et co-dirigée par le Pr Korichneva), notamment en dirigeant une étude visant à comprendre le rôle du zinc dans la régulation de HIF-1 et de la sécrétion d'ET-1, ainsi que les conséquences de la déplétion en zinc sur la capacité de migration des cellules endothéliales.

Le zinc est un élément trace indispensable à l'homéostasie cellulaire, la déficience en zinc pouvant avoir des

conséquences importantes associées à des maladies vasculaires (hypertension pulmonaire, athérosclérose) ou des cancers^{25, 26}. La déplétion en zinc peut en effet affecter le fonctionnement de protéines contenant du zinc (dans des Zn-finger par exemple), mais peut également altérer l'activité de facteurs de transcription ne contenant pas de zinc, par des mécanismes encore assez mal connus. Au démarrage de notre projet, quelques rares études suggéraient un rôle possible du zinc dans la régulation de HIF-1 et la synthèse de VEGF^{27, 28}. Par ailleurs, une étude avait montré que les patients SAOS présentent un déficit en zinc²⁹. Ainsi, notre hypothèse était qu'une déplétion en zinc due au SAOS puisse provoquer une activation de l'axe HIF-1 - ET-1 et avoir des conséquences sur la physiologie des cellules.

Nous avons choisi de travailler avec un modèle de cellules endothéliales primaires en culture (HMVEC). Nous avons montré que la déplétion en zinc induite par un chélateur chimique, le TPEN, provoque une relocalisation nucléaire de HIF-1 α (Figure 6A et 6B) associée à une augmentation de la sécrétion d'ET-1 (Figure 6C). Cette sécrétion d'ET-1 est abolie lorsque les cellules sont transfectées avec un siRNA éteignant l'expression de HIF-1 α , ce qui montre bien le rôle de HIF-1 dans la sécrétion d'ET-1 induite par la déplétion en zinc due au TPEN. De plus, nous avons observé que le TPEN aussi bien que ET-1 induisent une migration cellulaire accrue dans un test de "wound healing" in vitro, et que ces effets sont abolis par le traitement au bosentan et par un siRNA dirigé contre HIF-1 α (Figure 6D et 6E). Ainsi, nous suggérons que la déplétion en zinc provoque une activation de HIF-1 et de ET-1, ce qui peut avoir des conséquences fonctionnelles sur les cellules endothéliales telles que la migration cellulaire accrue.

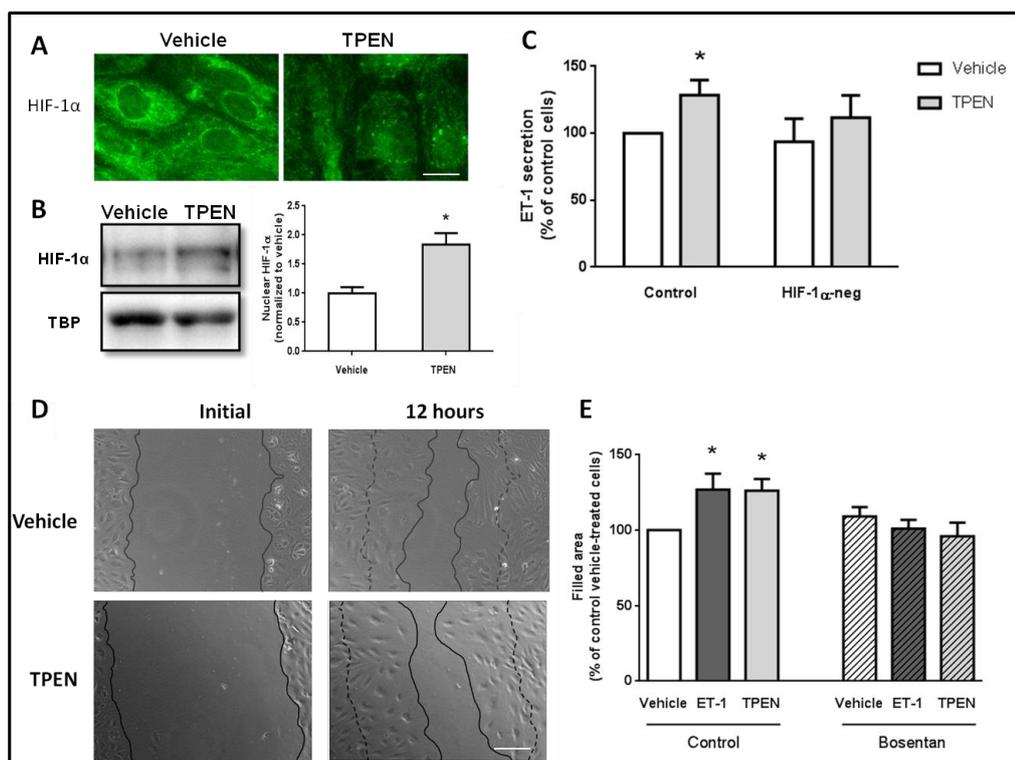


Figure 6: La chélation du zinc induit la migration cellulaire via HIF-1 et l'endothéline-1. A) Immunofluorescence pour la protéine HIF-1 α dans des cellules endothéliales HMVEC montrant sa relocalisation nucléaire lors du traitement par le chélateur de zinc TPEN. Barre= 15 μ m. B) Quantité de HIF-1 α nucléaire en western blot et quantification. * $p < 0.05$ vs vehicle. C) Sécrétion d'endothéline-1 induite par le TPEN, et abolie par un siRNA dirigé contre HIF-1 α . * $p < 0.05$ vs control. D) Microscopie optique montrant que le TPEN accélère le "wound healing" des cellules HMVEC. Barre=60 μ m. E) Quantification des wound healing, l'effet du TPEN est aboli par un traitement au bosentan, inhibiteur des récepteurs de l'endothéline-1. * $p < 0.05$ vs vehicle.

L'article correspondant a été publié en 2019 :

Morand J*, **Briançon-Marjollet A***, Lemarie E, Gonthier B, Arnaud J, Korichneva I, Godin-Ribuot D. Zinc deficiency up-regulates ET-1 mediated secretion and endothelial cell migration through nuclear HIF-1 translocation. *Am J Physiol Cell Physiol* 2019, in press. (IF: 3.6)

2.2. MISE AU POINT D'UN MODELE INNOVANT D'HYPOXIE INTERMITTENTE

A mon arrivée au laboratoire, l'équipe disposait d'un système performant permettant d'exposer des rongeurs à des cycles d'hypoxie intermittente, mimant les hypoxie-réoxygénations du SAOS³⁰. Cependant, le laboratoire n'avait pas de système permettant d'exposer des cellules, ce qui limitait les techniques d'étude disponibles. Une de mes principales missions après mon recrutement a donc été de mettre en place un tel dispositif.

Ceci représentait un challenge technique car la présence du milieu de culture amortit les variations d'oxygène qu'on peut appliquer dans l'air, et empêche de ce fait de faire des cycles courts. Aucune solution satisfaisante n'existait à l'époque dans les autres équipes de recherche mais plusieurs avaient le même objectif que nous.

Grâce à une collaboration avec Jan Polak (Faculté de Médecine de Prague, alors en post-doctorat dans l'équipe de L. Shimoda à Baltimore), et avec une entreprise suisse (SMTEC), nous avons mis au point un système utilisant des supports faits à façon et des plaques de culture commerciales dont les fonds sont perméables aux gaz, permettant de réaliser des cycles de l'ordre de quelques minutes avec une très bonne amplitude de variation de l'oxygénation (entre 25mmHg et 120mmHg environ).

Nous avons caractérisé complètement les performances et les limitations de ce dispositif, ce qui a donné lieu à une publication descriptive du système³¹ (Figure 7). Dans la réalisation de ce travail, j'ai encadré 2 doctorantes (M. Minoves et J. Morand) et un étudiant de M2 (F. Perriot).

Minoves M, Morand J, Perriot F, Chatard M, Gonthier B, Lemarie E, Menut J.B., Polak J, Pepin J.L., Godin-Ribuot D, **Briancon-Marjollet A.** (2017) An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast PO₂ oscillations with minimal gas consumption. *Am J Physiol Cell Physiol* 313(4): C460-C468

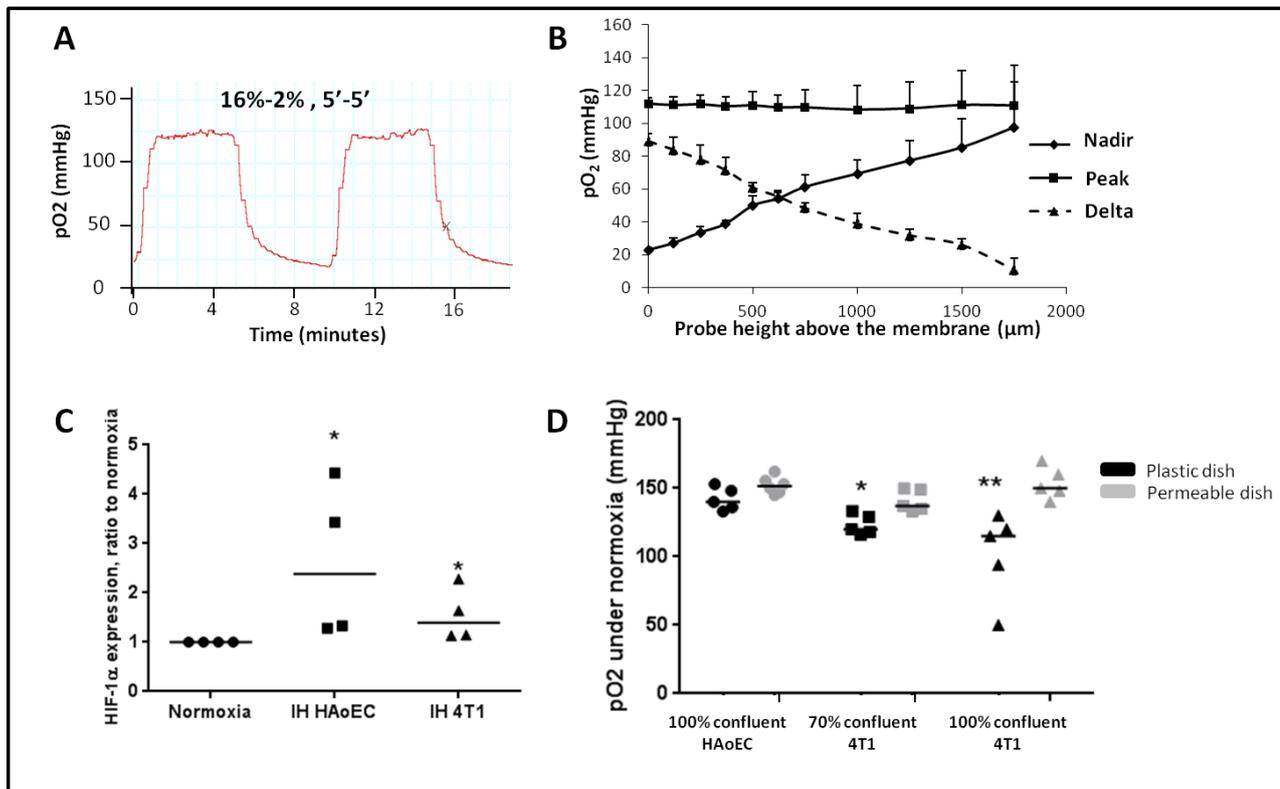


Figure 7: Caractérisation du dispositif d'hypoxie intermittente cellulaire. A) Taux d'oxygène (mmHg) mesurés dans le milieu de culture au niveau des cellules lorsqu'on alterne 5 minutes à 16% d'O₂ et 5 minutes à 2% d'O₂ dans l'air. B) Evolution des points extrêmes des taux d'O₂ pendant les cycles (nadir et peak) à différentes hauteurs dans le milieu de culture. C) Induction de l'expression de HIF-1 après 8h d'HI dans des cellules HAoEC et des 4T1 (lignée de cancer mammaire). * p<0.05 vs normoxia. D) Taux d'oxygène mesurés dans le milieu de culture lorsque les cellules HAoEC ou 4T1 sont cultivées en normoxie (21% O₂) dans des boîtes plastique standard ou dans des boîtes perméables aux gaz. * p<0.05 et ** p<0.001 vs permeable dish.

Ce système a été financé par les tutelles du laboratoire ainsi que par un financement fondation APMC (20.000€). Il est aujourd'hui unique en France, et seuls 3 autres laboratoires en Europe disposent de dispositifs équivalents. Il permet d'ores et déjà aux membres du laboratoire de réaliser des travaux de recherche originaux pour comprendre les effets de l'HI à l'échelle cellulaire: ainsi, nous exposons actuellement des cellules endothéliales, des cardiomyocytes, des adipocytes, des cellules de cancer du foie,... Par ailleurs, ce dispositif a déjà été utilisé par des collaborateurs du laboratoire, dont l'équipe du Pr Korichneva (Amiens) qui continue à travailler sur le zinc dans la physiologie cellulaire, l'équipe du Pr Roche à

St Etienne qui s'intéresse aux conséquences de l'hypoxie intermittente sur la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (voir III.4.), et l'équipe du Dr Lelay à Angers qui travaille sur le rôle des cavéoles dans les altérations du tissu adipeux induites par l'Hi.

Nous avons aujourd'hui désigné et fait fabriquer (par l'entreprise grenobloise Technicoplast) de nouveaux supports de plaques afin d'optimiser l'exposition de cellules à l'Hi : plus de plaques sont exposables en même temps, et il devrait y avoir moins de problèmes de fuites. Ces nouveaux supports doivent être testés dans les mois à venir afin de vérifier que les cycles d'hypoxie que nous obtenons sont au moins aussi bons que ceux obtenus avec l'ancien dispositif.

De plus, nous avons amorcé un partenariat avec l'entreprise anglaise Oxford Optronics, dans l'objectif de continuer à faire évoluer notre dispositif, actuellement plutôt proche d'un prototype, vers un dispositif plus abouti. Nous souhaitons développer avec eux un système intégré, incluant le système de mélange des gaz et son pilotage. Nos objectifs sont multiples: nous souhaitons aller vers un dispositif 1) plus fiable et plus robuste, plus facilement pilotable qu'aujourd'hui avec le logiciel développé par MCQ Instruments, 2) de plus grande capacité, 3) idéalement comportant plusieurs voies indépendantes les unes des autres de façon à pouvoir exposer, en parallèle, des cellules à différents taux d'oxygène ou différents types de cycles d'Hi.

Il s'agit là d'un objectif à long terme qui va demander un travail de mise au point et de développement technique avec de nombreux échanges entre Oxford Optronics et nous. L'objectif est de breveter le dispositif dès que ce sera possible. Nous sommes accompagnés par Inserm Transfert dans cette démarche de valorisation (signature d'accord de confidentialité avec Oxford Optronics, et à terme brevet si possible).

2.3. IMPACT DE L'HYPOXIE INTERMITTENTE SUR LA FONCTION ENDOTHELIALE : *VEGF* et *CRP*, 2 cytokines circulantes de sérum de patients SAOS régulant la migration endothéliale

En parallèle, j'ai développé au laboratoire une nouvelle thématique de recherche, s'intéressant à la régulation de fonction des cellules endothéliales dans le SAOS.

Le SAOS et l'HI sont associés à un risque accru d'athérosclérose pouvant mener à une morbi-mortalité cardiovasculaire importante¹². Cette athérosclérose résulte d'une cascade de processus immuno-inflammatoires qui débute avec des altérations de l'endothélium vasculaire et aboutit à la formation de plaques d'athérosclérose. Des processus de réparation impliquant la prolifération et la migration des cellules endothéliales peuvent permettre de limiter ces altérations, cependant une balance défavorable entre la réparation et les atteintes de l'endothélium pourrait favoriser le développement de l'athérosclérose induite

par le SAOS.

Au démarrage du projet, très peu d'études s'étaient intéressées aux capacités de réparation de l'endothélium et elles avaient suggéré qu'elles puissent être altérées, notamment à cause d'une diminution de la quantité de progéniteurs de cellules endothéliales^{32, 33}.

Nous avons pour notre part souhaité étudier la migration des cellules endothéliales, ainsi que la migration des monocytes puisque le passage sous-endothélial de monocytes est également un élément clé dans le processus d'athérogenèse. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'impact de deux cytokines plasmatiques sur la migration cellulaire: le VEGF, connu pour activer la migration cellulaire et dont le taux est élevé chez les patients SAOS³⁴, et à l'inverse, la C-Reactive Protein (CRP) qui est également élevée chez les patients SAOS³⁵ mais qui a un effet inhibiteur de la migration cellulaire³⁶.

Nous avons développé une approche originale, dans laquelle nous avons utilisé en culture cellulaire des sérums de patients SAOS (issus des protocoles cliniques en cours au laboratoire), afin d'étudier leurs effets directs sur les cellules endothéliales et les monocytes.

Nous avons d'abord mesuré les taux de VEGF et CRP dans nos sérums, et constaté qu'ils étaient effectivement plus élevés chez les patients SAOS que chez les sujets contrôle, et que la présence d'un syndrome métabolique (MS) augmentait aussi leurs taux. Nous avons ensuite observé que le sérum de patients apnéiques diminue légèrement la capacité de migration des cellules endothéliales. Cet effet est aggravé lorsqu'on utilise du sérum de patients apnéiques avec syndrome métabolique. L'utilisation d'anticorps bloquants anti-CRP et anti-VEGF a permis de suggérer que cet effet inhibiteur de la migration pourrait être du entre autres à la présence de CRP à des taux élevés, tandis que le VEGF aurait un effet compensateur partiel. De plus, la CRP du sérum de patients SAOS active la migration des monocytes, et ceci est également amplifié avec du sérum de patients apnéiques + MS.

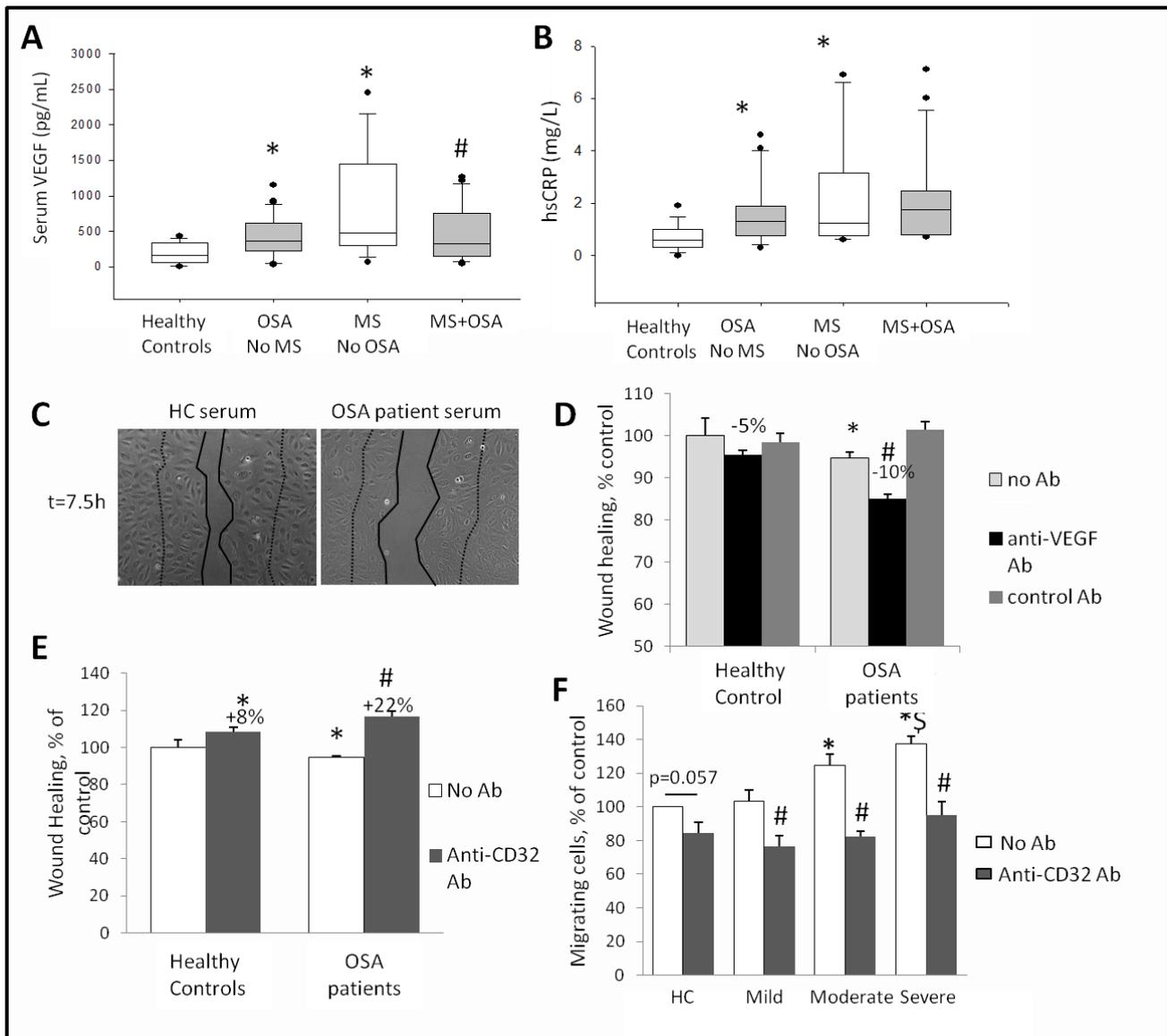


Figure 8: Régulation de la migration endothéliale et de la migration de monocytes par le VEGF et la CRP contenus dans le sérum de patients SAOS. A) Taux sériques de VEGF chez des sujets avec ou sans SAOS et avec ou sans syndrome métabolique (MS). B) Taux de CRP chez les mêmes patients. * $p < 0.05$ vs healthy controls (HC), # $p < 0.05$ vs MS no OSA. C) Expériences de wound healing en microscopie optique. La position des cellules à t0 est matérialisée par le trait pointillé, et la surface comblée entre t0 et t7.5h est quantifiée lorsque les cellules sont traitées avec 20% de sérums de sujets sains ou de patients SAOS. D) Quantification du wound healing obtenu avec les sérums de sujets contrôles ou de patients SAOS, avec ou sans un anticorps bloquant anti-VEGF (0.5 μ g/mL). * $p < 0.05$ vs HC, # $p < 0.05$ vs OSA patients sans anticorps. E) Quantification du wound healing avec les mêmes sérums et un anticorps bloquant anti-CD32, récepteur de la CRP. * $p < 0.05$ vs HC, # $p < 0.05$ vs OSA patients sans anticorps. F) Migration de monocytes THP-1 *in vitro*, avec sérums de sujets contrôle ou de patients SAOS classifiés selon la sévérité de leur pathologie. * $p < 0.05$ vs HC, # $p < 0.05$ vs sans anticorps, \$ $p < 0.05$ vs mild patients.

Avec cette étude, nous suggérons donc que chez les patients apnéiques, une balance entre les taux de VEGF et de CRP circulants dans le sang impacte la fonction des cellules endothéliales et des monocytes de façon délétère. La diminution de la capacité de réparation des cellules endothéliales en wound healing *in vitro*

pourrait signifier une baisse de cette capacité de réparation lors de lésions du vaisseau *in vivo*. L'augmentation de la capacité de migration des monocytes due à la CRP pourrait correspondre à une capacité accrue des monocytes à la transmigration *in vivo*. Ainsi, ces facteurs pourraient se combiner pour augmenter le risque d'athérosclérose.

La méthodologie employée dans cette étude illustre bien l'aspect translationnel de la recherche menée au laboratoire, allant des études cliniques au décryptage des effets cellulaires et moléculaires de l'hypoxie intermittente.

Cette étude a été publiée en 2014³⁷ et a fait l'objet d'un financement Agir@Dom (30.000€).

Briancon-Marjollet A, Henri M, Pepin JL, Lemarie E, Levy P, Tamisier R. (2014) Altered *in vitro* endothelial repair and monocyte migration in obstructive sleep apnea: implication of VEGF and CRP. *Sleep* **2014**, 37, (11), 1825-32

En parallèle de cette étude, j'ai également pu obtenir des sérums issus de volontaires sains soumis à un modèle expérimental d'hypoxie intermittente chez l'homme. Ce modèle de SAOS très pur, puisqu'il ne reproduit que la composante hypoxique indépendamment des efforts respiratoires ou de la fragmentation du sommeil qu'on trouve aussi dans le SAOS, permet d'étudier les mécanismes physiopathologiques. Chez ces volontaires sains, j'ai pu montrer que 14 nuits d'HI suffisent à augmenter significativement le taux de VEGF sérique, confirmant bien ainsi l'impact de l'HI sur la présence de VEGF dans le sang³⁸.

Briancon-Marjollet A, Pepin JL, Weiss JW, Levy P, Tamisier R (2014). Intermittent hypoxia upregulates serum VEGF. *Sleep Med*, 15, (11), 1425-6

Aujourd'hui mon objectif de recherche principal est de continuer à caractériser les altérations des cellules endothéliales induites par l'hypoxie intermittente, et notamment l'augmentation de perméabilité de la barrière endothéliale et le rôle joué par le clivage de la VE-Cadhérine dans ce processus. Dans la lignée de l'étude ci-dessus, nous adopterons une approche translationnelle incluant la caractérisation de sérums de patients et de leurs effets sur les cellules endothéliales *in vitro*. Ce projet, déjà bien entamé, est développé dans la partie III de ce manuscrit. J'y décris également les autres projets de recherche en cours et les perspectives pour les années à venir.

III. PROJETS EN COURS ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

1. SAOS ET DYSFONCTION ENDOTHELIALE: VERS L'IDENTIFICATION DE LA VE-CADHERINE COMME BIOMARQUEUR ET COMME NOUVELLE CIBLE THERAPEUTIQUE DANS L'ATHEROGENESE?

CONTEXTE ET OBJECTIFS

Comme mentionné plus haut, je me suis intéressée ces dernières années à la fonction des cellules endothéliales dans le contexte du SAOS. Les cellules endothéliales ont un rôle majeur dans la physiologie vasculaire, notamment en assurant la libération de molécules vasodilatatrices ou vasoconstrictrices et de molécules inflammatoires, en permettant l'adhésion et le rolling des leucocytes, etc. Un de leurs rôles principaux est de former une barrière (la barrière endothéliale), plus ou moins étanche selon les territoires concernés. En effet, dans des territoires sur lesquels peuvent se développer des plaques d'athérosclérose (aorte et carotides par exemple), l'étanchéité de la barrière endothéliale permet de maintenir l'intégrité de la paroi vasculaire en limitant l'infiltration de leucocytes, d'acides gras et de molécules inflammatoires, qui sont des étapes précoces du processus d'athérosclérose. Ainsi, un maintien de la barrière endothéliale est essentiel au maintien du vaisseau en bonne santé.

L'intégrité de la barrière endothéliale est assurée par une protéine majeure des jonctions adhérentes endothéliales: la VE-(Vascular Endothelial) cadhérine. Cette protéine transmembranaire exclusivement exprimée dans les cellules endothéliales assure la cohésion des cellules entre elles et régule la perméabilité. Un processus de clivage du domaine extracellulaire de la VE-cadhérine a été documenté en 1998, suggérant l'implication de metalloprotéases libérant le domaine adhésif de la protéine³⁹. L'équipe d'Isabelle Vilgrain, à Grenoble, a récemment montré que des cytokines telles que VEGF et TNF- α induisent la phosphorylation sur tyrosine du domaine cytoplasmique de la protéine⁴⁰⁻⁴². Ce processus précède le clivage par des MMP du domaine extracellulaire de 90kDa (sVE) et ceci est empêché par des inhibiteurs de tyrosine kinases, suggérant l'implication de ces tyrosine kinases et notamment de Src⁴¹ (figure 9). Ce fragment soluble de la VE-cadhérine retrouvé dans la circulation sanguine de patients est un marqueur de dysfonction endothéliale dans plusieurs pathologies dont la polyarthrite rhumatoïde⁴¹, l'angiogenèse tumorale⁴³ et des pathologies cardiovasculaires dont l'athérosclérose coronaire⁴⁴.

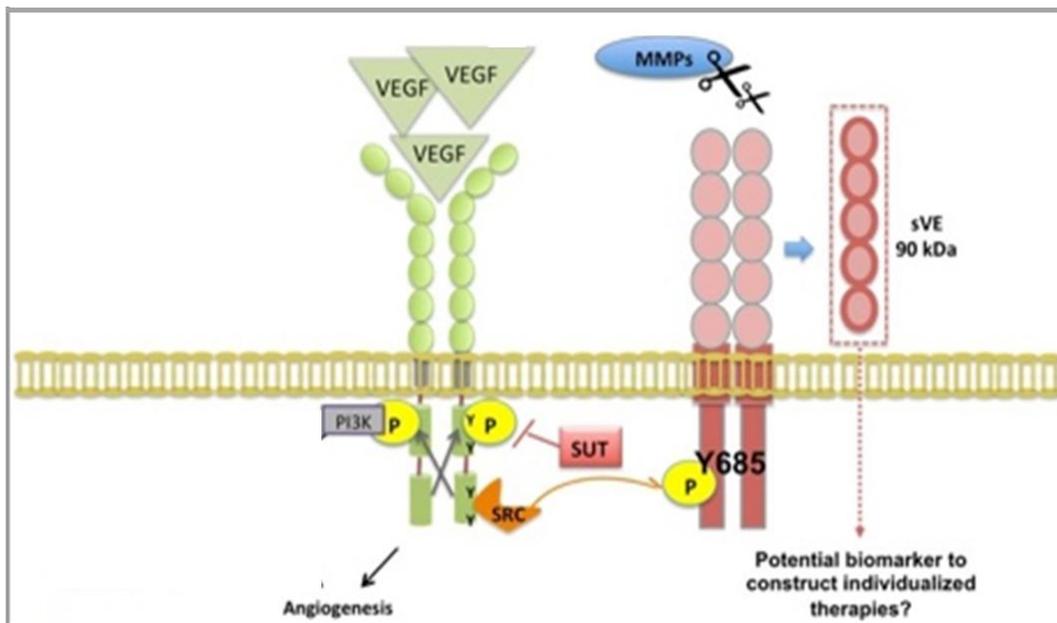


Figure 9. Voie de signalisation liant le VEGF au clivage de la VE-Cadhérine par les MMPs, impliquant la tyrosine kinase Src et la phosphorylation de la VE-Cadhérine sur sa tyrosine 685. Le fragment soluble libéré, sVE, fait 90kD. D'après Polena et al. ⁴⁵. A noter que le TNF α peut également induire le clivage de la VE-Cadhérine ⁴¹ mais le mécanisme demeure méconnu.

Il est largement démontré que le SAOS est un facteur de risque important d'athérosclérose. Une altération de la fonction endothéliale en termes d'inflammation ou de vasodilatation endothélium-dépendante a été maintes fois décrite dans le SAOS ^{12, 46} et les mécanismes impliqués tels que stress oxydant ou inflammation sont assez bien connus¹² (Figure 10).

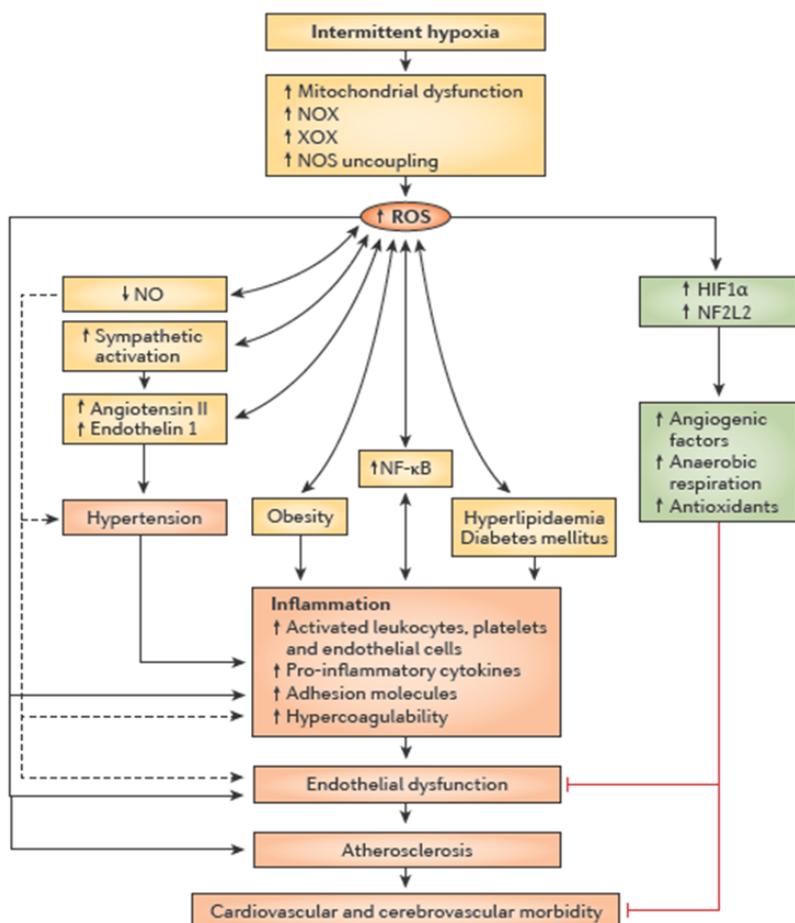


Figure 10. Rôle du stress oxydant et de l'inflammation dans la dysfonction endothéliale induite par l'hypoxie intermittente. D'après Levy et al. ¹²

Cependant aujourd'hui presque rien n'est connu sur la perméabilité endothéliale dans le contexte du SAOS. Une étude seulement a soulevé cette question sur un modèle d'HI cellulaire et a montré une augmentation de perméabilité endothéliale liée au stress oxydant⁴⁷, mais les mécanismes menant à cette augmentation de perméabilité demeurent méconnus. Il apparaît donc important de **comprendre les mécanismes moléculaires de la dysfonction endothéliale précoce chez les patients SAOS**, et notamment de s'intéresser au **rôle du clivage de la VE-cadhérine dans une éventuelle augmentation de perméabilité endothéliale due au SAOS**. Nous pensons pouvoir ainsi **mettre en évidence un nouveau biomarqueur de la dysfonction endothéliale précoce, et identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour permettre une meilleure prise en charge des patients**.

Parmi les mécanismes pouvant mener au clivage de la VE-Cadhérine dans le SAOS, nous pouvons citer le VEGF dont le taux est élevé chez les patients³⁸. Le VEGF est un gène cible du facteur de transcription HIF-1, qui est lui-même activé chez les patients SAOS⁴⁸ ainsi que sur des modèles animaux et cellulaires d'hypoxie intermittente^{15, 16, 31, 49}. Le stress oxydant induit par l'hypoxie intermittente^{50, 51} est un facteur important d'activation de HIF-1¹³. Enfin, le rôle des tyrosine kinases de la famille de Src n'est pas connu dans le SAOS/Hi, cependant il est démontré que le stress oxydant peut activer ces tyrosines kinases^{52, 53}.

Notre hypothèse est que l'hypoxie intermittente induite par le SAOS provoque un clivage de la VE-Cadhérine, lui-même à l'origine d'une augmentation de perméabilité endothéliale et des complications cardiovasculaires qui en découlent, notamment l'athérosclérose. Nous faisons aussi l'hypothèse que la voie de signalisation conduisant à ce clivage implique les espèces réactives de l'oxygène (ROS), le facteur de transcription HIF-1, le VEGF et/ou des tyrosine-kinases. Cette hypothèse de travail mécanistique est résumée sur la figure 11.

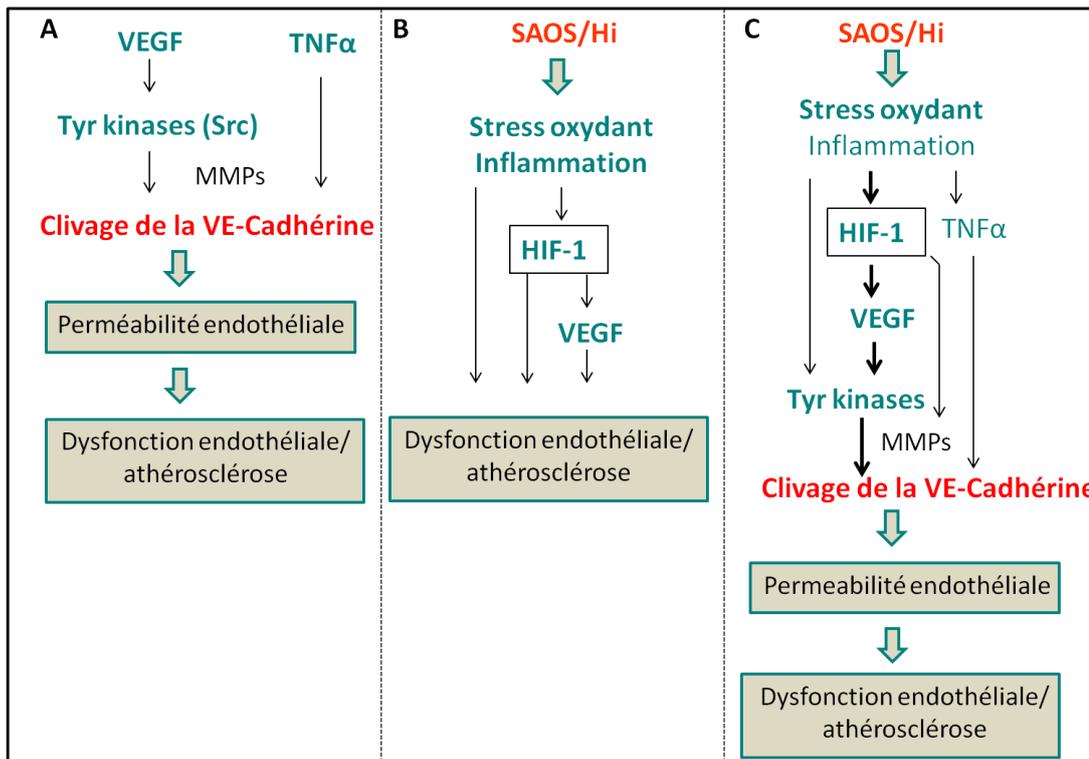


Figure 11. Voies de signalisation et hypothèse mécanistique sous-tendant l'implication du clivage de la VE-Cadhérine dans les conséquences athérogènes du SAOS.

A) Voies de signalisation connues menant au clivage de la VE-Cadhérine. B) Voies de signalisation induites par le SAOS/ l'Hi et impliquées dans ses conséquences cardiovasculaires. A noter que la présentation de ces voies n'est pas exhaustive, seules les voies pertinentes par rapport à notre problématique de clivage de la VE-Cadhérine ont été sélectionnées. C) Hypothèse mécanistique découlant de la combinaison de ces voies. Notre piste de travail privilégiée à court terme est celle représentée par les flèches en gras.

Les objectifs globaux de ce projet de recherche translationnelle sont donc de:

- 1) confirmer le clivage de la VE-cadhérine chez des patients SAOS, et identifier d'éventuels liens avec la sévérité du SAOS et de la dysfonction endothéliale,
- 2) confirmer le clivage de la VE-cadhérine dans des modèles animaux et cellulaires de la pathologie en Hi,
- 3) caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans ce clivage,
- 4) comprendre et réduire l'impact du clivage sur la perméabilité endothéliale et l'athérogenèse,
- 5) proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour les patients SAOS.

Ce travail a démarré avec une stagiaire de Master 2 en 2018 (Olfa Harki), pour laquelle nous avons ensuite obtenu une bourse de thèse auprès de la Fondation du Souffle/Fondation pour la Recherche en Santé Respiratoire. Cette thèse a commencé en novembre 2018, dirigée par le Pr Gilles Faury et co-encadrée par moi-même, en étroite collaboration avec l'équipe d'Isabelle Vilgrain (INSERM/CEA Grenoble).

Dans la suite de cette partie, je vais présenter les premiers résultats obtenus ainsi que les perspectives de recherche.

OBJECTIF 1: RECHERCHE DU CLIVAGE DE LA VE-CADHERINE CHEZ LES PATIENTS SAOS

L'équipe clinique du laboratoire dispose de sérothèques bien documentées de patients suivis en milieu hospitalier pour SAOS pour lesquelles nous pourrions analyser la présence de sVE.

Nous avons dans un premier temps mené une étude sur une cohorte déjà constituée (ClinicalTrials.gov identifier: NCT00764218) de patients présentant un SAOS relativement "pur", c'est-à-dire dépourvu de comorbidités telles que surpoids, hypertension, antécédents cardiovasculaires, etc., ainsi que sur des sujets contrôle dans SAOS. Nous avons analysé la quantité de VE-Cadhérine soluble (sVE) dans le sérum de 31 sujets contrôle et 41 patients SAOS et observé une augmentation significative du taux de sVE chez les patients SAOS. De façon intéressante, ce taux est diminué après 6 mois de traitement du SAOS par Pression Positive Continue, et ce d'autant plus que l'observance du traitement est élevée (diminution significative du taux pour une durée de PPC > 3h/nuit) (figure 12). Nous avons observé une corrélation positive significative entre taux de sVE et sévérité du SAOS telle que mesurée par l'index d'apnées hypopnées (AHI), ainsi qu'entre le taux de sVE et le taux de VEGF sérique. De plus, une analyse statistique multivariée a montré que, après ajustement sur les facteurs cliniques tels que âge, poids etc., la présence d'un SAOS est le principal facteur expliquant la variation du taux de sVE, avec une estimation de l'augmentation de 34% du taux de sVE dans le groupe SAOS après régression linéaire ($p=0.005$). Le genre masculin est également associé significativement à un taux plus élevé de sVE ($p=0.01$). Enfin, le taux de VEGF est associé à une augmentation du taux de sVE de façon presque significative ($p=0.06$) ce qui, compte tenu du faible effectif inclus dans l'analyse statistique, suggère tout de même une réelle association.

Cependant, les patients de cette cohorte n'ont pas de dysfonction endothéliale avérée, leur mesure de PAT moyenne (Peripheral Aterial Tone) est égale à celle des sujets contrôles, nous n'avons donc pas pu mettre en évidence de lien entre taux de sVE et gravité de la dysfonction endothéliale sur cette cohorte. Ceci suggère donc que le clivage de la VE-Cadhérine soit un mécanisme précoce, intervenant avant même la détection clinique d'une dysfonction endothéliale.

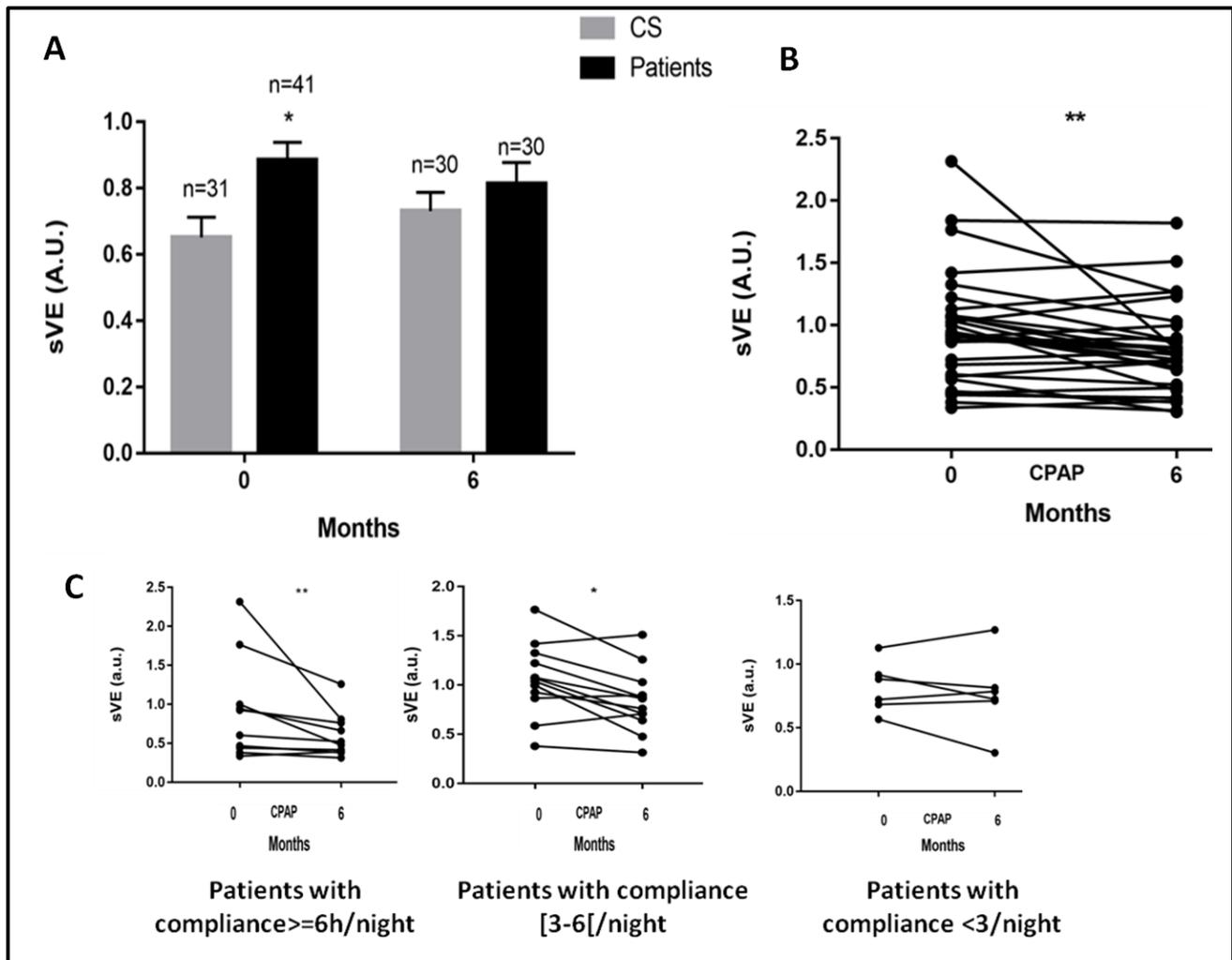


Figure 12: Le taux de sVE sérique est élevé chez les patients SAOS non traités. A) Taux de sVE chez des patients SAOS et des contrôles sains (CS), à mois 0 et mois 6. Les patients SAOS sont traités par PPC pendant ces 6 mois, tandis qu'aucune intervention n'est réalisée pour les contrôles sains. * $p=0.025$, Two-way ANOVA. **B)** Evolution du taux de sVE entre le mois 0 et le mois 6 pour 30 patients SAOS. * $p=0.005$, Wilcoxon test. **C)** Evolution du taux de sVE entre le mois 0 et le mois 6 pour les patients SAOS, en fonction de leur observance de la C (mesurée en nombre d'heures d'utilisation par nuit). ** $p<0.01$ et * $p<0.05$, Wilcoxon test. Il n'y a pas d'effet significatif pour les patients ayant une observance < 3 h/nuit.

De plus, on sait que le SAOS induit des cycles d'hypoxie-réoxygénation répétés, mais aussi une fragmentation du sommeil et des efforts respiratoires accrus. Afin d'étudier l'importance des cycles d'hypoxie intermittente parmi ce 3 facteurs, nous avons évalué le taux de sVE dans une cohorte modèle constituée de volontaires sains exposés à 14 nuits d'hypoxie intermittente ou d'air, dans un essai randomisé contrôlé (ClinicalTrials.gov, Identifiant: NCT02058823). De façon très intéressante, la présence de sVE circulante a été détectée après 14 nuits de traitement par HI, et ce à un niveau environ 20% plus élevé que chez les patients soumis à une exposition d'air normoxique intermittent (Figure 13). Ce résultat montre pour la première fois que 14 nuits d'hypoxie intermittente sont un stimulus suffisant pour provoquer un clivage accru de la VE-

cadhérine, et suggère que parmi les composantes du SAOS, les cycles d'hypoxie-réoxygénation soient un stimulus majeur menant à ce clivage.

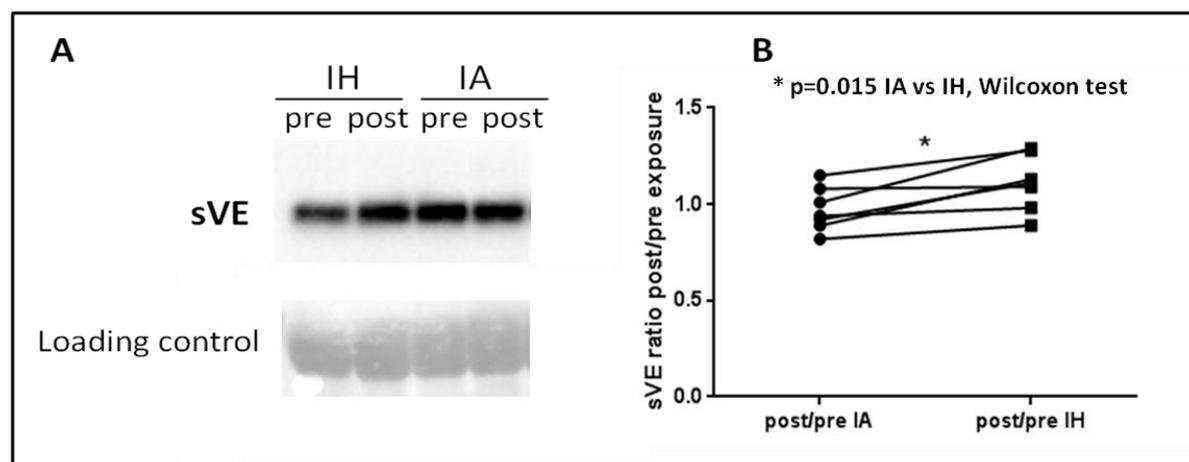


Figure 13: Le taux de sVE augmente chez des volontaires sains soumis à 14 nuits d'Hi. A) Exemple de western blot montrant la bande de sVE chez un volontaire sains avant et après exposition à l'Hi ou à l'air intermittent en guise de contrôle. B) Quantification du taux de sVE chez 7 sujets sains exposés à 14 nuits d'Hi ou d'air intermittent. La sVE est exprimée en ratio pré/post exposition. * p=0.015, Wilcoxon test, n=7.

Nous souhaitons à présent réaliser des dosages dans une population de patients SAOS présentant une dysfonction endothéliale avérée. Les patients seront sélectionnés rétrospectivement parmi des cohortes déjà constituées et phénotypées au CHU. Le design choisi est le suivant: nous incluons des patients ayant une dysfonction endothéliale détectée par mesure de Peripheral Arterial Tone (PAT) anormale ou normale, et qui ont eu 6 mois de traitement soit par PPC efficace, soit par PPC "sham" (inefficace). Autant que possible, nous appairons ces patients sur le sexe, l'âge, l'index de masse corporelle, la prise de médicaments et les antécédents cardiovasculaires. Nous chercherons une différence de taux de sVE entre patients ayant un PAT normal et patients ayant un PAT anormal. Nous étudierons également l'évolution du taux de sVE après traitement, de façon à voir si le traitement efficace induit une baisse du taux de sVE, qui ne serait pas induit par la PPC inefficace. Nous corrèlerons ces taux aux valeurs de PAT des patients, avant et après traitement. Les dosages seront réalisés par ELISA.

Avec ces dosages, nous espérons mettre en évidence un lien fort entre taux de sVE et dysfonction endothéliale chez nos patients SAOS. La sVE pourrait être ainsi considérée comme biomarqueur de la dysfonction endothéliale précoce.

De plus, nous savons que tous les patients ne sont pas répondeurs à la PPC: certains améliorent leur fonction cardiovasculaire sous PPC et d'autres non. Ainsi, si une diminution de sVE s'accompagne d'une diminution du

PAT, la sVE pourrait se positionner comme un potentiel biomarqueur prédictif de la réponse au traitement par PPC.

Si les résultats sont tels qu'espérés, nous envisageons de déposer un brevet sur cet aspect biomarqueur avant de le publier. Nous sommes en contact avec des membres d'Inserm Transfert, filiale de l'INSERM dédiée à la valorisation, qui nous accompagne dans cette réflexion.

OBJECTIF 2: MISE EN EVIDENCE DU CLIVAGE DE LA VE-CADHERINE DANS LES MODELES CELLULAIRES ET ANIMAUX D'HI ET CONSEQUENCES SUR LA PERMEABILITE ENDOTHELIALE

Notre laboratoire dispose d'une plateforme d'exposition à l'Hi, permettant d'exposer des rongeurs ou des cellules à l'Hi. Nous avons utilisé le système d'exposition cellulaire décrit dans la 2e partie de ce manuscrit pour rechercher l'existence d'un clivage de la VE-Cadhérine dans des cellules endothéliales aortiques humaines (HAoEC) soumises à l'Hi. Nous avons observé que 6h d'Hi (cycles de 5 minutes à 2% d'oxygène suivies de 5 minutes à 16%, répétés pendant 6h) suffisent à augmenter significativement le taux de sVE dans le milieu de culture cellulaire (Figure 14A et B).

De plus, nous avons montré que le clivage de la sVE s'accompagne d'une augmentation de la perméabilité endothéliale, telle que mesurée par évaluation de la résistance transendothéliale (TEER) sur une monocouche confluyente de cellules HAEC cultivée dans des Transwells (Figure 14C). Nous avons confirmé ce résultat par mesure de la perméabilité au FITC-Dextran (Figure 14D). Enfin, nous observons en immunofluorescence que l'hypoxie intermittente altère le marquage VE-Cadhérine au niveau des jonctions adhérentes (Figure 14E).

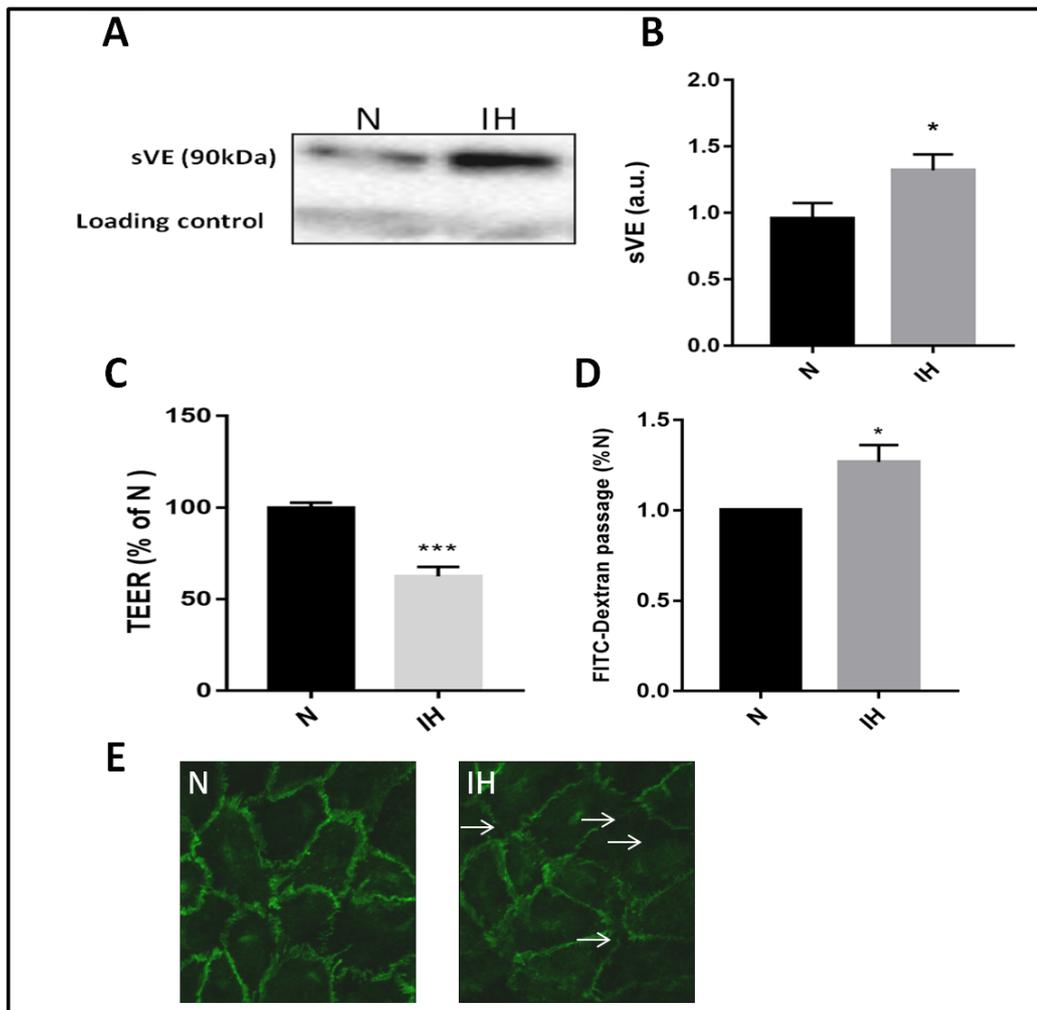


Figure 14: L'hypoxie intermittente provoque le clivage de la VE-Cadhérine *in vitro*. A) Exemple de western-blot montrant la présence de la bande de VE-Cadhérine soluble dans le milieu de culture de cellules HAEC soumises à 6h de normoxie ou d'Hi (après concentration sur centricon et dépôt sur SDS-PAGE). B) Quantification des western blot. * p=0.04 vs N, Student t-test, n=15. C) Evaluation de la perméabilité endothéliale par mesure de la résistance transendothéliale (TEER). *** p<0.001 vs N, Welsch test, n=16. D) Evaluation de la perméabilité endothéliale par passage transendothélial de FITC-Dextran (40kD). * p= 0.01 vs N, Welsch-Test, n=18. E) Immunomarquage de la VE-Cadhérine sur des cellules HAEC soumises à 6h de normoxie ou d'Hi. Les flèches blanches indiquent des zones où le marquage disparaît. L'anticorps utilisé reconnaît le domaine extracellulaire de la VE-Cadhérine, et donc ne reconnaît pas les parties membranaire et cytoplasmique de la protéine si le domaine extracellulaire a été clivé.

Nous allons maintenant rechercher la sVE dans le sérum de souris exposées à l'Hi pour différentes durées (de 1 semaine à 8 semaines d'exposition) de façon à caractériser la cinétique du clivage de la VE-Cadhérine. Nous utiliserons des souris sauvages mais aussi des souris partiellement délétées pour le facteur de transcription HIF-1 (HIF-1 +/-), disponibles au laboratoire, de façon à comprendre le rôle de HIF-1 dans ce clivage (voir Objectif 3). La cinétique de clivage de sVE sera également étudiée chez les souris ApoE^{-/-} exposées à l'Hi, qui seront par la suite utilisées comme modèle d'athérosclérose (voir Objectif 4).

OBJECTIF 3: CARACTERISER LES MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS CE CLIVAGE

Nous souhaitons identifier la ou les voies de signalisation activées par l'Hi menant au clivage de la VE-Cadhérine. Ces expériences de mécanistique s'appuient essentiellement sur le modèle de HAEC *in vitro*, permettant d'investiguer l'impact d'inhibiteurs de différentes voies de signalisation sur le clivage de la VE-Cadhérine et la perméabilité endothéliale. Ainsi, nous avons utilisé un anticorps bloquant anti-VEGF, un antioxydant (tempol, scavenger de ROS), un inhibiteur de HIF-1 (2-méthoxyestradiol), un inhibiteur pan-tyrosine kinases (genistéine) et un inhibiteur spécifique de Src (PP2). La figure 15 présente la place de ces inhibiteurs dans la voie de signalisation hypothétique conduisant au clivage de sVE, et la figure 16 présente les résultats obtenus avec le 2-ME, inhibiteur de HIF-1. Nous avons observé que l'inhibition de HIF-1 abolit les effets de l'Hi sur la perméabilité endothéliale et le clivage de sVE.

De façon intéressante, des résultats similaires ont été obtenus avec tous les autres inhibiteurs testés, ce qui valide l'implication du stress oxydant, de HIF-1, du VEGF et des tyrosine kinases dans le clivage de sVE induit par l'Hi et la perméabilité qui en découle.

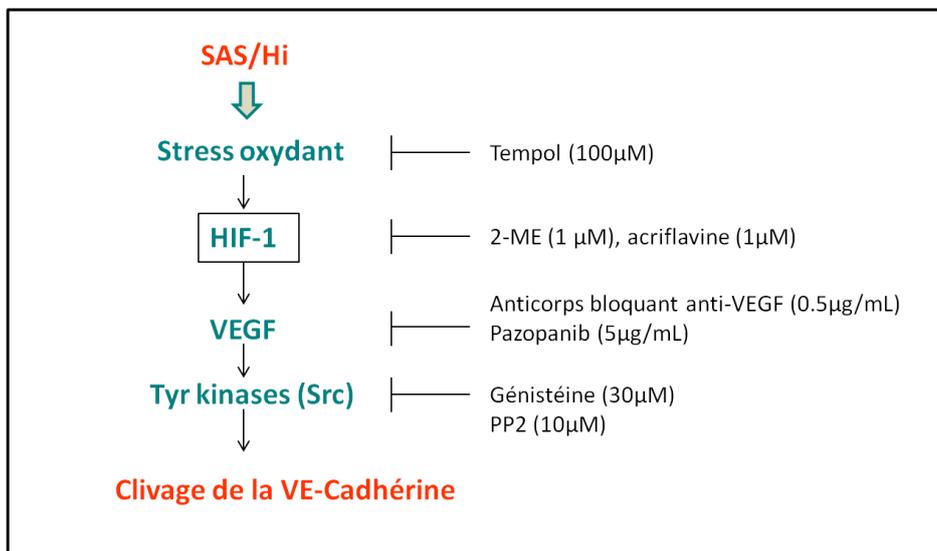


Figure 15: Voie mécanistique hypothétique simplifiée menant au clivage de la vE-Cadhérine induit par l'hypoxie intermittente, et place des différents inhibiteurs utilisés dans cette étude.

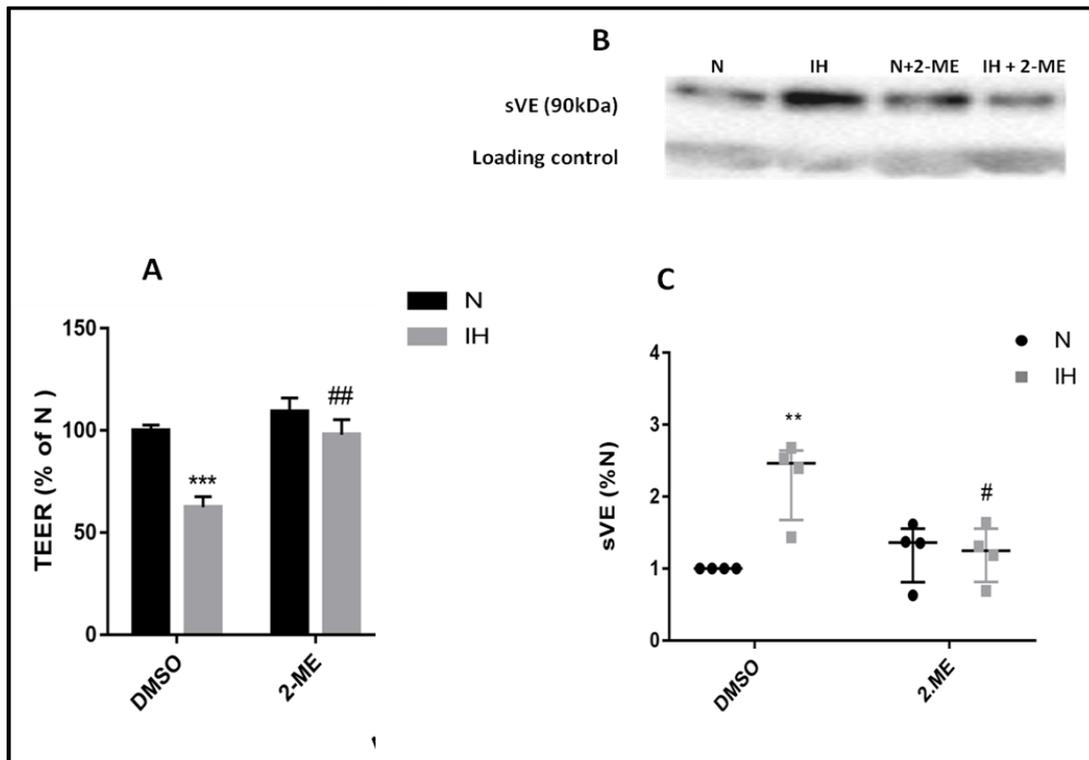


Figure 16: L'inhibition de HIF-1 par le 2-Methoxyestradiol abolit les effets de l'hypoxie intermittente. A) Mesures de TEER avec ou sans exposition à l'Hi et traitement par DMSO ou 2-methoxyestradiol (1 μ M). *** p<0.01 vs N, ## p<0.01 vs IH+DMSO. N= 4 au moins expériences indépendantes. B) Western blot pour sVE dans les surnageants de culture cellulaire (après concentration sur centricon), montrant l'abolition par 2-ME du clivage de sVE induit par l'Hi. C) Quantification de la quantité de sVE dans le surnageant de culture cellulaire. ** p<0.01 vs N, p<0.05 vs IH+DMSO. N=4 expériences indépendantes.

Afin de compléter ces résultats, nous envisageons l'usage d'un inhibiteur spécifique du récepteur VEGFR2 et PDGFR2 (le pazopanib), et d'un autre inhibiteur spécifique de HIF-1 (l'acriflavine). Pour valider l'implication de HIF-1 avec une stratégie d'activation et non d'inhibition, nous utiliserons également du chlorure de cobalt (CoCl₂), qui inhibe les Prolyl Hydroxylases (PHD), enzymes qui provoquent la dégradation de HIF-1. Le CoCl₂ induit donc une augmentation du taux de HIF-1. Nous nous attendons à ce que le CoCl₂, en normoxie, augmente le clivage de la VE-Cadhérine et la perméabilité endothéliale. Enfin, à moyen terme, nous évaluerons le rôle du TNF α dans ce clivage, en utilisant (comme pour le VEGF) un anticorps bloquant. Nous évaluerons également l'impact de l'Hi sur le remodelage du cytosquelette d'actine filamenteuse et globulaire en immunofluorescence.

Enfin, nous évaluerons l'impact de sérums de patients SAOS sur la perméabilité endothéliale (TEER et Dextran-FITC) grâce à notre modèle de HAoEC en transwell. Ainsi, si les sérums induisent une augmentation de perméabilité, nous pourrions suggérer que des cytokines circulantes sont responsables de cet effet, indépendamment de la présence de cycles d'hypoxie-réoxygénation. Le taux de VEGF dans ces sérums étant connus, nous pourrions essayer de corrélérer la présence de VEGF et l'effet sur la perméabilité endothéliale.

Nous pourrions également ajouter des inhibiteurs, tels qu'anticorps bloquant anti-VEGF ou pazopanib, de façon à tester le rôle causal du VEGF dans l'éventuelle augmentation de perméabilité induite par les sérums de patients. Le rôle du TNF α , également connu pour provoquer le clivage de la VE-Cadhérine et présent dans le sérum de patients SAOS, pourra également être investigué avec la même stratégie d'anticorps bloquant.

OBJECTIF 4A: COMPRENDRE L'IMPACT DU CLIVAGE SUR L'ATHEROGENESE

Une fois bien démontrée la libération de sVE et l'augmentation de perméabilité induites par l'Hi, nous souhaitons démontrer qu'il s'agit d'évènements pouvant favoriser l'athérogenèse. Afin de réaliser cet objectif, nous envisageons à la fois des expériences *in vitro* (modèle d'Hi cellulaire) et *in vivo* (modèles de souris exposées à l'Hi).

In vitro, nous pourrions évaluer l'impact athérogène de l'augmentation de perméabilité induite par l'Hi en mesurant la migration de monocytes, exposés ou non à l'Hi, à travers une monocouche de cellules endothéliales également exposées ou non à l'Hi. Ceci permettra d'évaluer l'effet synergique d'une activation monocytaire et d'une activation endothéliale par l'Hi sur l'infiltration leucocytaire. De plus, nous envisageons d'étudier le passage transendothélial de lipides (particules de LDL-cholestérol marquées par un dye fluorescent, Molecular Cloning), autre phénomène important lors de l'athérogenèse.

In vivo, nous étudierons chez des souris C57Bl6 sauvages le taux de sVE sanguin après 2 semaines d'Hi, ainsi que la perméabilité endothéliale par infiltration de Bleu Evans dans différents territoires (aorte, carotide, artère fémorale, mésentère, peau), et le remodelage vasculaire par l'étude immunohistologique des parois des vaisseaux sanguins (épaisseur intima média, dégradation des lames élastiques, infiltration de leucocytes CD45⁺ au niveau de l'aorte). Cette étude sur souris sauvages ne permettra pas d'étudier l'athérogenèse elle-même, les souris C57Bl6 étant résistantes aux lésions d'athérosclérose. Cependant elle constitue une première approche, plus simple et moins coûteuse que les souris ApoE, qui permettra d'évaluer la perméabilité en lien avec le remodelage vasculaire précoce. Ce remodelage vasculaire (augmentation de l'épaisseur intima-média, inflammation locale dans la paroi des vaisseaux,...) est bien décrit dans l'Hi^{16, 54} et on sait qu'il constitue une des étapes précoces de l'athérosclérose. Ce positionnement pré-athérosclérotique permettra d'étudier un rôle précoce du clivage de la VE-Cadhérine dans le développement de l'athérosclérose.

Dans un second temps, nous utiliserons des souris ApoE^{-/-}, qui sont hautement susceptibles à l'athérosclérose. Nous les exposerons 8 semaines à l'hypoxie intermittente, avec un régime alimentaire normal, comme cela est habituellement fait au laboratoire pour observer les effets de l'Hi sur la progression de l'athérosclérose⁵⁵. De même que pour les souris WT, nous étudierons la perméabilité vasculaire au bleu evans, et nous quantifierons la présence d'athérosclérose par marquage Rouge Sirius sur des aortes "en face"

et par étude immunohistologique sur des coupes d'aorte et de carotide. Nous espérons ainsi corrélérer la présence de sVE avec la perméabilité endothéliale et la progression de l'athérosclérose.

OBJECTIFS 4B ET 5: REDUIRE L'IMPACT DU CLIVAGE SUR LA PERMEABILITE ENDOTHELIALE ET L'ATHEROGENESE

In fine, l'objectif de ce projet est de proposer des pistes thérapeutiques anti-athérogènes. Ainsi, nous nous attacherons à tester l'efficacité des inhibiteurs du clivage de la VE-Cadhérine sur les troubles vasculaires induits par l'Hi.

In vitro, nous pourrions tester l'impact des différents inhibiteurs mentionnés plus haut sur l'infiltration de monocytes et le passage transendothélial de lipides type LDL-cholestérol couplés à des fluorophores.

In vivo, nous testerons l'effet des inhibiteurs sur la perméabilité et le remodelage vasculaire et chez les souris sauvages, ainsi que sur le développement des lésions d'athérosclérose chez les souris ApoE $-/-$. Les paramètres évalués seront l'extravasation de bleu Evans pour évaluer la perméabilité, l'épaisseur intima-média et les caractéristiques immunohistologiques et biochimiques de la paroi du vaisseau pour le remodelage vasculaire, et enfin la taille des plaques au niveau des valves aortiques pour évaluer l'athérosclérose chez les souris ApoE $-/-$. Nous envisageons de traiter les souris avec 3 inhibiteurs différents: un inhibiteur de HIF-1 (acriflavine), un inhibiteur du récepteur VEGF (pazopanib), un inhibiteur de Src (saracatinib).

Comme il n'existe pas d'inhibiteur spécifique du clivage en lui-même, mais seulement des inhibiteurs des voies de signalisation menant à ce clivage, nous ne pourrions malheureusement jamais être parfaitement spécifiques du clivage de sVE. Nous prévoyons donc de tester plusieurs inhibiteurs afin d'avoir un faisceau d'arguments suggérant un lien causal entre clivage de sVE et conséquences athérogènes.

2. SAOS ET DYSFONCTION ENDOTHELIALE: ROLE DE LA VE-CADHERINE DANS LA DISSEMINATION METASTATIQUE ET L'ANGIOGENESE TUMORALE?

A moyen et long terme, je souhaite également développer une activité de recherche portant sur le rôle de la VE-Cadhérine dans l'angiogenèse tumorale et la dissémination métastatique dans le SAOS, en collaboration avec Mélanie Minoves qui travaille au laboratoire sur les liens entre SAOS et cancer. En effet, depuis quelques années, un faisceau croissant d'études suggère que le SAOS et l'hypoxie intermittente sont associés à un risque accru de cancer et d'apparition de métastases⁴⁹. Parmi les mécanismes qui pourraient être impliqués, l'activation de HIF-1 et la synthèse de VEGF par l'HI chez les patients SAOS pourraient favoriser l'angiogenèse et la croissance tumorale, en agissant sur les cellules endothéliales et sur les cellules tumorales. De façon intéressante, des résultats non publiés de Mélanie Minoves suggèrent que dans un modèle de cancer mammaire orthotopique murin, le taux d'oxygène dans les tumeurs est plus élevé chez les animaux soumis à Hi que chez les animaux normoxiques, ce qui pourrait s'expliquer par une angiogenèse accrue dans les tumeurs d'animaux hypoxiques. Dans ce contexte, nous faisons l'hypothèse que l'altération de la barrière endothéliale, par le clivage de la VE-Cadhérine, pourrait favoriser la dissémination de métastases ainsi que l'angiogenèse tumorale.

OBJECTIF 1 : IMPACT DE L'HI SUR L'ANGIOGENESE TUMORALE

L'équipe d'Isabelle Vilgrain s'intéresse depuis déjà plusieurs années au rôle de la VE-Cadhérine dans l'angiogenèse tumorale et a montré récemment que le fragment clivé de la VE-Cadhérine constituait un marqueur associé au pronostic du cancer et à la réponse aux traitements par inhibiteurs de tyrosine kinases⁴³. Il est bien connu que l'internalisation de la VE-Cadhérine suite à sa phosphorylation, en désorganisant les jonctions adhérentes, régule la dynamique du cytosquelette et favorise la migration des cellules endothéliales et l'angiogenèse^{56, 57}. On peut supposer que le clivage de la VE-Cadhérine aura les mêmes effets que son internalisation et donc émettre l'hypothèse que l'angiogenèse tumorale soit favorisée lorsque le clivage de la VE-Cadhérine augmente (Figure 17).

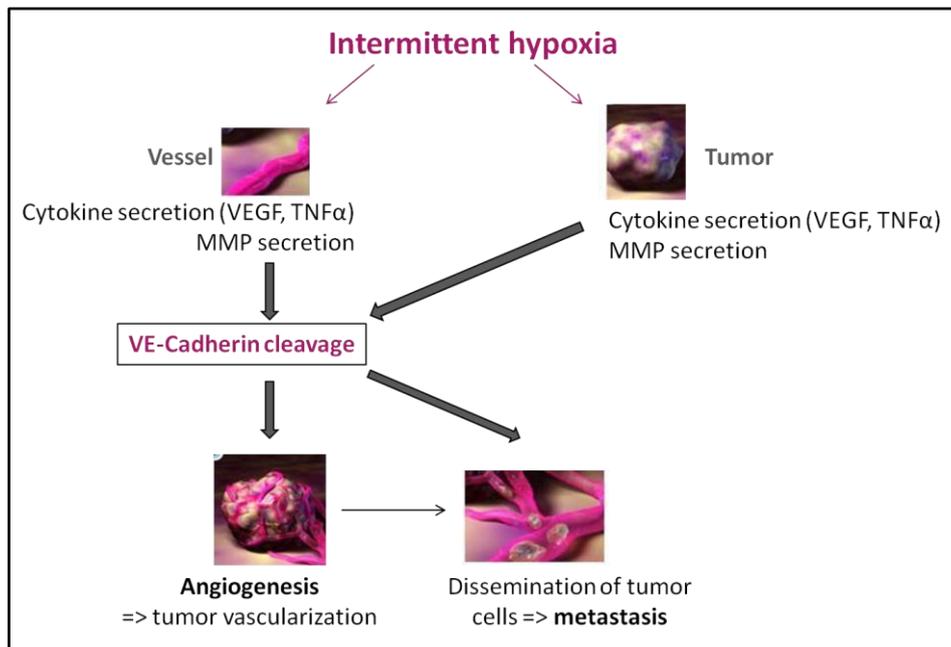


Figure 17: Rôle du clivage de la VE-Cadhérine dans l'angiogenèse et la dissémination de métastases: hypothèses mécanistiques.

Afin d'étudier l'impact de l'Hi sur l'angiogenèse tumorale, nous envisageons dans un premier temps d'utiliser un modèle de tubulogenèse *in vitro*, sur une matrice tridimensionnelle type matrigelIII faudra dans un premier temps vérifier les cycles d'Hi que nous sommes capables d'obtenir avec une matrice 3D dans notre système d'Hi cellulaire. Si ceux ci sont satisfaisants, nous pourrons exposer des cellules endothéliales à l'Hi et étudier leur capacité d'angiogenèse dans ce modèle. Si celle-ci est modifiée, nous pourrons étudier les mécanismes impliqués en ajoutant différents inhibiteurs dans le milieu de culture, et notamment inhibiteurs de MMP (TIMP), inhibiteurs du VEGF (pazopanib ou anticorps bloquant) ou de HIF-1 (acriflavine). Pour ce modèle de tubulogenèse, j'envisage d'utiliser des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) qui sont le type cellulaire classiquement utilisé dans la littérature, ou éventuellement des HMVEC (Human Microvascular Endothelial Cells) qui sont pertinentes pour un modèle d'angiogenèse tumorale, plutôt que les HAEC qui sont de gros vaisseaux (aorte) et donc moins pertinentes dans ce contexte.

A plus long terme, nous souhaitons utiliser un modèle plus complet d'angiogenèse tumorale, qui combinerait cellules endothéliales et cellules tumorales mammaires (HepG2 ou 4T1) en sphéroïdes dans une matrice 3D, de façon à étudier l'angiogenèse dans l'environnement tumoral. Cependant cette approche nécessite la mise au point d'un modèle cellulaire assez complexe, ces expériences sont donc envisagées à moyen/long terme en fonction de l'avancée de la mise au point du modèle. Nous faisons l'hypothèse que les cellules tumorales sont capables de moduler l'angiogenèse tumorale, par exemple via la sécrétion de facteurs de croissance ou de MMP. Ainsi, l'exposition simultanée de cellules endothéliales et des cellules tumorales à l'hypoxie

intermittente pourrait, de façon synergique, conduire à une stimulation de l'angiogénèse. Là encore les voies de signalisation impliquées seront étudiées.

OBJECTIF 2 : IMPACT DE L'HI SUR LA DISSEMINATION METASTATIQUE

Les données de Mélanie Minoves (non publiées) suggèrent que la migration des cellules tumorales mammaires (4T1) et hépatiques (HepG2) est augmentée lorsque celles ci sont exposées à l'hypoxie intermittente *in vitro*. L'augmentation de la perméabilité endothéliale des vaisseaux tumoraux, liée au clivage de la VE-Cadhérine, pourrait alors faciliter le passage de ces cellules tumorales à travers la barrière endothéliale vers la circulation sanguine, et donc faciliter la dissémination de métastases. Ce clivage pourrait être induit par des signaux provenant des cellules endothéliales et/ou des cellules tumorales (Figure 17).

Comme dans l'étude de l'athérogenèse, je souhaite combiner différents modèles d'étude afin d'étudier cette question: cellulaire, préclinique et clinique.

- à l'échelle cellulaire: nous envisageons d'étudier la migration des cellules 4T1 et/ou HepG2 à travers une monocouche de cellules endothéliales (test de transmigration en transwell). Dans ce modèle de co-culture, nous pourrions exposer préalablement à l'HI l'un ou l'autre de ces types cellulaires, ou les 2 simultanément, de façon à étudier l'importance relative de l'exposition à l'HI de chacun de ces types cellulaires et l'effet délétère additionnel possible si les 2 types cellulaires sont exposés.

D'un point de vue mécanistique, nous nous intéresserons comme précédemment à l'activation de HIF-1 et à l'expression de ses gènes cibles VEGF et MMP (2 et 9), aussi bien dans les cellules endothéliales que dans les cellules tumorales. Nous faisons en effet l'hypothèse que les cellules tumorales peuvent elles mêmes sécréter des molécules (cytokines, facteurs de croissance, MMP,...) qui vont permettre le clivage de la VE-Cadhérine et donc l'augmentation de la perméabilité endothéliale. Afin d'étudier ceci, nous utiliserons des milieux conditionnés de cellules 4T1 et/ou HepG2 exposées à l'Hi, et évaluerons leur impact sur la perméabilité endothéliale en mesurant la résistance transendothéliale et la perméabilité au dextran-FITC. Le rôle des différentes molécules pourra être évalué par l'addition d'inhibiteurs ou d'anticorps bloquants.

- chez l'animal: nous disposons d'un modèle murin de cancer au laboratoire, obtenu par implantation orthotopique de cellules cancéreuses mammaires (cellules 4T1). Il permet d'étudier l'apparition de métastases abdominales ou pulmonaires par imagerie et analyse anatomopathologique. Si les résultats sur modèles cellulaires sont encourageants, nous envisageons d'utiliser ce modèle pour déterminer le rôle du clivage de la VE-Cadhérine dans le développement de ces cancers et dans l'apparition des métastases. La même approche que pour l'athérogenèse, basée sur l'utilisation d'inhibiteurs des voies de signalisation du clivage de sVE, pourra être utilisée.

- Enfin, une cohorte de patients atteints de stéatose hépatique non alcoolique (NAFLD), avec ou sans SAOS, est en train d'être mise en place au laboratoire par Mélanie Minovès. L'objectif est d'évaluer la prévalence de SAOS chez les patients NAFLD, ainsi que la relation entre SAOS et évolution de la NAFLD en hépatocarcinome (HCC). Je souhaite donc étudier le taux de VE-Cadhérine chez ces patients en le corrélant à la présence de SAOS et l'évolution de l'atteinte de leur foie. Nous pourrions ainsi commencer à explorer le potentiel de biomarqueur de la sVE dans le contexte de l'évolution d'une NAFLD vers un HCC.

Ce travail sera mené en collaboration avec Mélanie Minoves, avec l'équipe d'Isabelle Vilgrain pour les aspects VE-Cadhérine, et avec Florence Puch (CHU Grenoble) pour la culture de cellules cancéreuses en sphéroïdes et l'étude des MMPs. Nous interagissons également avec Odile Flihol et Nadia Cherradi (CEA Grenoble) qui nous aident pour les modèles de culture en 3D.

3. IMPACT DE L'HYPOXIE INTERMITTENTE SUR LA PERMEABILITE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

En plus des conséquences du clivage de VE-Cadhérine sur la perméabilité vasculaire dans la circulation systémique, je souhaite à moyen terme m'intéresser à la perméabilité au niveau des vaisseaux cérébraux. Ce projet est en collaboration avec les Pr Frédéric Roche et Nathalie Perek à St Etienne, ainsi qu'avec les Dr Samuel Vergès et Julien Brugniaux, membres du laboratoire HP2 travaillant dans l'équipe "hypoxie-exercice".

La mise au point du dispositif d'HI cellulaire m'a permis de collaborer avec les équipes du Pr Roche et du Pr Perek à St Etienne depuis quelques années. Le Pr Roche travaille sur le déclin cognitif chez les patients SAOS âgés⁵⁸, tandis que le Pr Perek travaille sur des modèles cellulaires de barrière hémato-encéphalique. Une doctorante de leur laboratoire a ainsi travaillé sur l'hypothèse selon laquelle l'hypoxie intermittente pourrait augmenter la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, phénomène pouvant être à l'origine de troubles cognitifs. Elle a mis au point un modèle expérimental de BHE constitué de cellules endothéliales et d'astrocytes en coculture, puis est venue dans notre laboratoire l'exposer à l'hypoxie intermittente. Nous avons pu observer que l'HI augmente la perméabilité de ce modèle de BHE, et que des inhibiteurs chimiques de HIF-1 (2-ME et YC-1) bloquent ce phénomène. Cette augmentation de perméabilité est associée à une diminution d'expression des protéines des jonctions serrées telles que ZO-1, occludine et claudine, également bloquée par les inhibiteurs de HIF-1. L'expression et le clivage de la VE-Cadhérine n'ont cependant pas encore été étudiés. La doctorante a également mis en évidence une augmentation des pompes d'efflux

de la famille des transporteurs ABC, BCRP et MRP, ce qui suggère une mise en place de mécanismes protecteurs au niveau de la BHE.

Ainsi, nous retrouvons au niveau de la BHE un rôle fondamental de HIF-1 dans les altérations vasculaires induites par l'hypoxie intermittente.

Ce travail, décrit dans la thèse de Morgane Chatard, est aujourd'hui en cours de finalisation pour être soumis prochainement pour publication. Il se poursuit également dans un nouveau projet de recherche.

L'hypothèse qui sous-tend notre projet est que de multiples facteurs peuvent se combiner pour induire une altération de la BHE et mener à des troubles cognitifs: en plus de l'activation de HIF-1, nous envisageons le rôle du stress oxydant, de l'inflammation, mais aussi d'exosomes présents dans le sang. Nous souhaitons également nous intéresser au clivage de la VE-Cadhérine, qui n'a pas encore été étudié dans ce contexte. Nous souhaitons donc étudier l'impact de ces facteurs en combinant différentes échelles d'études:

- sur les patients, l'équipe du Pr Roche dispose de cohortes de patients âgés souffrant de SAOS et pour qui d'éventuels troubles cognitifs ainsi que la morphologie et la perméabilité cérébrale sont documentés. Nous allons caractériser les sérums de ces patients (recherche de cytokines inflammatoires, exosomes, marqueurs de stress oxydant, présence de sVE...) et chercher des corrélations avec les paramètres cliniques.

- De plus, l'équipe de St Etienne utilisera ces sérums pour tester leurs effets sur la perméabilité du modèle de BHE *in vitro*.

- Le modèle cellulaire de BHE, exposé à l'Hi, permettra également le décryptage du rôle de plusieurs voies de signalisation, tel que cela a déjà été fait pour HIF-1 par Morgane Chatard. Nous nous intéresserons au stress oxydant et à l'inflammation, au clivage de la VE-Cadhérine, ainsi qu'aux exosomes.

- Enfin, des études sur rongeurs soumis à Hi sont prévues. Elles permettront de tester l'impact de l'Hi sur la perméabilité de la BHE et sur la fonction cognitive des animaux, et d'étudier les facteurs impliqués. Des pistes thérapeutiques pourront être proposées à partir du décryptage des mécanismes sur le modèle cellulaire, et testées chez les souris. De plus, en collaboration avec l'équipe d'Emmanuel Barbier au GIN (Grenoble Institut de Neurosciences), nous prévoyons d'utiliser un modèle de souris exposées à l'Hi et soumises à une ligature des artères médianes cérébrales comme modèle d'ischémie cérébrale (stroke). Cette ischémie étant connue pour ses conséquences délétères et notamment une augmentation de la perméabilité de la BHE, nous nous intéresserons à l'impact de l'Hi sur ce phénomène, et notamment au rôle de la VE-Cadhérine, du stress oxydant et de l'inflammation dans son contrôle.

Des demandes de financement déposées auprès de la FRM et de l'ANR pour ces projets en 2018-2019

n'ayant pas abouti, nous prévoyons de déposer une demande à l'ANR à l'automne 2019, regroupant tous ces acteurs.

4. CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE LA CROISSANCE DE NEURONES SUR GRAPHENE

Enfin, en marge de mes activités liées à la thématique principale du laboratoire HP2, mes compétences en neurosciences, et notamment dans la culture de neurones primaires, sont encore aujourd'hui valorisées dans une collaboration avec le Dr Cécile Delacour, de l'Institut Néel (Grenoble). Son équipe s'intéresse à la croissance des neurones sur un substrat biocompatible, le graphène. Les objectifs à court terme sont de caractériser la croissance et l'activité de réseaux neuronaux sur graphène, avec à long terme des applications possibles en thérapeutique grâce à la réimplantation de réseaux fonctionnels *in vivo*. Le Dr Delacour est physicienne de formation, et notre collaboration me permet d'apporter à sa thématique des compétences en biologie fondamentale et notamment en physiologie neuronale.

Cette collaboration a donné lieu à la publication de 3 études à ce jour^{59, 60, 61}.

Veliev F, **Briançon-Marjollet A**, Bouchiat V, Delacour C. (2016) Impact of crystalline quality on neuronal affinity of pristine graphene. *Biomaterials*, 2016 Apr;86:33-41.

Veliev F, Han Z, Kalita D, **Briançon-Marjollet A**, Bouchiat V, Delacour C. Recording Spikes Activity in Cultured Hippocampal Neurons Using Flexible or Transparent Graphene Transistors. *Front Neurosci*. 2017 Aug 28;11:466

Veliev F, Kalita D, Bourrier A, Belloir T, **Briançon-Marjollet A**, Albrieux M, Bouchiat V, Delacour C. Sensing ion channels in neuronal networks with graphene transistors. *2D Materials*, 2018 Oct, 5(4).

Par ailleurs, le Dr Delacour vient d'obtenir une ANR Jeune Chercheur à l'automne 2018, à laquelle je participe. Cette collaboration va donc continuer dans les années à venir. L'objectif de ce projet ANR est de développer des systèmes de senseurs multimodaux, permettant de détecter l'activité électrique des neurones couplée à de l'imagerie optique, basés sur la technologie du graphène. *In vitro*, nous allons poursuivre la caractérisation des mécanismes sous-tendant la très bonne adhérence des neurones sur le graphène, et étudier l'adhérence des cellules gliales, qui sont à la fois nécessaires à une bonne survie des neurones mais peuvent également représenter un obstacle entre le neurone et le capteur, perturbant la détection des signaux électriques. Une partie du projet étudiera la biocompatibilité de ces capteurs *in vivo*, après implantation chez le rongeur. Enfin, la capacité des capteurs à décrire les signaux électriques dans des réseaux neuronaux sera testée sur des réseaux neuronaux modèles et des cultures de neurones primaires.

IV- CONCLUSIONS

Ainsi, depuis mon arrivée au laboratoire HP2 il y a 10 ans, j'ai abordé différents aspects des conséquences de l'hypoxie intermittente : d'un point de vue métabolique avec les travaux sur la graisse et l'endothéline-1 ou les rats obèses, et d'un point de vue vasculaire avec le travail sur la réparation endothéliale et le VEGF. Je me suis formée, d'un point de vue scientifique et technique, à de nombreux nouveaux aspects par rapport à ma formation initiale de doctorat et post-doctorat. J'ai eu l'opportunité d'encadrer de nombreux étudiants en licence et master, et de participer à l'encadrement d'étudiants en thèse.

Je souhaite, dans les années à venir, continuer à développer ma propre thématique qui s'inscrit dans la continuité des travaux que j'ai menés sur les conséquences vasculaires de l'HI. En effet, la collaboration avec Isabelle Vilgrain, spécialiste de la VE-Cadhérine, qui a démarré il y a bientôt deux ans, ouvre un tout nouveau champ de recherches pour lequel absolument rien n'est connu: la régulation du clivage de la VE-Cadhérine dans le SAOS, et ses conséquences. L'étude de ce clivage dans le processus athérogène induit par le SAOS/HI, que nous avons déjà démarré, sera ma priorité pour les 3-4 ans à venir. A plus long terme, je souhaite également aborder l'impact de ce clivage dans un contexte de cancérogenèse et de fonction vasculaire cérébrale. La figure 18 récapitule les axes de travail exposés dans ce manuscrit.

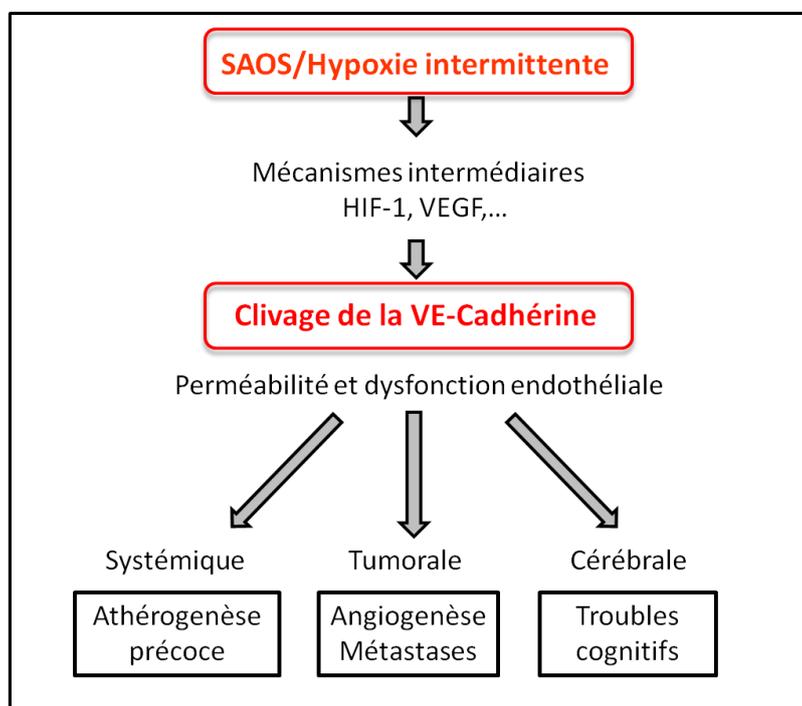


Figure 18: Synthèse des axes de recherche proposés afin de mettre en évidence le rôle du clivage de la VE-Cadhérine dans les conséquences vasculaires du syndrome d'apnées du sommeil, sur du court terme (athérogenèse précoce) ou du moyen à long terme (angiogenèse et métastases, troubles cognitifs).

Ce travail s'appuiera sur des collaborations externes mais aussi internes avec les collègues cliniciens, illustrant bien la démarche translationnelle que j'essaie de mettre en œuvre avec les autres membres du laboratoire. Par ailleurs, je continuerai à valoriser mon expertise de l'Hi cellulaire et de la physiologie endothéliale dans diverses collaborations, telles que celles mises en place avec C. Delacour ou avec R. Debret, que j'espère continuer à développer dans les années à venir.

L'ensemble de ces travaux impliquera nécessairement la participation d'étudiants en thèse que j'encadrerai, ce qui justifie ma démarche d'obtention de l'HDR aujourd'hui.

V- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Debant, A.; Serra-Pages, C.; Seipel, K.; O'Brien, S.; Tang, M.; Park, S. H.; Streuli, M., The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, 93, (11), 5466-71.
2. Bellanger, J. M.; Astier, C.; Sardet, C.; Ohta, Y.; Stossel, T. P.; Debant, A., The Rac1- and RhoG-specific GEF domain of Trio targets filamin to remodel cytoskeletal actin. *Nat Cell Biol* **2000**, 2, (12), 888-92.
3. Blangy, A.; Vignal, E.; Schmidt, S.; Debant, A.; Gauthier-Rouviere, C.; Fort, P., TrioGEF1 controls Rac- and Cdc42-dependent cell structures through the direct activation of rhoG. *J Cell Sci* **2000**, 113 (Pt 4), 729-39.
4. Estrach, S.; Schmidt, S.; Diriong, S.; Penna, A.; Blangy, A.; Fort, P.; Debant, A., The Human Rho-GEF trio and its target GTPase RhoG are involved in the NGF pathway, leading to neurite outgrowth. *Curr Biol* **2002**, 12, (4), 307-12.
5. Briancon-Marjollet, A.; Ghogha, A.; Nawabi, H.; Triki, I.; Auziol, C.; Fromont, S.; Piche, C.; Enslin, H.; Chebli, K.; Cloutier, J. F.; Castellani, V.; Debant, A.; Lamarche-Vane, N., Trio mediates netrin-1-induced Rac1 activation in axon outgrowth and guidance. *Mol Cell Biol* **2008**, 28, (7), 2314-23.
6. Portales-Casamar, E.; Briancon-Marjollet, A.; Fromont, S.; Triboulet, R.; Debant, A., Identification of novel neuronal isoforms of the Rho-GEF Trio. *Biol Cell* **2006**, 98, (3), 183-93.
7. Bellanger, J. M.; Estrach, S.; Schmidt, S.; Briancon-Marjollet, A.; Zugasti, O.; Fromont, S.; Debant, A., Different regulation of the Trio Dbl-Homology domains by their associated PH domains. *Biol Cell* **2003**, 95, (9), 625-34.
8. Salinas, S.; Briancon-Marjollet, A.; Bossis, G.; Lopez, M. A.; Piechaczyk, M.; Jariel-Encontre, I.; Debant, A.; Hipskind, R. A., SUMOylation regulates nucleo-cytoplasmic shuttling of Elk-1. *J Cell Biol* **2004**, 165, (6), 767-73.
9. Pignata, A.; Ducuing, H.; Castellani, V., Commissural axon navigation: Control of midline crossing in the vertebrate spinal cord by the semaphorin 3B signaling. *Cell Adh Migr* **2016**, 10, (6), 604-617.
10. Nawabi, H.; Briancon-Marjollet, A.; Clark, C.; Sanyas, I.; Takamatsu, H.; Okuno, T.; Kumanogoh, A.; Bozon, M.; Takeshima, K.; Yoshida, Y.; Moret, F.; Abouzid, K.; Castellani, V., A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes Dev* **2010**, 24, (4), 396-410.
11. Briancon-Marjollet, A.; Balenci, L.; Fernandez, M.; Esteve, F.; Honnorat, J.; Farion, R.; Beaumont, M.; Barbier, E.; Remy, C.; Baudier, J., NG2-expressing glial precursor cells are a new potential oligodendroglia cell initiating population in N-ethyl-N-nitrosourea-induced gliomagenesis. *Carcinogenesis* **2010**, 31, (10), 1718-25.
12. Levy, P.; Kohler, M.; McNicholas, W. T.; Barbe, F.; McEvoy, R. D.; Somers, V. K.; Lavie, L.; Pepin, J. L., Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, 1, 15015.
13. Semenza, G. L., Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* **2009**, 24, 97-106.
14. Belaidi, E.; Morand, J.; Gras, E.; Pepin, J. L.; Godin-Ribuot, D., Targeting the ROS-HIF-1-endothelin axis as a therapeutic approach for the treatment of obstructive sleep apnea-related cardiovascular complications. *Pharmacol Ther* **2016**, 168, 1-11.
15. Belaidi, E.; Joyeux-Faure, M.; Ribuot, C.; Launois, S. H.; Levy, P.; Godin-Ribuot, D., Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea. *J Am Coll Cardiol* **2009**, 53, (15), 1309-17.
16. Gras, E.; Belaidi, E.; Briancon-Marjollet, A.; Pepin, J. L.; Arnaud, C.; Godin-Ribuot, D., Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation. *J Appl Physiol (1985)* **2016**, 120, (4), 437-43.
17. Juan, C. C.; Chang, C. L.; Lai, Y. H.; Ho, L. T., Endothelin-1 induces lipolysis in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2005**, 288, (6), E1146-52.

18. Drager, L. F.; Jun, J. C.; Polotsky, V. Y., Metabolic consequences of intermittent hypoxia: relevance to obstructive sleep apnea. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2010**, *24*, 843-51.
19. Drager, L. F.; Togeiro, S. M.; Polotsky, V. Y.; Lorenzi-Filho, G., Obstructive sleep apnea: a cardiometabolic risk in obesity and the metabolic syndrome. *J Am Coll Cardiol* **2013**, *62*, (7), 569-76.
20. Trzepizur, W.; Le Vaillant, M.; Meslier, N.; Pigeanne, T.; Masson, P.; Humeau, M. P.; Bizieux-Thaminy, A.; Goupil, F.; Chollet, S.; Ducluzeau, P. H.; Gagnadoux, F., Independent association between nocturnal intermittent hypoxemia and metabolic dyslipidemia. *Chest* **2013**, *143*, (6), 1584-9.
21. Briancon-Marjollet, A.; Monneret, D.; Henri, M.; Hazane-Puch, F.; Pepin, J. L.; Faure, P.; Godin-Ribuot, D., Endothelin regulates intermittent hypoxia-induced lipolytic remodelling of adipose tissue and phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *J Physiol* **2015**, *594*, (6), 1727-40.
22. Bonsignore, M. R.; McNicholas, W. T.; Montserrat, J. M.; Eckel, J., Adipose tissue in obesity and obstructive sleep apnoea. In *Eur Respir J*, Switzerland, 2012; Vol. 39, pp 746-67.
23. Briancon-Marjollet, A.; Monneret, D.; Henri, M.; Joyeux-Faure, M.; Totoson, P.; Cachot, S.; Faure, P.; Godin-Ribuot, D., Intermittent hypoxia in obese Zucker rats: cardiometabolic and inflammatory effects. *Exp Physiol* **2016**, *101*, (11), 1432-1442.
24. Briancon-Marjollet, A.; Weiszenstein, M.; Henri, M.; Thomas, A.; Godin-Ribuot, D.; Polak, J., The impact of sleep disorders on glucose metabolism: endocrine and molecular mechanisms. *Diabetol Metab Syndr* **2015**, *7*, 25.
25. Maret, W., Zinc and human disease. *Met Ions Life Sci* **2013**, *13*, 389-414.
26. Prasad, A. S.; Beck, F. W.; Snell, D. C.; Kucuk, O., Zinc in cancer prevention. *Nutr Cancer* **2009**, *61*, (6), 879-87.
27. Choi, S. M.; Choi, K. O.; Park, Y. K.; Cho, H.; Yang, E. G.; Park, H., Clioquinol, a Cu(II)/Zn(II) chelator, inhibits both ubiquitination and asparagine hydroxylation of hypoxia-inducible factor-1alpha, leading to expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin in normoxic cells. *J Biol Chem* **2006**, *281*, (45), 34056-63.
28. Nardinocchi, L.; Pantisano, V.; Puca, R.; Porru, M.; Aiello, A.; Grasselli, A.; Leonetti, C.; Safran, M.; Rechavi, G.; Givol, D.; Farsetti, A.; D'Orazi, G., Zinc downregulates HIF-1alpha and inhibits its activity in tumor cells in vitro and in vivo. *PLoS One* **2010**, *5*, (12), e15048.
29. Chen, P. C.; Guo, C. H.; Tseng, C. J.; Wang, K. C.; Liu, P. J., Blood trace minerals concentrations and oxidative stress in patients with obstructive sleep apnea. *J Nutr Health Aging* **2013**, *17*, (8), 639-44.
30. Dematteis, M.; Godin-Ribuot, D.; Arnaud, C.; Ribuot, C.; Stanke-Labesque, F.; Pepin, J. L.; Levy, P., Cardiovascular consequences of sleep-disordered breathing: contribution of animal models to understanding the human disease. *ILAR J* **2009**, *50*, (3), 262-81.
31. Minoves, M.; Morand, J.; Perriot, F.; Chatard, M.; Gonthier, B.; Lemarie, E.; Menut, J. B.; Polak, J.; Pepin, J. L.; Godin-Ribuot, D.; Briancon-Marjollet, A., An innovative intermittent hypoxia model for cell cultures allowing fast Po2 oscillations with minimal gas consumption. *Am J Physiol Cell Physiol* **2017**, *313*, (4), C460-C468.
32. Feng, J.; Zhang, D.; Chen, B., Endothelial mechanisms of endothelial dysfunction in patients with obstructive sleep apnea. *Sleep Breath* **2012**, *16*, (2), 283-94.
33. Jelic, S.; Padeletti, M.; Kawut, S. M.; Higgins, C.; Canfield, S. M.; Onat, D.; Colombo, P. C.; Basner, R. C.; Factor, P.; LeJemtel, T. H., Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. In *Circulation*, United States, 2008; Vol. 117, pp 2270-8.
34. Lavie, L.; Kraiczi, H.; Hefetz, A.; Ghandour, H.; Perelman, A.; Hedner, J.; Lavie, P., Plasma vascular endothelial growth factor in sleep apnea syndrome: effects of nasal continuous positive air pressure treatment. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**, *165*, (12), 1624-8.
35. Lui, M. M.; Sau-Man, M., OSA and atherosclerosis. In *J Thorac Dis*, China, 2012; Vol. 4, pp 164-72.
36. Schneeweis, C.; Grafe, M.; Bungenstock, A.; Spencer-Hansch, C.; Fleck, E.; Goetze, S., Chronic CRP-exposure inhibits VEGF-induced endothelial cell migration. In *J Atheroscler Thromb*, Japan, 2010; Vol. 17, pp 203-12.
37. Briancon-Marjollet, A.; Henri, M.; Pepin, J. L.; Lemarie, E.; Levy, P.; Tamisier, R., Altered in vitro endothelial repair and monocyte migration in obstructive sleep apnea: implication of VEGF and CRP. *Sleep* **2014**, *37*, (11), 1825-32.

38. Briancon-Marjollet, A.; Pepin, J. L.; Weiss, J. W.; Levy, P.; Tamisier, R., Intermittent hypoxia upregulates serum VEGF. *Sleep Med* **2014**, *15*, (11), 1425-6.
39. Herren, B.; Levkau, B.; Raines, E. W.; Ross, R., Cleavage of beta-catenin and plakoglobin and shedding of VE-cadherin during endothelial apoptosis: evidence for a role for caspases and metalloproteinases. *Mol Biol Cell* **1998**, *9*, (6), 1589-601.
40. Bouillet, L.; Sidibe, A.; Polena, H.; Mannic, T.; Deroux, A.; Stidder, B.; Vittecoq, O.; Vilgrain, I., [Endothelial junctions: exploiting their instability in the development of biomarkers for vascular remodelling]. *Med Sci (Paris)* **2014**, *30*, (6-7), 633-5.
41. Sidibe, A.; Mannic, T.; Arboleas, M.; Subileau, M.; Gulino-Debrac, D.; Bouillet, L.; Jan, M.; Vandhuick, T.; Le Loet, X.; Vittecoq, O.; Vilgrain, I., Soluble VE-cadherin in rheumatoid arthritis patients correlates with disease activity: evidence for tumor necrosis factor alpha-induced VE-cadherin cleavage. *Arthritis Rheum* **2012**, *64*, (1), 77-87.
42. Wallez, Y.; Cand, F.; Cruzalegui, F.; Wernstedt, C.; Souchelnytskyi, S.; Vilgrain, I.; Huber, P., Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene* **2007**, *26*, (7), 1067-77.
43. Rochefort, P.; Chabaud, S.; Pierga, J. Y.; Tredan, O.; Brain, E.; Bidard, F. C.; Schiffler, C.; Polena, H.; Khalil-Mgharbel, A.; Vilgrain, I.; Bachelot, T., Soluble VE-cadherin in metastatic breast cancer: an independent prognostic factor for both progression-free survival and overall survival. *Br J Cancer* **2017**, *116*, (3), 356-361.
44. Blaise, S.; Polena, H.; Vilgrain, I., Soluble vascular endothelial-cadherin and auto-antibodies to human vascular endothelial-cadherin in human diseases: Two new biomarkers of endothelial dysfunction. *Vasc Med* **2015**, *20*, (6), 557-65.
45. Polena, H.; Creuzet, J.; Dufies, M.; Sidibe, A.; Khalil-Mgharbel, A.; Salomon, A.; Deroux, A.; Quesada, J. L.; Roelants, C.; Filhol, O.; Cochet, C.; Blanc, E.; Ferlay-Segura, C.; Borchiellini, D.; Ferrero, J. M.; Escudier, B.; Negrier, S.; Pages, G.; Vilgrain, I., The tyrosine-kinase inhibitor sunitinib targets vascular endothelial (VE)-cadherin: a marker of response to antitumoural treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Br J Cancer* **2018**, *118*, (9), 1179-1188.
46. Atkeson, A.; Yeh, S. Y.; Malhotra, A.; Jelic, S., Endothelial function in obstructive sleep apnea. In *Prog Cardiovasc Dis*, United States, 2009; Vol. 51, pp 351-62.
47. Makarenko, V. V.; Usatyuk, P. V.; Yuan, G.; Lee, M. M.; Nanduri, J.; Natarajan, V.; Kumar, G. K.; Prabhakar, N. R., Intermittent hypoxia-induced endothelial barrier dysfunction requires ROS-dependent MAP kinase activation. *Am J Physiol Cell Physiol* **2014**, *306*, (8), C745-52.
48. Kaczmarek, E.; Bakker, J. P.; Clarke, D. N.; Csizmadia, E.; Kocher, O.; Veves, A.; Tecilazich, F.; O'Donnell, C. P.; Ferran, C.; Malhotra, A., Molecular biomarkers of vascular dysfunction in obstructive sleep apnea. *PLoS One* **2013**, *8*, (7), e70559.
49. da Rosa, D. P.; Forgiarini, L. F.; Baronio, D.; Feijo, C. A.; Martinez, D.; Marroni, N. P., Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver. *Mediators Inflamm* **2012**, *2012*, 879419.
50. Prabhakar, N. R.; Semenza, G. L., Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev* **2012**, *92*, (3), 967-1003.
51. Ramond, A.; Godin-Ribuot, D.; Ribuot, C.; Totoson, P.; Koritchneva, I.; Cachot, S.; Levy, P.; Joyeux-Faure, M., Oxidative stress mediates cardiac infarction aggravation induced by intermittent hypoxia. *Fundam Clin Pharmacol* **2013**, *27*, (3), 252-61.
52. Espada, J.; Martin-Perez, J., An Update on Src Family of Nonreceptor Tyrosine Kinases Biology. *Int Rev Cell Mol Biol* **2017**, *331*, 83-122.
53. Gao, X.; Schottker, B., Reduction-oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews. *Oncotarget* **2017**, *8*, (31), 51888-51906.
54. Arnaud, C.; Beguin, P. C.; Lantuejoul, S.; Pepin, J. L.; Guillermet, C.; Pelli, G.; Burger, F.; Buatois, V.; Ribuot, C.; Baguet, J. P.; Mach, F.; Levy, P.; Dematteis, M., The inflammatory preatherosclerotic remodeling induced by intermittent hypoxia is attenuated by RANTES/CCL5 inhibition. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**, *184*, (6), 724-31.

55. Gautier-Veyret, E.; Arnaud, C.; Back, M.; Pepin, J. L.; Petri, M. H.; Baguet, J. P.; Tamisier, R.; Levy, P.; Stanke-Labesque, F., Intermittent hypoxia-activated cyclooxygenase pathway: role in atherosclerosis. *Eur Respir J* **2013**, 42, (2), 404-13.
56. Wallez, Y.; Vilgrain, I.; Huber, P., Angiogenesis: the VE-cadherin switch. *Trends Cardiovasc Med* **2006**, 16, (2), 55-9.
57. Cao, J.; Ehling, M.; Marz, S.; Seebach, J.; Tarbashevich, K.; Sixta, T.; Pitulescu, M. E.; Werner, A. C.; Flach, B.; Montanez, E.; Raz, E.; Adams, R. H.; Schnittler, H., Polarized actin and VE-cadherin dynamics regulate junctional remodelling and cell migration during sprouting angiogenesis. *Nat Commun* **2017**, 8, (1), 2210.
58. Sforza, E.; Roche, F., Sleep apnea syndrome and cognition. *Front Neurol* **2012**, 3, 87.
59. Veliev, F.; Briancon-Marjollet, A.; Bouchiat, V.; Delacour, C., Impact of crystalline quality on neuronal affinity of pristine graphene. *Biomaterials* **2016**, 86, 33-41.
60. Veliev, F.; Han, Z.; Kalita, D.; Briancon-Marjollet, A.; Bouchiat, V.; Delacour, C., Recording Spikes Activity in Cultured Hippocampal Neurons Using Flexible or Transparent Graphene Transistors. *Front Neurosci* **2017**, 11, 466.
61. Veliev, F.; Kalita, D.; Bourrier, A.; Belloir, T.; Briançon-Marjollet, A.; Albriex, M.; Bouchiat, V.; Delacour, C., Sensing ion channels in neuronal networks with graphene transistors. *2D Materials* **2018**, 5, (4).