

UNIVERSITÉ DE NANTES  
FACULTÉ DE MÉDECINE

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTÉ

Année 2013

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

# Facteurs anti-angiogéniques et maladies rénales

---

THÈSE DE DOCTORAT

Discipline : Biologie

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**Emmanuelle MEFFRAY**

*Le 11 octobre 2013, devant le jury ci-dessous*

Rapporteurs Pr Stéphane BURTEY  
Pr Hélène FRANÇOIS-PRADIER  
Examineur Pr Fadi FAKHOURI

*Directeur de thèse : Pr Fadi FAKHOURI*

## Remerciements

Je tiens avant tout à remercier Ignacio Anegon pour m'avoir accueillie dans son laboratoire. Je remercie également Béatrice Charreau pour son accueil mais également pour son suivi et ses conseils au cours de ces trois ans passés au sein de l'équipe 5.

Je remercie Fadi Fakhouri pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse, un rêve de longue date devenu réalité. Merci à lui pour son soutien, sa présence, ses idées et son enthousiasme.

Merci à l'ensemble de l'équipe 5, pour les bons moments de travail et de détente, et nos sympatiques restos. Merci tout particulièrement à Mélanie pour sa gentillesse, sa bonne humeur, sa patience et son aide plus que fréquente sur tous les projets que j'ai menés ; à Angélique pour ces mêmes raisons et pour nos tentatives sportives ; à Laetitia, notre rayon de soleil toulousain, dont l'implication dans ma thèse a été capitale.

Merci à mes compagnons de bureau, Marion, Annie, Leatitia (qui mérite bien de doubles remerciements !) et à l'ensemble des jeunes et moins jeunes qui font de ce labo un endroit agréable, vous allez tous me manquer ; un grand merci aussi à ceux qui sont venu me voir dans mes exploits poétiques ; un clin d'œil en particulier à Cécilia, Thérèse n'aura qu'un temps.

Merci également à ceux qui m'ont suivi et aidé dans mes activités complémentaires à la thèse, en particulier à Véronique Gratas, Hélène Pillet, et Sophie Bellec. Leurs conseils m'ont beaucoup fait avancer.

Merci enfin à tous ceux qui m'ont soutenu pendant ces trois longues années : mes parents bien sûr, toujours confiants et de bon conseil ; Vincent, mon phare dans la tempête, toujours présent malgré les vagues ; la troupe des rôlistes et celle des poètes, garant de la part de fiction qui se marie si bien à la science dans mon quotidien ; à ma véto préféré et à David, l'exilé du grand froid ; aux philosophes et aux fous, à tous ceux qui m'ont donné les crayons et les mots pour écrire mon présent et à esquisser mon futur.

... et bien sûr, Marcelle, sans qui les doctorants ne seraient pas ce qu'ils sont, une joyeuse communauté soudée.

# Table des matières

Introduction.....	1
1. L'endothélium.....	1
1.1. Organisation de la paroi vasculaire .....	1
1.2. Fonctions de l'endothélium .....	3
1.2.1. L'angiogenèse .....	3
1.2.2. Régulation du tonus vasculaire .....	3
1.2.3. Régulation de la perméabilité.....	4
1.2.4. Activation de la réponse immunitaire .....	5
1.2.5. Propriétés anti-coagulantes .....	6
1.2.6. Rôle dans l'hémostase.....	7
2. L'angiogenèse .....	8
2.1. Définition.....	8
2.2. Mécanismes de l'angiogenèse .....	8
2.3. Facteurs de croissance et angiogenèse.....	9
2.4. L'angiogenèse en conditions pathologiques .....	11
3. Biologie du VEGF et du sFlt1 .....	12
3.1. Le VEGF.....	12
3.1.1. Historique.....	12
3.1.2. La famille du VEGF.....	13
3.1.3. Expression du VEGF.....	17
3.1.4. Les récepteurs au VEGF (VEGFR).....	18
3.1.5. Les fonctions du VEGF.....	27
3.1.6. Régulation du VEGF.....	31
3.2. Le sFlt1 .....	33
3.2.1. Structure du sFlt1 .....	33

3.2.2.	Synthèse du sFlt1 .....	33
3.2.1.	Sources du sFlt1 .....	35
3.2.1.	Mécanismes de sécrétion du sFlt1.....	36
3.2.2.	Actions du sFlt1 .....	37
3.2.3.	Régulation du sFlt1 .....	39
4.	sFlt1 et VEGF en conditions pathologiques .....	43
4.1.	sFlt1 et pré-éclampsie.....	43
4.2.	Quand le VEGF est néfaste .....	45
4.3.	sFlt1 et maladies rénales.....	46
4.3.1.	Structure et fonction du rein.....	46
4.3.2.	La balance VEGF/sFlt1 dans le rein .....	48
4.3.3.	Le sFlt1 dans l'insuffisance rénale chronique (IRC) .....	49
4.3.4.	sFlt1 et vascularites à ANCA.....	51
	Objectifs.....	55
	Matériel et méthodes.....	57
	Résultats.....	60
1.	sFlt1 et dialyse .....	60
1.1.	Impact de la dialyse sur la sécrétion de sFlt1 .....	60
A.	Dialysis modalities in patients included in the study.....	79
1.2.	sFlt1 et dialyse : un contexte anti-angiogénique ?.....	83
1.3.	Dialyse : quelles sources pour le sFlt1 ?.....	86
1.3.1.	Cellules CD14+/CD16+ .....	87
1.3.2.	Microparticules .....	88
2.	sFlt1 et greffe rénale .....	92
2.1.	Impact du sFlt1 sur le délai de reprise de fonction du greffon (DGF) .....	92
2.2.	sFlt1 et greffe rénale : un contexte anti-angiogénique ?.....	117
3.	CE : résultats préliminaires .....	119

Discussion et perspectives .....	122
1. sFlt1 et dialyse .....	122
1.1. Quels mécanismes pour la sécrétion de sFlt1 ? .....	123
1.1.1. Le rôle de l'héparine .....	123
1.1.2. Microparticules .....	124
1.1.3. Monocytes CD14+/CD16+ .....	125
1.2. Induction d'un état anti-angiogénique ? .....	126
2. sFlt1 et greffe rénale .....	129
2.1. Quels mécanismes pour la sécrétion de sFlt1 ? .....	129
2.2. Induction d'un état anti-angiogénique ? .....	129
3. sFlt1 et CE.....	131
4. Intérêt thérapeutique .....	134
Bibliographie .....	136
Annexe .....	155

## Table des figures

Figure 1 : Localisation de l'endothélium .....	2
Figure 2 : Cellule endothéliale et glomérule .....	4
Figure 3 : Structures permettant la régulation de la perméabilité.....	5
Figure 4 : Adhérence et diapédèse : les protéines impliquées .....	6
Figure 5 : Les acteurs de l'angiogenèse .....	10
Figure 6 : Structure des gènes des VEGF .....	15
Figure 7 : Dimérisation du VEGF et fixation à son récepteur .....	17
Figure 8 : Les récepteurs et co-récepteurs du VEGF .....	19
Figure 9 : Liaison du dimère de VEGF à ses récepteurs .....	24
Figure 10 : principales voies de signalisation activées par les VEGFR1 et 2 .....	26
Figure 11 : VEGFR1 soluble et membranaire .....	33
Figure 12 : Structure des variants du sFlt1 .....	34
Figure 13 : Expression des variants du sFlt1 dans différents tissus.....	35
Figure 14 : Accumulation de sFlt1 dans la cellule endothéliale .....	37
Figure 15 : Le système du complément .....	41
Figure 16 : Taux de sFlt1 dans la pré-éclampsie .....	43
Figure 17 : Effets anti-angiogéniques du sFlt1 dans la pré-éclampsie .....	44
Figure 18 : Structure du rein. ....	47
Figure 19 : débit de filtration glomérulaire et taux plasmatique de sFlt1 .....	49
Figure 20 : Induction d'un état anti-angiogénique par le sFlt1 .....	50
Figure 21 : Taux de sFlt1 dans les AAV .....	52
Figure 22 : Impact sur l'angiogenèse des sérums de patients atteints de AAV .....	53
Figure 23 : Effet des ANCA sur la sécrétion de sFlt1 par les monocytes .....	54
Figure 24 : Impact du sérum de dialysé sur l'apoptose des CE en culture. ....	84
Figure 25 : Effet du VEGF sur l'induction de l'apoptose par le sérum T30 d'hémodialysé .....	85
Figure 26 : Impact du sérum de dialysé sur la prolifération des CE en culture.....	86
Figure 27 : Exemple représentatif de l'évolution de la proportion de CD14+/CD16+ ..	87
Figure 28 : Quantification des MP à T0 et T15 .....	89
Figure 29 : Expression de VEGFR1 et de l'Annexine V par les MP .....	90
Figure 30 : Comparaison de la concentration en sFlt1 entre le plasma de dialysé sans MP et le plasma « complet » .....	90

Figure 31 : Effet des sérums de patients greffés sur l'apoptose des HUVECs en culture .....	117
Figure 32 : Effet des sérums de patients greffés sur la prolifération des HUVECs en culture.....	118
Figure 33 : Sécrétion de sFlt1 par les HRGEC et les HDMEC .....	119
Figure 34 : Expression des récepteurs et co-récepteur au VEGF dans les HRGEC et les HDMEC .....	120
Figure 35 : Expression du CD59 par les HRGEC et les HDMEC.....	121

## Liste des abréviations

AAV :	Vascularite associée aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
ADAM :	A Disintegrin And Metalloproteinase
ANCA :	Anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles
APC :	Allophycocyanine
ARF :	ADP-Ribosylation Factor
Bcl2	B-Cell lymphoma-2
BFA :	Bréfeldine A
C5aR :	Récepteur au C5a
CAM :	Membrane chorioallantoïde de poulet
IRC :	Insuffisance Rénale Chronique
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPT :	Capillaires péricytaires
CXCR :	Récepteur de Chimiokines
DAF :	Decay-Accelerating Factor
DAPI :	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DGF :	Retard de reprise de fonction du greffon (Delayed Graft Function)
EC :	Cellules Endothéliales
ECBM :	Endothelial Cell Basal Medium
ECGS :	Endothelial Cell Growth Supplément
ECM	Endothelial Cell Medium
EDTA :	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGF :	Epidermal Growth Factor
eGFR :	Débit de filtration glomérulaire estimé (estimated Glomerular Filtration Rate)
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK :	Extracellular-signal-Regulated Kinase
ESRD :	Insuffisance rénale au stade terminal (End-Stage Renal Disease)
Ets :	E-twenty six
FAK :	Focal Adhesion Kinase
FGF :	Fibroblast Growth Factor
FITC :	Isothiocyanate de fluorescéine
Flk1 :	Fetal Liver Kinase 1
Flt1 :	Fms-like tyrosine kinase 1
GM-CSF :	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HD :	Hémodialyse
HDF :	Hémodiafiltration
HDMEC :	Cellules endothéliales microvasculaires dermiques humaines
HIF :	Facteur Induit par l'Hypoxie
HKMEC :	Cellules endothéliales microvasculaires rénales humaines
HRGEC :	Cellules endothéliales glomérulaires rénales humaines
HRMVEC :	Cellules endothéliales microvasculaires de la rétine humaines

HUAEC :	Cellules endothéliales humaines de l'artère du cordon ombilical
HUVEC :	Cellules endothéliales humaines de la veine du cordon ombilical
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule
IFN- $\gamma$ :	Interféron $\gamma$
IGF :	Insulin-like Growth Factor
IL :	Interleukine
I-TAC :	Interferon-inducible T-cell Alpha Chemoattractant
Jmjd6 :	Jumonji domain-containing protein 6
JNK :	c-Jun N-terminal Kinases
KDR :	Kinase insert Domain Receptor
LMWH :	Héparine de bas poids moléculaire (Low Molecular Weight Heparin)
LPS :	Lipopolysaccharide
MAC :	Complexe d'Attaque Membranaire
MAPK :	Mitogen-activated Protein Kinase
MCP :	Membrane Cofactor Protein
MMP :	Métalloprotéases Matricielles
MP :	Microparticules
MPO :	Myéloperoxydase
NO :	Oxyde Nitrique
NOS :	Oxyde Nitrique Synthase
NP :	Neuropiline
PAF :	Plasminogen Activator Inhibitor
PCR :	Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)
PDGF :	Platelet-Derived Growth Factor
PE :	Sérum de Veau Fœtal
PECAM :	Platelet Endothelium Cell Adhesion Molecule
PerCP :	Protéine de Peridine Phlorophylle
PHD :	Proxyl Hydroxylase
PI3K :	Phosphatidylinositide 3-Kinases
PKC :	Protéine Kinase C
PLC $\gamma$ :	Phospholipase C gamma
PIGF :	Placental Growth Factor
PR3 :	Protéinase 3
RE :	Réticulum Endoplasmique
SDF-1 :	Stromal cell-derived Factor-1
Sf9 :	<i>Spodoptera frugiperda</i> (lignée de cellules ovariennes issue de)
sFlt1 :	Soluble Fms-like tyrosine kinase 1
SVF :	Sérum de Veau Fœtal
TGF :	Transforming Growth Factor
THP-1 :	Lignée monocyttaire
TIMP :	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF :	Tumor Necrosis Factor
TSAd	T cell-Specific Adaptor
UH :	Héparine non fractionnée (Unfractionated Heparin)

uPA :	urokinase-type Plasminogen Activator
uPAR :	Récepteur de l'urokinase-type Plasminogen Activator
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF :	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR :	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VLA-4 :	Very Late Antigen-4
VPF :	Tumor Vascular Permeability Factor
VVO :	Organites Vésiculo-Vacuolaires
vWF :	Facteur de von Willebrand

# INTRODUCTION

---

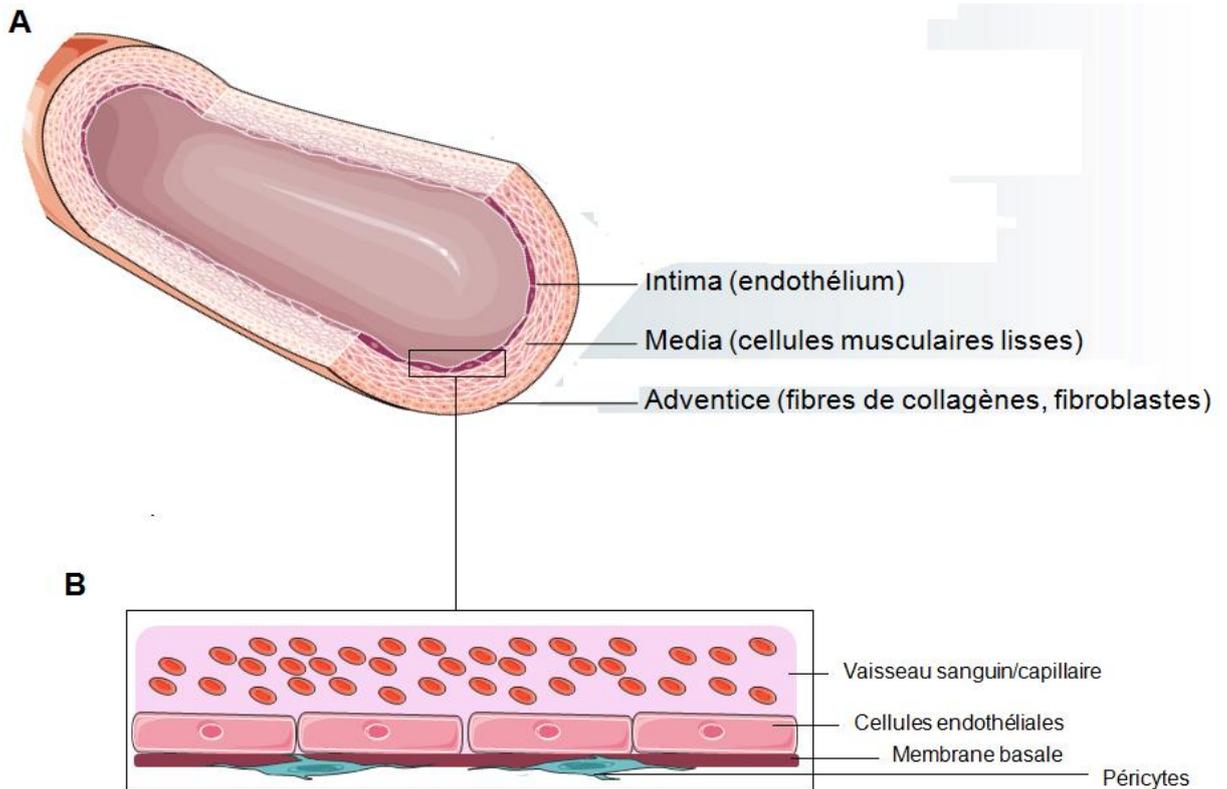
## 1. L'endothélium

### 1.1. Organisation de la paroi vasculaire

L'endothélium est une structure complexe dont l'organisation et la fonction varient selon les organes. Constitué des cellules endothéliales (CE), il est présent au niveau de la couche (ou tunique) la plus interne des vaisseaux sanguins, l'intima, et repose sur une membrane basale (Figure 1). La couche médiane des vaisseaux, ou media, est constituée de cellules musculaires lisses et, dans les veines et les artères élastiques, de fibres élastiques. La couche externe, ou adventice, est formée de fibres de collagène et de fibroblastes.

L'importance respective de ces trois tuniques est variable selon le type de vaisseau, et les capillaires, les vaisseaux les plus réduits en taille, ne comportent que des CE et la lame basale. Celle-ci, d'une épaisseur de 60 à 80nm en moyenne, est située entre les CE et les péricytes. Elle est essentielle au maintien de la structure des microvaisseaux (Eklund et al., 2001).

Les péricytes sont présents dans les vaisseaux de petits et moyens calibres et sont comme les CE ancrés dans la membrane basale. Ces cellules, qui sont de cellules musculaires lisses spécialisées, ont pour particularité de se trouver en contact avec plusieurs CE, et ainsi de faciliter la communication entre elles (Armulik et al., 2005).



**Figure 1 : Localisation de l'endothélium**

*L'endothélium constitue l'intima, la couche la plus interne de la paroi des vaisseaux sanguins et des capillaires (A). Il repose sur la membrane basale, sur laquelle sont également ancrés les péricytes (B).*

L'endothélium, quant à lui, est formé d'une assise de CE d'environ  $0.5\mu\text{m}$  d'épaisseur,  $10\mu\text{m}$  de large et  $100\mu\text{m}$  de long. Les CE sont orientées dans le sens de la longueur, leur grand axe suivant le flux sanguin. Elles reposent sur la membrane basale, et expriment des récepteurs pour ses principaux composants, le collagène, les laminines et les fibronectines, ce qui permet leur adhésion (Tarone et al., 1990). La structure de l'endothélium et les jonctions entre cellules permettent de distinguer trois types de capillaires :

- les capillaires continus sont caractérisés par un espace réduit et la présence de jonctions serrées entre les CE, et une membrane basale continue. On les retrouve notamment au niveau des muscles squelettiques, des poumons, de la peau et du cœur ;
- Les capillaires fenestrés présentent un espacement entre les cellules, parfois fermé d'un diaphragme ; ils sont localisés dans les organes nécessitant des échanges transcapillaires : glomérule rénal, glandes endocrines et tractus gastro-intestinal ;

- les capillaires sinusoïdes, observés dans le foie, la rate ou la moelle osseuse, sont définis par un endothélium présentant de larges séparations entre les cellules, et une membrane basale discontinue ou absente. Ils permettent notamment le passage des cellules en provenance des organes hématopoïétiques (Karnovsky, 1968).

Les CE sont identifiables par plusieurs marqueurs, parmi lesquels le Facteur de von Willebrand (vWF), stocké dans les corps de Weibel-Palade, et les molécules d'adhésion telles que le Platelet Endothelium Cell Adhesion Molecule -1 (PECAM-1) (Jones et al., 1981; Page et al., 1992).

C'est à cette structure, impliquée dans de nombreux processus physiologiques, que nous allons nous intéresser dans la partie suivante.

## **1.2. Fonctions de l'endothélium**

### **1.2.1. L'angiogenèse**

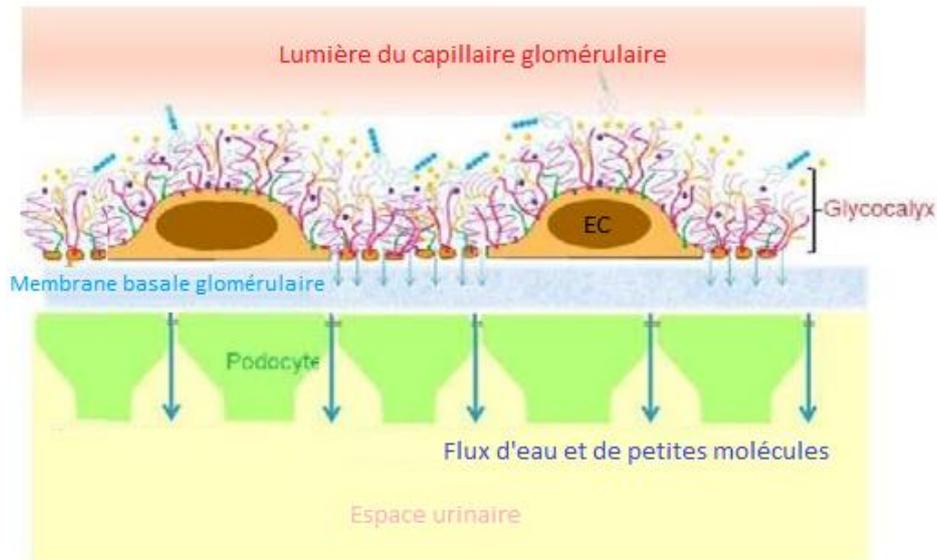
L'angiogenèse représentant une fonction majeure de l'endothélium ainsi qu'une part importante de mon projet de thèse, elle sera décrite ultérieurement dans un chapitre indépendant.

### **1.2.2. Régulation du tonus vasculaire**

Les CE produisent du monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO), via l'Oxyde Nitrique Synthase (NOS), qui est responsable de la vasodilatation des cellules musculaires lisses, et l'endothéline 1, qui induit quant à elle la vasoconstriction. La détection de la force de cisaillement du flux sanguin par divers acteurs (intégrines du cytosquelette et de la matrice extracellulaire, cadhérines, canaux ioniques) détermine les adaptations structurales et fonctionnelles de la cellule (Lehoux and Tedgui, 2004).

### 1.2.3. Régulation de la perméabilité

L'endothélium ne constitue pas une barrière hermétique entre le sang et les tissus : il est plus ou moins perméable selon les organes.

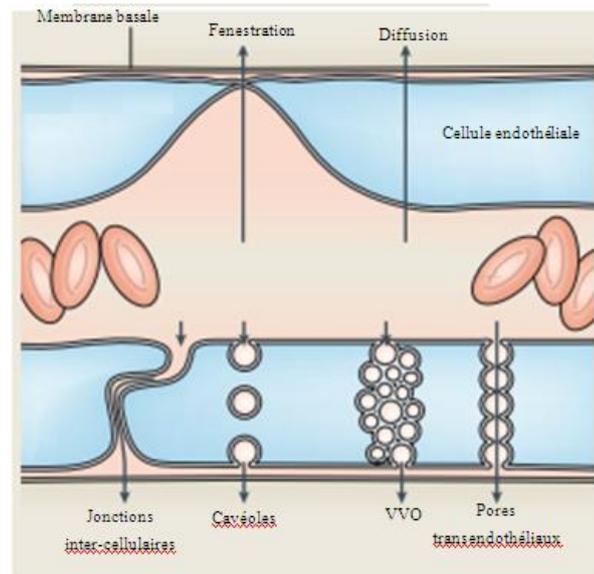


En particulier, cette fonction est majeure au niveau du glomérule, la structure responsable de la filtration dans le rein. Là, l'endothélium autorise un flux important d'eau et de molécules de petite taille à transiter à travers cette barrière (Figure 2).

**Figure 2 : Cellule endothéliale et glomérule**

*Le glomérule est responsable de la filtration dans le rein : l'endothélium fenestré, la membrane basale et les fentes de filtration formées par les podocytes permettent d'assurer cette fonction. D'après (Deepesh, 2008)*

Différents types de structures permettent et régulent cette perméabilité : les organites vésiculo-vacuolaires (VVO), les cavéoles, structures aux parois riches en lipides formées à partir de la membrane plasmique, les fenestrations de l'endothélium et les jonctions intercellulaires des CE (Dvorak and Feng, 2001 ; Sörensson et al., 2002) (Figure 3).

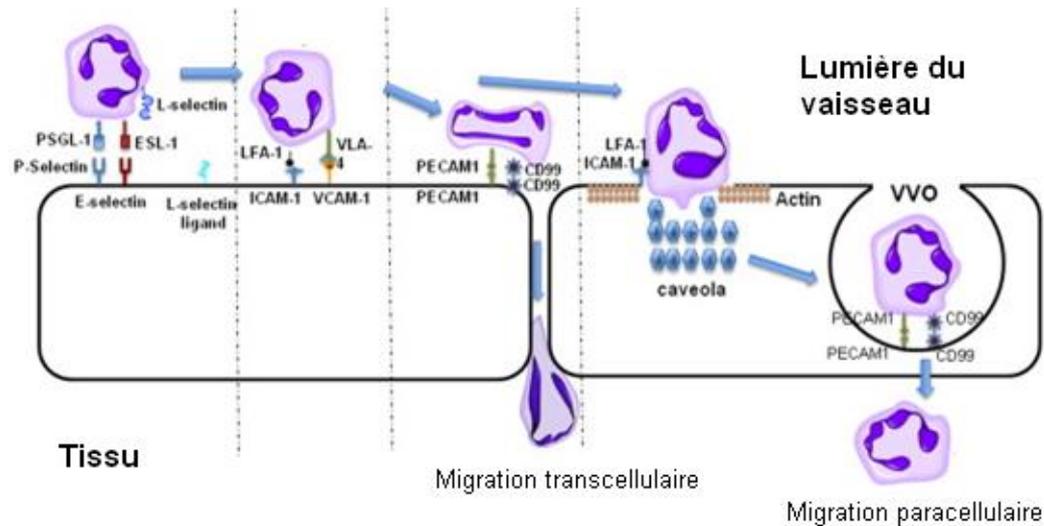


**Figure 3 : Structures permettant la régulation de la perméabilité**  
D'après (Olsson et al., 2006)

En effet, ces dernières sont liées par des jonctions serrées et adhérentes dont les protéines peuvent subir des phosphorylations ou être internalisées, ce qui provoque une augmentation de la perméabilité. Ces mécanismes sont régulés par différents facteurs de croissance, tels que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), le Fibroblast Growth Factor (FGF) et l'Epidermal Growth Factor (EGF) (Chen et al., 2002 ; Dejana et al., 2009).

#### 1.2.4. Activation de la réponse immunitaire

L'endothélium intervient également dans la réponse immunitaire, grâce à la présence de molécules d'adhésions sur les CE, telles que les Vascular Cell Adhesion Molecules (VCAM), les Inter-Cellular Adhesion Molecules (ICAM), le PECAM ou les E- et P-sélectines qui permettent le « rolling » (roulement) des leucocytes, tels que les monocytes et les lymphocytes, puis la diapédèse (passage à travers l'endothélium vers les tissus) (Figure 4). Les CE expriment également le CD40, dont l'activation conduit à l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, et les molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I et II, et participent donc à la présentation d'antigènes. Enfin, une fois activées, les CE peuvent synthétiser des chimioattractants tels que l'Interferon-inducible T-cell Alpha Chemoattractant (I-TAC) pour les lymphocytes T (Karmann et al., 1995 ; Mazanet et al., 2000 ; Pober, 1999).



**Figure 4 : Adhérence et diapédèse : les protéines impliquées**  
D'après (Razakandrainibe et al., 2013)

### 1.2.5. Propriétés anti-coagulantes

L'endothélium assure une fonction anti-coagulante. Les cellules endothéliales expriment tout d'abord la thrombomoduline, qui fixe la thrombine et inhibe ses fonctions pro-coagulantes. Le complexe formé par la thrombomoduline et la thrombine active la protéine C, un facteur anti-coagulant. L'action de la protéine C nécessite la présence d'un co-facteur, la protéine S, lequel est également synthétisé par la cellule endothéliale : ces deux protéines sont responsables de la dégradation des facteurs de la coagulation Va et VIIIa (Stern et al., 1986 ; Stern et al., 1991).

Le NO, impliqué comme on l'a vu dans la régulation du tonus vasculaire, inhibe également l'aggrégation et l'adhésion des plaquettes. C'est aussi le rôle joué par la prostacycline, un autre facteur synthétisé par les CE (Moncada and Vane, 1978 ; Sneddon and Vane, 1988).

Mais si l'endothélium joue un rôle anti-coagulant en conditions physiologiques, il est également impliqué dans la coagulation lorsque la paroi vasculaire est lésée.

### 1.2.6. Rôle dans l'hémostase

En plus du recrutement des lymphocytes T et des monocytes, l'endothélium participe au recrutement des plaquettes et donc, à ce titre, à l'hémostase, mécanisme qui conduit à l'arrêt du saignement lors d'une lésion de la paroi vasculaire et passe notamment par la formation d'un clou plaquettaire. La stimulation des CE par l'interleukine (IL) -1 issue des monocytes induit une réaction pro-thrombotique, notamment par l'activation du Platelet-activating Factor (PAF). Le PAF est en effet un facteur de l'agrégation plaquettaire, mais induit aussi la libération d'IL-1 par les plaquettes (Bussolino et al., 1986 ; Lindemann et al., 2001). Cette activation des plaquettes induit également une diminution de la fibrinolyse, par l'augmentation de l'expression en surface du Plasminogen Activator Inhibitor 1 (PAI-1). Enfin, les plaquettes activées interagissent avec les CE et stimulent, via l'IL-1 dérivée des plaquettes, l'expression d'ICAM-1 et VCAM-1 et la production d'IL-6 et de Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) par les CE. Il convient de noter que ces mêmes facteurs pro-inflammatoires augmentent la perméabilité de l'endothélium évoquée plus haut (Mantovani et al., 1992).

## 2. L'angiogenèse

### 2.1. Définition

L'angiogenèse permet le développement des vaisseaux existants et la réparation des lésions vasculaires. Elle succède à la vasculogenèse, qui intervient au cours du développement embryonnaire et consiste en la mise en place *de novo* des vaisseaux sanguins. Ce sont les deux modalités de développement du système vasculaire.

### 2.2. Mécanismes de l'angiogenèse

L'angiogenèse se déroule en plusieurs étapes successives :

- Augmentation de la perméabilité de l'endothélium

Cette première phase se caractérise par une fenestration de l'endothélium, ainsi que la formation dans les CE des VVO décrits précédemment, qui permettent le passage de macromolécules à travers l'endothélium (Dvorak and Feng, 2001 ; Stan, 2007).

- Dégradation du tissu interstitiel.

Les phénomènes de dégradation de la matrice extracellulaire et de remodelage de l'endothélium dépendent notamment de l'action de protéases, comme les activateurs du plasminogène, et notamment l'urokinase (uPA) (Schnaper et al., 1995). Ils mettent également en jeu l'action de chymases et de métalloprotéases matricielles (MMP). Les MMP, libérées par les CE, empêchent *in vitro* l'apparition d'un dépôt de molécules de la matrice extracellulaire (Kräling et al., 1999). L'angiopoiétine 2, un facteur de croissance, et son récepteur Tie-2, exprimé par les CE, sont également impliqués. Ils régulent notamment l'action d'intégrines qui assurent l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (Felcht et al., 2012).

- Prolifération, migration et recrutement des CE

Les CE des vaisseaux tangents au site de développement se multiplient et migrent pour reformer ensuite un tube qui constituera le futur vaisseau sanguin.

Outre ce phénomène, de nombreuses études ont mis en évidence un recrutement de progéniteurs qui se différencient en CE. Ces cellules, nommées hémangioblastes et exprimant le CD34 et le vWF, sont aptes à se différencier en CE sous l'influence de différents facteurs de croissance, parmi lesquels le bFGF, l'IGF-I et le VEGF. Ce phénomène a été décrit dans des contextes de greffe de cœur, où des cellules provenant du donneur tapissent l'artère coronaire, et de dispositif d'assistance ventriculaire. Dans ce dernier cas, les surfaces en contact avec le sang servent de support à une couche de CE d'origine sanguine. Ces cellules progénitrices recrutées dans la circulation sanguine expriment le VEGFR Récepteur 2 (VEGFR2) et le marqueur des cellules souches hématopoïétiques AC133 ou CD133. Quand elles parviennent sur le site de l'angiogenèse, elles stimulent la prolifération des CE « locales » (Peichev et al., 2000 ; Shi et al., 1998).

– Stabilisation des vaisseaux néoformés

Les péricytes jouent un rôle important dans le maintien et la prolifération des CE. Une balance entre ces deux types cellulaires régule les phases de croissance et de maturation des vaisseaux, l'envahissement par les péricytes marquant la fin du développement de nouvelles structures vasculaires (Ribatti et al., 2011 ; Stratman et al., 2009). Des inhibiteurs des métalloprotéases, les Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) sont produites suite à l'interaction entre les deux types cellulaires : les cellules endothéliales libèrent TIMP-2, et les péricytes TIMP-3 (Saunders et al., 2006). Ces inhibiteurs induisent l'apparition de collagènes et laminines qui permettent la reformation de la matrice extracellulaire (Kräling et al., 1999).

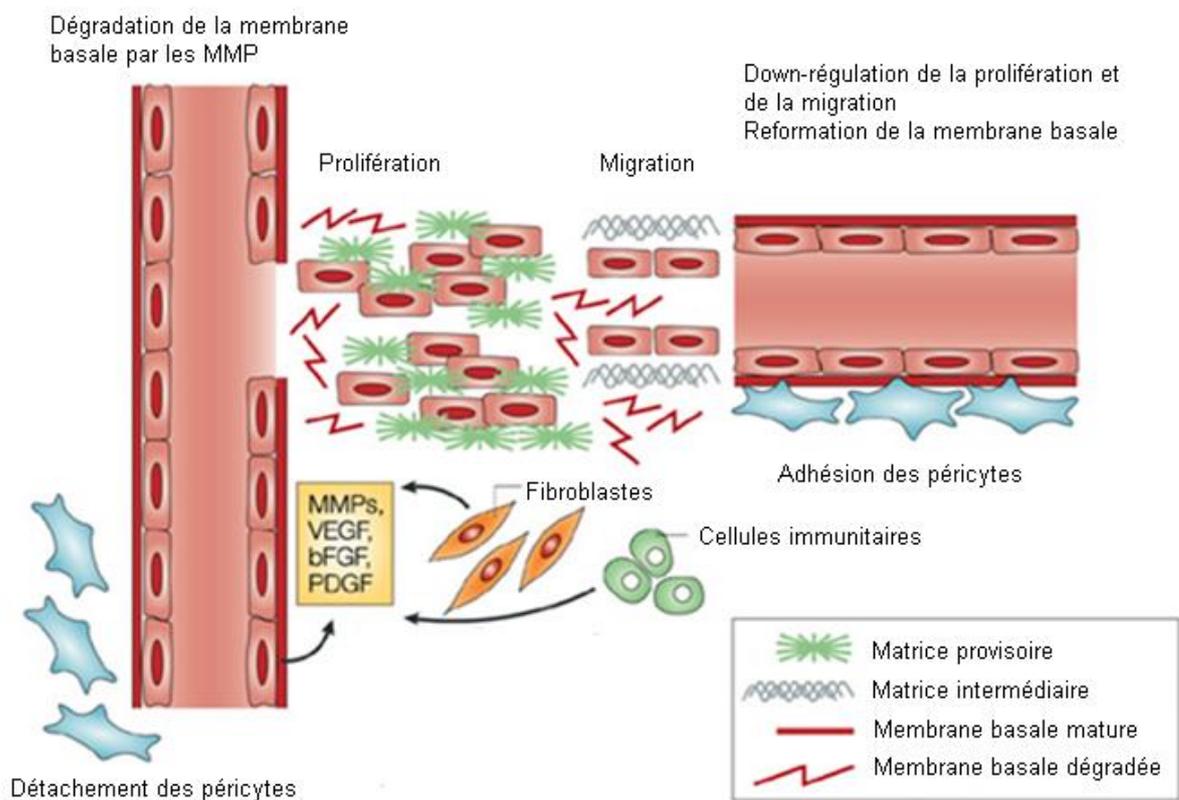
### **2.3. Facteurs de croissance et angiogenèse**

*In vivo*, de nombreux facteurs de croissance sont impliqués dans l'angiogenèse, parmi lesquels les VEGF, les FGF, l'EGF, les Placental Growth Factor (PlGF), les angiopoïétines 1 et 2, l'angiogénine, l'Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) ainsi que les Transforming Growth Factors (TGF)  $\alpha$  et  $\beta$ , le Tumor Necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou encore les chimiokines CXC (Esch et al., 1985 ; Leibovich et al., 1987 ; Leung et al., 1989).

Les FGFs notamment interviennent dans plusieurs étapes de l'angiogenèse : le remodelage de la membrane basale, la migration et la multiplication des CE. Dans ce cadre, ils peuvent agir en synergie avec d'autres facteurs de croissance, tels que le VEGF : la combinaison des deux facteurs *in vitro* induit une angiogenèse accrue par rapport à la stimulation des facteurs isolés (Gospodarowicz, 1976 ; Pepper et al., 1992 ; Slavin, 1995).

Le PlGF agit également en synergie avec le VEGF, avec lequel il partage un récepteur. Ces deux facteurs de croissance seront détaillés ultérieurement.

L'angiogenèse fait donc intervenir plusieurs types cellulaires, et résulte d'une fine régulation impliquant de nombreux acteurs, notamment des facteurs pro- et anti-angiogéniques (Figure 5).



**Figure 5 : Les acteurs de l'angiogenèse**

*Les métalloprotéases interviennent dans la dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale (une forme spécialisée de la matrice extracellulaire), puis les facteurs de croissance stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Les péricytes et la reformation de la membrane basale permettent de stabiliser le vaisseau néoformé. D'après (Kalluri, 2003)*

## **2.4. L'angiogenèse en conditions pathologiques**

L'angiogenèse joue un rôle dans plusieurs pathologies. Dans les maladies cardiaques ischémiques par exemple, la stimulation de l'angiogenèse par le VEGF, le FGF ou encore à l'aide de cellules souches apparaît comme une solution thérapeutique (Nessa et al., 2009).

Néanmoins, l'angiogenèse peut également s'avérer un facteur d'aggravation : dans l'athérosclérose, la formation d'une micro-vascularisation contribue à l'occlusion progressive des vaisseaux (Felmeden et al., 2003).

L'angiogenèse est impliquée dans d'autres pathologies, telles que l'arthrite rhumatoïde. Il s'agit d'une maladie chronique caractérisée par une inflammation de la synovie et une importante infiltration des lymphocytes et macrophages. Des facteurs pro-angiogéniques, et en particulier le VEGF, participent à l'aggravation de la maladie et à l'augmentation des lésions articulaires (Paleolog, 2002).

### **3. Biologie du VEGF et du sFlt1**

#### **3.1. Le VEGF**

##### **3.1.1. Historique**

Le VEGF a été identifié et purifié par deux équipes en parallèle en 1989, l'équipe de Napoleone Ferrara au sein de la Genentech et celle de Daniel Conolly, dans la Compagnie Monsanto. Les mécanismes de l'angiogenèse avaient alors déjà été observés, notamment dans le contexte de la croissance des tumeurs (Folkman et al., 1971). En 1968, Greenblatt et Shubi avaient démontré qu'elle était induite par des facteurs diffusibles (Greenblatt and Shubi, 1968). La recherche sur l'angiogenèse a donc pris son essor, dans le but notamment de bloquer le développement des tumeurs, et plusieurs des facteurs pro-angiogéniques ont été mis en évidence, tels que les FGFs. Néanmoins, l'absence de domaine signal pour le transport extramembranaire suggérait que le FGF n'était que très peu sécrété, et d'autres facteurs étaient recherchés (Ferrara and Henzel, 1989 ; Gospodarowicz, 1976).

Ferrara étudie alors un facteur de croissance présent dans le milieu de cellules d'hypophyse de bovin, qui stimule la prolifération des CE. Il parvient à l'isoler et à en obtenir la séquence en acides aminés, puis à identifier la séquence codante en 1989. L'équipe de Conolly, quant à elle, poursuit les travaux de Senger et al. qui mettaient en évidence un nouveau facteur sécrété par des cellules tumorales et favorisant la perméabilité vasculaire; Conolly réussit à l'isoler et le nomme Tumor Vascular Permeability Factor (VPF). Les deux équipes ont donc découvert, dans le même temps et par deux voies différentes, une molécule dimérique de 45000 Daltons dans des cellules de vaisseaux de petit et gros calibre d'une part, et dans des lignées de cellules tumorales d'autre part. La présence d'une séquence liée aux sites de clivages indiquait que le VEGF était une molécule sécrétée, confirmant l'hypothèse initiale de Ferrara (Ferrara and Henzel, 1989 ; Keck et al., 1989 ; Leung et al., 1989 ; Senger et al., 1983).

### 3.1.2. La famille du VEGF

- Les VEGF-A, -B, -C et -D

Le VEGF est une protéine de la famille des facteurs de croissance. Cette famille comprend plusieurs types de VEGF, désignés par -A, -B, -C et -D, ainsi que le PlGF. Le degré d'homologie entre le VEGF-A et les autres membres de la famille varie de 26.7% pour le VEGF-D à 42.7% pour le VEGF-B et 40.4% pour le PlGF-1 (Joukov et al., 1997).

Nous nous focaliserons sur le VEGF-A, appelé VEGF au cours de ce travail ; il sera donc présenté plus en détail par la suite.

Le VEGF-B est majoritairement présent dans les muscles squelettiques, et est plus particulièrement impliqué dans le développement embryonnaire (Olofsson et al., 1996). En revanche, les VEGF-C et -D sont plus particulièrement impliqués dans la lymphangiogenèse

- Le PlGF

Le PlGF possède quatre isoformes issus d'un épissage alternatif : le PlGF-1 (PlGF131), le PlGF-2 (PlGF152), le PlGF-3 (PlGF203) et le PlGF-4 (PlGF224), tous exprimés par les cellules endothéliales et le trophoblaste (Yang et al., 2003).

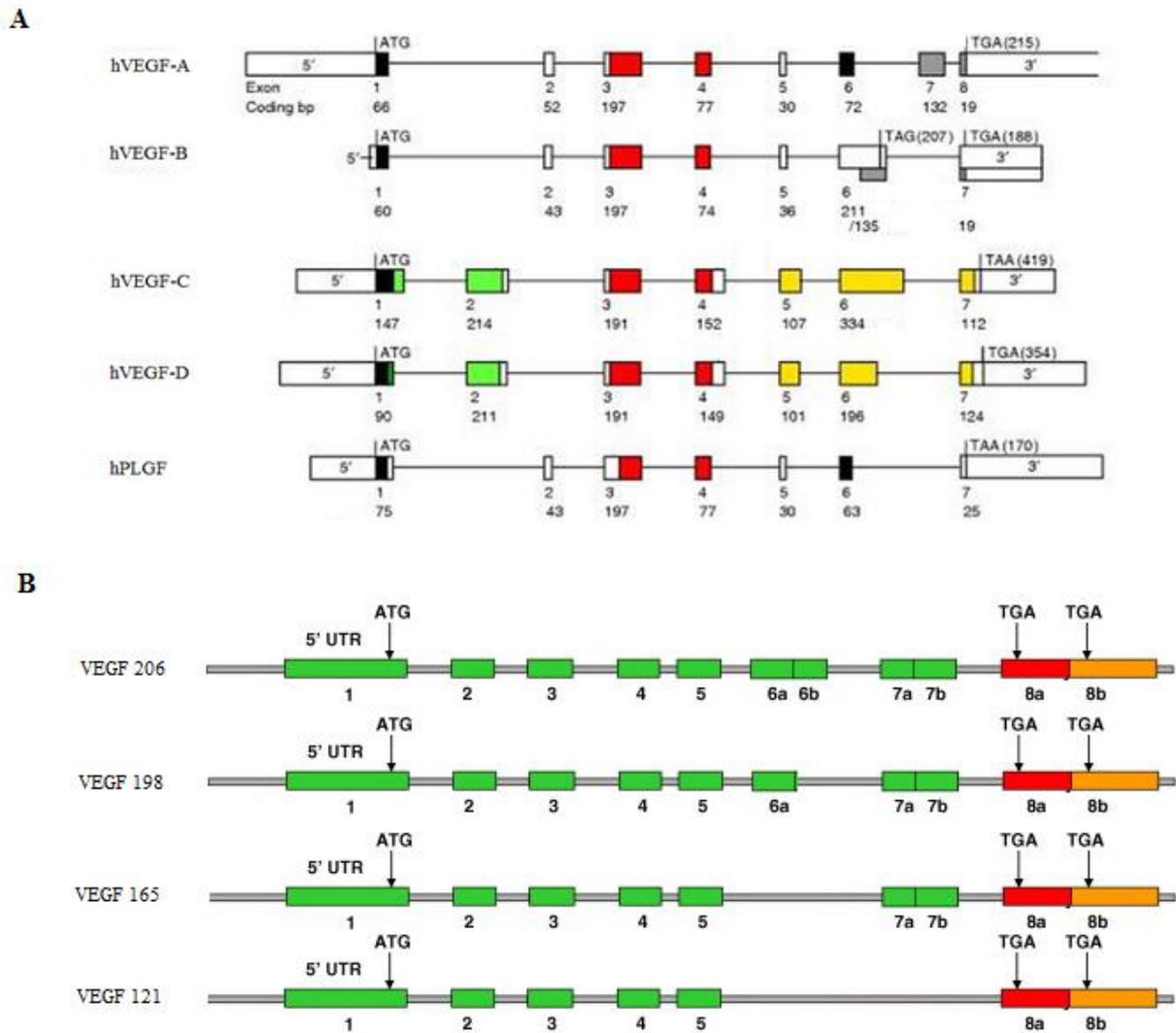
Le PlGF est sécrété sous forme d'homodimère durant la grossesse. Il est ainsi présent au niveau du placenta et des CE de la veine du cordon ombilical (HUVEC) et dans d'autres organes. Chez l'adulte il est présent notamment dans le cœur ou les muscles squelettiques (De Falco, 2012). Les effets pro-angiogéniques du PlGF renforcent ceux du VEGF sur la croissance des capillaires : les deux facteurs de croissance induisent une augmentation de la prolifération et de la migration des CE. En revanche, une déficience en PlGF n'induit pas d'anomalie du développement. Le PlGF n'est donc pas indispensable chez l'embryon ; il est en revanche nécessaire chez l'adulte, en particulier de par son implication dans le recrutement des cellules dérivées de la moelle osseuse (Carmeliet et al., 2001). Il a enfin été montré que le PlGF intervient suite à une activation de la cellule endothéliale par le VEGF selon deux modalités. D'une part, il réduit la perméabilité vasculaire ; d'autre part, il renforce les jonctions adhérentes et les jonctions serrées entre les cellules (Cai et al., 2011).

- Structure des gènes

La structure du gène des différentes protéines de la famille du VEGF est très conservée. Le VEGF-A contient 8 exons séparés par 7 introns ; les autres variants et le PlGF comportent 7 exons (Figure 6). Le gène du VEGF est localisé sur le chromosome 6 (6p21.3).

Les exons 3 et 4 codent pour les domaines de fixation aux VEGFR1 et 2 respectivement ; 7 et 8 codent pour les domaines de fixation aux neuropilines. Les domaines 6 et 7 permettent quant à eux la fixation du VEGF à l'héparine (Mackenzie and Ruhrberg, 2012).

L'épissage alternatif du gène du VEGF-A donne lieu à la formation de 5 isoformes : les VEGF 121, 145, 165, 189 et 206 (Houck et al., 1991 ; Poltorak et al., 1997 ; Tischer et al., 1991) (Figure 6).



**Figure 6 : Structure des gènes des VEGF**

*A : Structure des gènes des membres de la famille du VEGF. B : structure des isoformes obtenus par épissage du VEG-A. Adapté d'après (Holmes and Zachary, 2005 ; Lodomery et al., 2007)*

- Structure protéique

Le VEGF natif est une glycoprotéine homodimérique de 46kDa qui a la propriété de se lier à l'héparine. Il s'agit du VEGF165, la forme prédominante parmi les 4 variants du VEGF (Ferrara and Henzel, 1989 ; Leung et al., 1989).

Le VEGF est sécrété sous une forme dimérique (formé de deux monomères de 23kDa) qui est permise par ses résidus cystéine (Pötgens et al., 1994). Le VEGF peut aussi former un hétérodimère avec un autre ligand du VEGFR1, le PlGF (Autiero et al., 2003).

Le VEGF165 contient un site de liaison avec les protéoglycanes à héparanes sulfates (sécrétés ou présents à la surface de la cellule). Cette liaison est impliquée dans l'interaction du VEGF avec ses récepteurs : Gitay-Goren et al ont montré une augmentation de l'affinité du VEGF pour ses récepteurs en présence d'héparane sulfate, et à l'inverse la fixation du VEGF à son récepteur est inhibée en présence d'héparinase (Gitay-Goren et al., 1992). Néanmoins, une forte dose d'héparine inhibe l'action du VEGF et sa liaison, ce qui suggère un effet différent selon les classes de récepteurs du VEGF (Tessler et al., 1994).

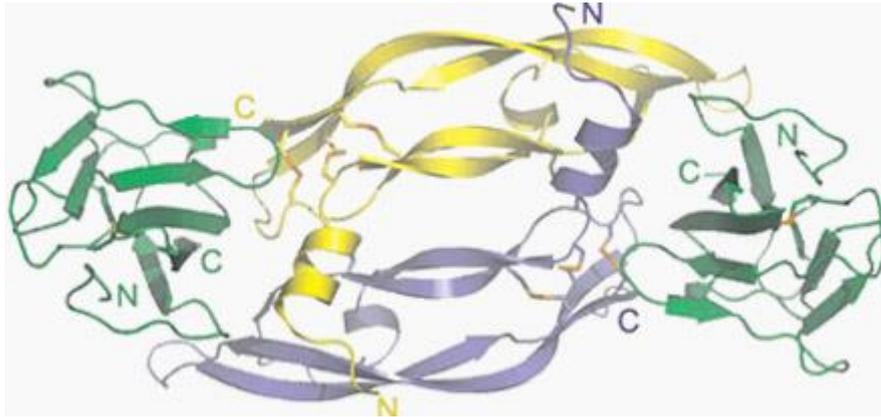
En revanche, le VEGF121 ne possède pas la capacité de lier l'héparane sulfate (Cohen et al., 1995).

Les VEGF189 et 206 sont quant à eux très basiques et fixent l'héparane sulfate avec une forte affinité. De ce fait, ils sont essentiellement présents à la surface de la cellule, contrairement aux deux isoformes précédents qui sont sécrétés. Le VEGF145, quant à lui, est majoritairement lié à la membrane extracellulaire (Houck et al., 1992 ; Poltorak et al., 1997).

Par ailleurs, il existe une autre catégorie d'isoformes, nommés VEGFxxx<sub>b</sub> (selon l'isoforme concernée), dont la structure est proche de celle du VEGF. Ainsi, le VEGF165<sub>b</sub> diffère du VEGF165 par ses six derniers acides aminés (Biselli-Chicote et al., 2011 ; Woolard et al., 2004).

#### - De la structure à l'effet biologique

Les effets biologiques du VEGF sont tout d'abord liés à sa dimérisation. En effet, des mutations sur les cystéines qui permettent cette dimérisation conduisent à une perte totale ou partielle (selon le site muté) de la capacité du VEGF à se dimériser ; or les mutants exclusivement monomériques ne présentent aucune activité biologique (Pötgens et al., 1994) (Figure 7).



**Figure 7 : Dimérisation du VEGF et fixation à son récepteur**  
*Les deux monomères du VEGF (en jaune et violet) se fixent sur le VEGF Receptor-1 (VEGFR1) (en vert). D'après (Ferrara, 2004).*

Les caractéristiques des différents variants du VEGF ont un impact variable sur leur activité biologique. Ainsi, le VEGF<sub>121</sub>, malgré son incapacité à se lier à l'héparane sulfate, peut toutefois se lier aux récepteurs du VEGF et induire un effet biologique, probablement via l'intervention de l'héparane au niveau du récepteur lui-même (Cohen et al., 1995).

Enfin, le VEGF<sub>165b</sub> présente une affinité pour ses récepteurs identique à celle du VEGF<sub>165</sub>, mais il ne se lie pas à ses co-récepteurs, ce qui réduit le signal induit par les récepteurs. Le VEGF<sub>165b</sub> agit donc comme un antagoniste au VEGF<sub>165</sub>. Cependant, il est aussi responsable d'une diminution directe de la phosphorylation du récepteur VEGFR2 (Biselli-Chicote et al., 2011 ; Cébe Suarez et al., 2006 ; Woolard et al., 2004).

### 3.1.3. Expression du VEGF

Au niveau tissulaire, le VEGF est exprimé dans un grand nombre de tissus adultes, notamment dans le poumon, les reins (au niveau de l'endothélium comme des podocytes), et les surrénales en quantités importantes, et dans une moindre mesure dans le foie ou la muqueuse gastrique. La présence de VEGF a également été montrée dans plusieurs zones du cerveau (notamment dans les cellules épithéliales recouvrant les vaisseaux fenêtrés), dans les glandes salivaires, où une présence élevée de VEGF est corrélée à une vascularisation importante, ou encore dans les myocytes des muscles squelettiques et cardiaques. Le VEGF est donc fortement associé aux zones richement vascularisées. Le VEGF est également exprimé dans le tissu adipeux (Berse et al., 1992 ; Maharaj et al., 2006).

D'un point de vue cellulaire, et selon certaines études, le VEGF est synthétisé par les cellules endothéliales en faibles quantités, mais d'autres échouent à le mettre en évidence (Melter et al., 2000; Tischer et al., 1991). Le VEGF est aussi produit par les monocytes et les macrophages, les neutrophiles, les mégacariocytes et les plaquettes, les lymphocytes T ou encore les chondrocytes et les cellules musculaires lisses (Tischer et al., 1991 ; Freeman et al., 1995 ; Möhle et al., 1997 ; Melter et al., 2000 ; Werther et al., 2002 ; Kataru et al., 2009).

#### **3.1.4. Les récepteurs au VEGF (VEGFR)**

Le VEGF agit via plusieurs récepteurs : le VEGFR1, le VEGFR2 et les co-récepteurs neuropilines (NP) 1 et 2 (Figure 8). Les VEGFR appartiennent à la famille des récepteurs tyrosines kinases, dont l'activation entraîne une série de phosphorylations. On notera également l'existence d'un autre membre de la famille de ces récepteurs, le VEGFR3 (ou Flt4), auquel se lient uniquement les VEGF-C et D, et qui est présent dans les vaisseaux lymphatiques (Fitz et al., 1997). Ce dernier ne sera pas décrit dans ce travail.

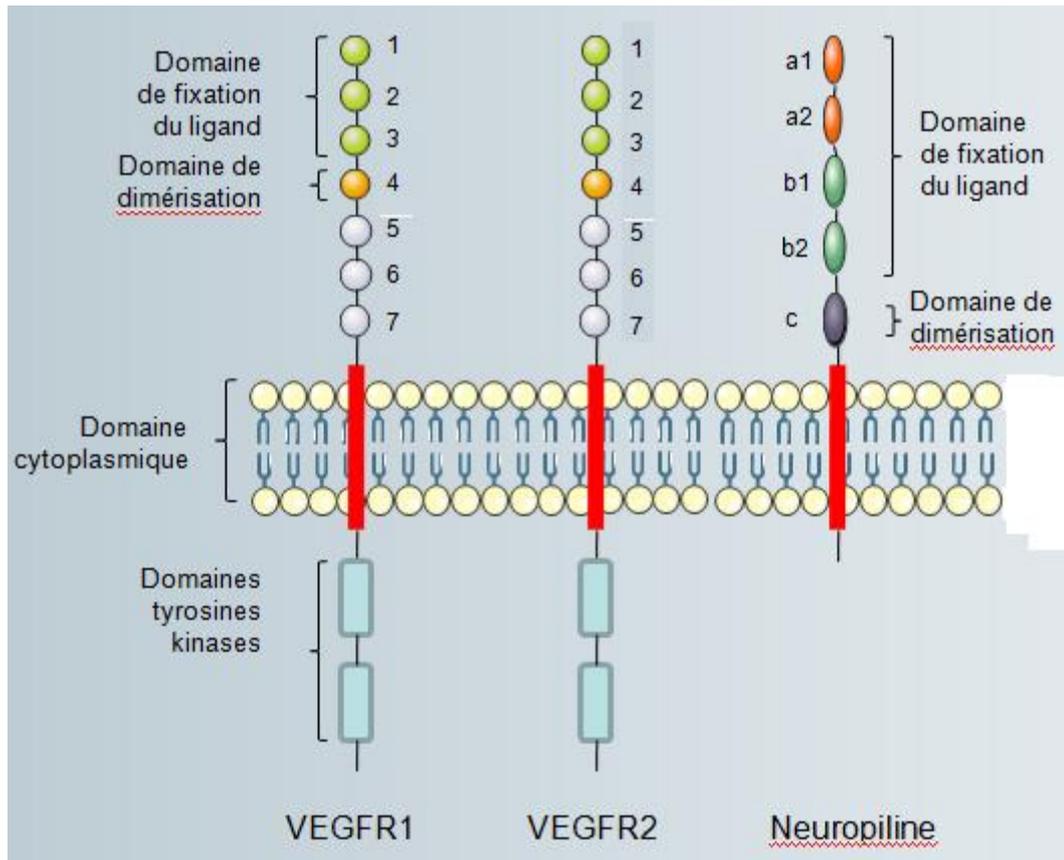
Le VEGFR1 et le VEGFR2 ont une structure similaire. Ils sont composés :

- d'un domaine extra-cellulaire de 7 domaines Ig-like,
- d'un domaine transmembranaire,
- d'un domaine juxta-membranaire et un domaine intra-cellulaire responsables de l'activité kinase (Figure 8).

Les neuropilines n'ont pas d'activité tyrosine kinase. Elles comportent cinq domaines :

- trois domaines extra-cellulaires,
- un domaine transmembranaire,
- un court domaine intra-cytoplasmique (Ortega et al., 1999) (Figure 8).

La fonction de chaque domaine sera détaillée dans les parties qui suivent.



**Figure 8 : Les récepteurs et co-récepteurs du VEGF**  
 Structure des VEGFR1 et 2 et de la neuropiline. Adapté d'après (Ortega et al., 1999)

### 3.1.4.1. Le VEGFR1

Le VEGFR1 est également désigné par le terme Fms-like tyrosine kinase 1 (Flt1). C'est un récepteur à activité tyrosine kinase de 180kDa. Son gène contient 30 exons pour une taille de 190kb. L'exon 1 code pour la séquence leader sécrétoire, les exons 2 à 15 pour le domaine extra-cellulaire, l'exon 16 pour le domaine transmembranaire et les exons 17 à 30 pour la région cytoplasmique (Lennarz and Lane, 2013).

Au niveau de la protéine, le ligand se fixe sur les trois premiers domaines Ig-like de la partie extracellulaire. L'affinité du VEGF pour le VEGFR1, variable selon les espèces et le type de cellule, se situe autour de 10 pM, soit beaucoup plus élevée que celle du PlGF, qui est

aussi l'un de ses ligands (Kd de 170pM). Le quatrième domaine Ig-like est impliqué dans la dimérisation du récepteur (Shibuya, 2001).

Il est principalement exprimé par les CE, mais également par la majorité des monocytes. Son apparition sur les cellules hématopoïétiques (CD34+) est concomitante à l'apparition des marqueurs de la lignée monocyte/macrophages. L'expression constitutive du VEGFR1 en surface de la cellule endothéliale est relativement faible, comparée à celle du VEGFR2. Néanmoins, des études ont montré que la majorité du VEGFR1 était stockée dans l'appareil de Golgi de la cellule endothéliale. Le récepteur est tout d'abord stocké sous forme immature puis modifié et glycosylé dans les 30 minutes qui suivent sa synthèse pour devenir actif. Une stimulation par le VEGF n'a pas d'impact sur ce processus de synthèse, ni sur la dégradation du récepteur. En revanche, le VEGF induit le transport d'une partie des récepteurs de l'appareil de Golgi vers la membrane cellulaire. L'activation des cellules par le VEGF peut donc être prolongée par l'augmentation du nombre de récepteurs en surface (Waltenberger et al., 1994).

Le VEGFR1 est impliqué dans le remodelage de la membrane et notamment de ses protéines d'adhésion à la matrice extracellulaire. Ainsi, il intervient dans le recyclage des intégrines en surface de la cellule et dans la polymérisation des fibronectines : ces événements sont essentiels à l'angiogenèse (Jones et al., 2009). Le VEGFR1 induit également la migration des monocytes via la fixation du VEGF. Son effet est accentué par une activation des monocytes qui augmente l'expression en surface du récepteur (Barleon et al., 1996 ; Sawano et al., 2001). Dans la CE en revanche, l'activation du VEGFR1 seul par le VEGF n'explique pas une partie des effets du VEGF concernant l'angiogenèse, et notamment la migration. Ceci suggère l'intervention d'autres récepteurs au VEGF.

Une mutation dirigée contre le locus du VEGFR1 induit chez embryons de souris homozygotes une mort *in utero* à 8.5 jours. Les hétérozygotes présentent un développement normal (Fong et al., 1995).

Le VEGFR1 est également le récepteur du PlGF. Son activation par le PlGF conduit notamment à une transphosphorylation du VEGFR2. D'autre part, induction de l'angiogenèse par le VEGF est augmentée de façon synergique par le PlGF : cet effet est permis par la dimérisation du VEGF et du PlGF. Une homodimérisation du PlGF n'induit pas un tel effet (Autiero et al., 2003).

Enfin, le VEGFR1 existe sous une forme soluble d'environ 100kDa, le sVEGFR1. Cette protéine sera étudiée plus en détail dans une autre partie.

### **3.1.4.2. Le VEGFR2**

Le deuxième récepteur au VEGF est le VEGFR2, aussi appelé Kinase insert Domain Receptor (KDR) ou Fetal Liver Kinase 1 (Flk1). Comme celui du VEGFR1, le gène du VEGFR2 compte 30 exons ; sa structure est identique, mais sa taille totale est de 47kb (Lennarz and Lane, 2013).

C'est une protéine de 150kDa. Son affinité pour le VEGF (Kd autour de 770pM pour les CE) est nettement inférieure à celle du VEGFR1. La fixation du VEGF au VEGFR2 a été démontrée en 1993 par Quinn et al, en mesurant sa fixation sur des cellules COS (CV-1 in Origin and carrying SV-40) transfectées avec l'ADNc du VEGFR2 (Quinn et al., 1993). Elle induit l'autophosphorylation du récepteur au niveau des résidus tyrosine, et ce pour les deux principaux variants du VEGF, le VEGF121 et le VEGF165. Cette phosphorylation du VEGFR2 est plus importante que pour le VEGFR1 (Pan et al., 2007).

Le VEGFR2 est exprimé et phosphorylé de façon constitutive dans le rein, les poumons, le foie et les adipocytes (Maharaj et al., 2006).

Il est présent à la fois sur la membrane de la cellule et au sein de structures de type endosomes. Le VEGF stimule son transport dans la membrane, notamment via l'activation des tyrosines kinases src (dont le gène a initialement été identifié dans le Virus du Sarcome de Roux) présentes dans les vésicules qui renferment le VEGFR2. Cependant, une stimulation par le VEGF induit dans les deux heures qui suivent une diminution de l'expression du VEGFR2 à la membrane (du domaine extracellulaire comme du domaine intracytoplasmique), son accumulation dans des endosomes puis dans des lysosomes ; l'activité kinase du récepteur n'est pas impliquée dans son internalisation, mais elle est nécessaire à cette dernière phase de dégradation. On voit donc apparaître une régulation de l'expression membranaire du récepteur.

L'activation du VEGFR2 par le VEGF est responsable de la multiplication des cellules. Sur des HUVECs en culture, on observe un effet maximal du VEGF sur la prolifération (mesurée par l'incorporation de thymidine tritiée) à la concentration de 1ng/ml, une capacité

de réponse plus importante que pour des CE aortiques (Waltenberger et al., 1994). La fixation du VEGF sur le VEGFR 2 induit également dans des cellules aortiques une modification du cytosquelette et une apparition de pili dans les minutes qui suivent l'activation, alors que ces effets ne sont pas visibles lors de l'activation du VEGFR1. Le VEGFR2 médie enfin la migration et le chimiotactisme des CE, fonction qui n'a pas été observée pour le VEGFR1 (Quinn et al., 1993 ; Waltenberger et al., 1994).

Des embryons murins VEGFR2<sup>-/-</sup> présentent des anomalies conduisant à la mort *in utero* entre 8.5 et 9.5 jours de gestation : l'hématopoïèse et l'endothélium sont tous deux affectés (Shalaby et al., 1995).

On notera enfin l'existence d'un variant soluble du VEGFR2, nommé sVEGFR2, de 160kDa, détecté chez la souris, l'homme, et dans des cellules Sf9 (lignée de cellules ovariennes issue du papillon *Spodoptera frugiperda*) : c'est une protéine sécrétée par les CE qui, comme le sFlt1, a la capacité de se fixer au VEGF. À ce jour, il n'a pas été démontré que le sVEGFR2 pouvait provenir d'un clivage du récepteur ; en revanche, des études ont montré sa synthèse par épissage alternatif. Il est notamment impliqué dans la régulation négative de la lymphangiogenèse (Albuquerque et al., 2009 ; Ebos et al., 2004).

### 3.1.4.3. *Les neuropilines*

En plus de ses récepteurs spécifiques, le VEGF se lie à un co-récepteur, connu initialement pour son rôle dans le développement neuronal : la neuropiline. On la trouve donc en grande quantité dans le système nerveux au cours du développement embryonnaire, où elle participe à la croissance des neurones, mais aussi dans le glomérule. Chez l'adulte, elle est détectée dans le cœur, le placenta, le rein, le foie, les muscles squelettiques ou encore le poumon (Robert et al., 2000 ; Soker et al., 1998). Ces localisations correspondent notamment à celles du VEGFR2 : la neuropiline est en fait un co-récepteur dont le rôle est la potentialisation de l'interaction entre le VEGF et le VEGFR2, par la formation d'un complexe entre le ligand et les deux récepteurs.

Il existe deux types de neuropilines. Toutes deux sont des glycoprotéines de 130-140kDa. Elles comportent 3 domaines extracellulaires a1a2, b1b2 et c. Les deux premiers servant à la fixation des ligands. Le troisième permet la dimérisation du récepteur. La grande

taille de son domaine extracellulaire (860 acides aminés) et la présence de ces trois sites de fixation expliquent ses interactions multiples avec d'autres ligands et récepteurs. En revanche, son domaine intracellulaire réduit (40 acides aminés) ne lui permet pas d'avoir une activité biologique propre (Mamluk et al., 2002 ; Neufeld et al., 2002 ; Soker et al., 2002 ; Tirand, 2007).

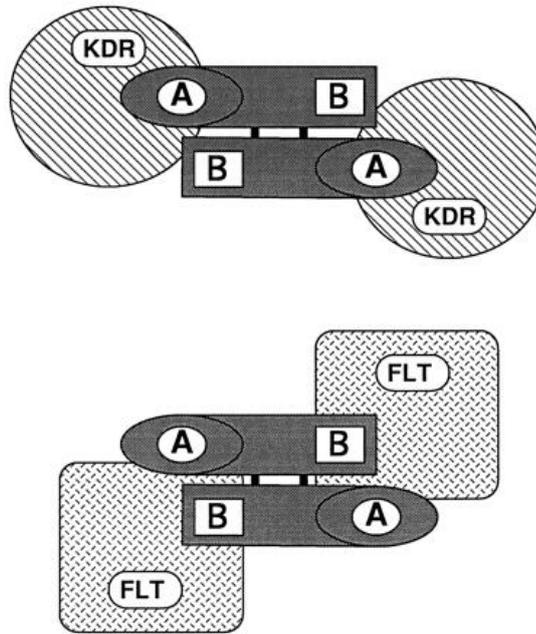
La neuropiline 1 peut lier non seulement les VEGF165, 189 et 206, mais aussi le PlGF-2 ; l'héparine participe à la fixation de ces ligands. La neuropiline 2 lie le VEGF165, le VEGF145, et les VEGF-C et -D. Elle interagit avec le VEGFR3 dans le développement des vaisseaux lymphatiques. Elle est également nécessaire à la morphogenèse de structures spécifiques telles que les glandes mammaires où elle intervient au niveau des cellules épithéliales (Goel et al., 2011 ; Xu et al., 2010).

Si les premières études sur le sujet affirmaient que VEGF121 n'avait pas la capacité de se lier à la neuropiline (Soker et al., 1998), il a été montré plus récemment que les deux principaux isoformes du VEGF, le VEGF121 et le VEGF165, peuvent tous deux se lier à la neuropiline 1 (Pan et al., 2007).

Comme pour les autres récepteurs, il existe un variant soluble de la neuropiline 1 : ce fragment de 90kDa inhibe la fixation du VEGF à ses récepteurs et donc ses effets (Gagnon et al., 2000).

#### **3.1.4.4. Dimérisation des récepteurs au VEGF**

De nombreuses études montrent que l'homo- et l'hétérodimérisation des deux récepteurs du VEGF, le VEGFR1 et le VEGFR2, est possible.



**Figure 9 : Liaison du dimère de VEGF à ses récepteurs**

*Ce schéma propose une explication du mécanisme de dimérisation des récepteurs induite par le ligand. La structure en dimère du VEGF permet la fixation de chaque épitope du VEGF à son récepteur cible : un groupe d'acides aminés basiques se lie au VEGFR2, alors que le site de fixation au VEGFR1 est composé de résidus acides. D'après (Keyt et al., 1996)*

Elle serait permise par la structure en dimère du VEGF (Keyt et al., 1996) (Figure 9), mais la dimérisation des récepteurs est également possible en l'absence du ligand. Une modélisation du comportement des récepteurs suggère que la formation d'hétérodimères VEGFR1/VEGFR2 est fortement favorisée par la présence du VEGF ; en revanche, la formation d'homodimères ne serait que très peu augmentée par le VEGF, et dépendrait surtout de la densité des récepteurs. Il y aurait donc une dimérisation précédant la fixation du ligand. Néanmoins, l'activation de ces dimères dépend de la fixation des deux molécules de VEGF aux deux récepteurs (Mac Gabhann and Popel, 2007).

Les hétérodimères VEGFR1/2 médient un effet biologique important. L'induction de la migration des cellules, notamment, est plus importante via l'hétérodimère que via le VEGFR2 seul. Il y a une transphosphorylation du VEGFR2 par le VEGFR1 (Huang et al., 2001 ; Keyt et al., 1996).

Rappelons également que le VEGF lui-même peut former un hétérodimère avec le PlGF. Le complexe formé par les deux ligands augmente la formation d'hétérodimères VEGFR1/2, et induit une augmentation de l'angiogenèse (Autiero et al., 2003).

La neuropiline 1, quant à elle, forme un hétérodimère avec le VEGFR1 et le VEGFR2. Sa liaison avec le VEGFR1 induit une diminution de l'affinité du VEGF pour le co-récepteur (Fuh et al., 2000).

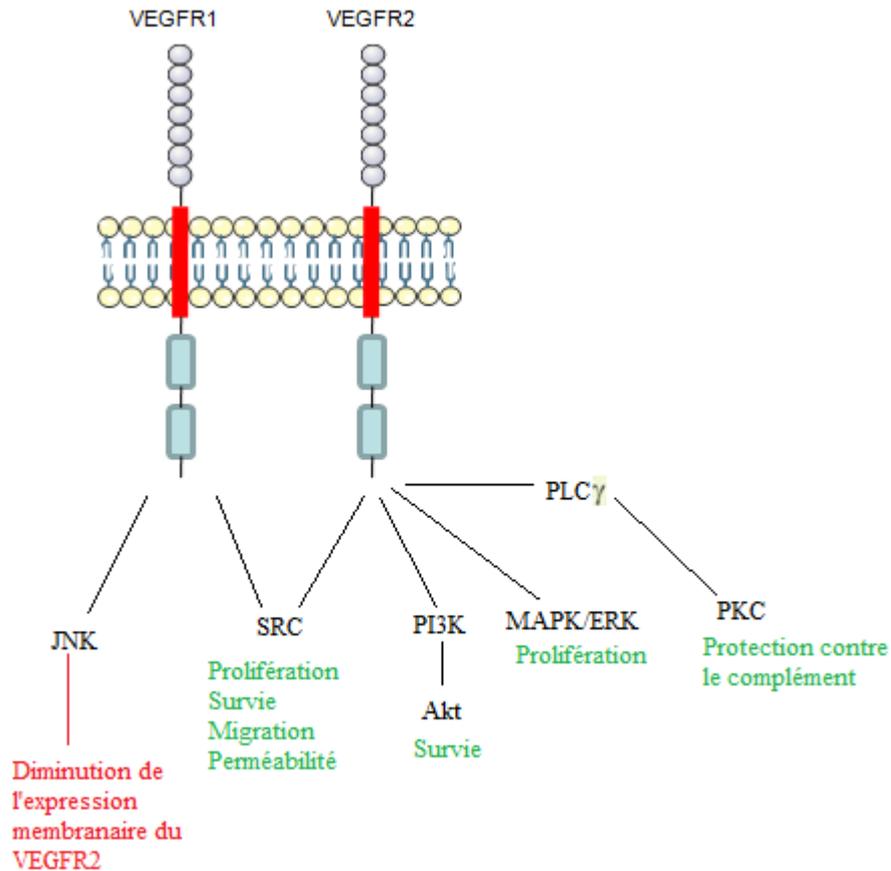
Sa dimérisation avec le VEGFR2 est dépendante de la fixation du VEGF à la neuropiline ; son action est nécessaire à la phosphorylation de la Focal Adhesion Kinase (FAK) et la voie src (Herzog et al., 2011).

La variabilité des effets induits par les isoformes du VEGF s'explique en partie par cette dimérisation : le VEGF<sub>165</sub> provoque l'hétérodimérisation de la neuropiline 1 avec le VEGFR2, mais pas le VEGF<sub>121</sub>, c'est pourquoi les effets de ce dernier sont plus réduits (Pan et al., 2007).

#### **3.1.4.5. Voies de signalisation des récepteurs**

Le VEGFR1 est activé par la phosphorylation de résidus tyrosines, et conduit à l'activation de la famille src, notamment Fyn et Yes. Cette famille de protéines kinases est impliquée dans la prolifération, la survie, la migration et la perméabilité des CE (Waltenberger et al., 1994).

L'activation du VEGFR2 peut conduire à l'autophosphorylation de six tyrosines différentes. Chaque tyrosine ou groupe de tyrosines induit l'activation de voies différentes : src (comme pour le VEGFR1), Phospholipase C gamma (PLC $\gamma$ ) ou encore Phosphatidylinositide 3-Kinases (PI3K) (Figure 10). Certaines provoquent une activité kinase accrue du récepteur. D'autres enfin constituent des sites de fixation de protéines adaptatrices, comme le T cell-Specific Adaptor (TSA $\delta$ ), qui est impliqué dans la régulation des jonctions intercellulaires et de la perméabilité (Dayanir et al., 2001 ; Dougher and Terman, 1999 ; Sun et al., 2012).



**Figure 10 : principales voies de signalisation activées par les VEGFR1 et 2**

Il existe une balance entre le VEGFR1 et le VEGFR2, selon les voies activées par le VEGF. En effet, l'activation du VEGFR2 par son ligand active les Mitogen-activated Protein Kinases (MAPK) et notamment les Extracellular signal-Regulated Kinases (ERK), et conduit à une ubiquitination du VEGFR1. Or l'ubiquitination du récepteur diminue son expression membranaire et conduit à son accumulation dans la cellule. Les voies c-Jun N-terminal Kinases (JNK) vont quant à elles down-réguler l'expression membranaire du VEGFR2. Or l'activation du VEGFR1 par le PlGF active la phosphorylation de JNK : on a donc bien une régulation de l'expression du VEGFR2 par le VEGFR1. Ces mécanismes font écho à la balance MAPK/JNK qui régule finement la survie et l'absence de prolifération des CE (Ewan et al., 2006 ; Gampel et al., 2006 ; Gupta et al., 1999 ; Mittar et al., 2009 ; Quinn et al., 1993 ; Zhang et al., 2010).

### 3.1.5. Les fonctions du VEGF

Le VEGF joue avant tout un rôle dans l'angiogenèse embryonnaire, comme le démontre l'étude de Carmeliet : des embryons de souris hétérozygotes VEGF<sup>+/-</sup> développent une vascularisation anormale, alors que des homozygotes VEGF<sup>-/-</sup> meurent en cours de gestation (Carmeliet et al., 1996).

Mais le VEGF est également impliqué dans le développement vasculaire post-natal, dans le maintien et le remodelage des vaisseaux tout au long de la vie, ainsi qu'au niveau d'autres tissus, tels que le tissu osseux.

Des animaux déficients en VEGF (obtenus par suppression de l'exon 3) présentent un développement anormal et une agrégation de cellules souches pour les hétérozygotes, et une mort de l'embryon à la moitié de la gestation pour les homozygotes (Carmeliet et al., 1996).

Dans ce cadre, le VEGF intervient au cours de plusieurs étapes du développement et de la survie de l'endothélium.

#### 3.1.5.1. *Prolifération*

Les premiers tests mettant en évidence l'effet prolifératif du VEGF ont été réalisés sur un modèle de membrane chorioallantoïde de poulet (CAM) : un embryon est récupéré dans un œuf fécondé de huit jours, et placé en boîte de pétri, puis le traitement est appliqué sur une portion de la membrane chorioallantoïde grâce à un anneau de silicone. On peut ainsi évaluer l'impact du traitement sur l'angiogenèse. Ainsi, Leung et al. ont montré qu'après 72h de stimulation, le VEGF induit une augmentation de 85% de l'angiogenèse, mesurée par l'augmentation du nombre de vaisseaux formés (Leung et al., 1989). Ces tests ont donc confirmé l'action pro-angiogénique du VEGF. Ferrara et Henzel ont également montré un effet dose-dépendant du VEGF sur la croissance de différents types de CE (capillaires cérébraux, veine ombilicale, aorte fœtale et adulte, et capillaire de cortex surrénal) (Ferrara and Henzel, 1989)

Le VEGF intervient également dans la prolifération d'autres types cellulaires, tels que les cellules épithéliales (Villegas et al., 2005).

Le VEGF, comme d'autres facteurs de croissance (EGF ou FGF), stimule la prolifération cellulaire via l'activation des MAPK/ERK. En revanche, à l'inverse des autres facteurs de croissance, l'action du VEGF passe par la Protéine Kinase C (PKC) et la PLC $\gamma$  (activées par le VEGFR2). Il y a donc une voie spécifique du VEGF (Wu et al., 2000).

### **3.1.5.2. *Survie et apoptose***

Le VEGF limite également l'apoptose via une activation des voies Akt (qui down-régulent les p38 MAPK, à l'origine d'un signal d'apoptose) et des protéines B-Cell lymphoma-2 (Bcl2), un facteur anti-apoptotique (Gratton et al., 2001 ; Villegas et al., 2005). Néanmoins, certains facteurs ambivalents ou pro-apoptotiques peuvent être up-régulés par le VEGF, tels que la famille E-twenty six (Ets), qui induit des signaux pro et anti-apoptotiques, ou les caspases 3 et 7, pro-apoptotiques de la catégorie des caspases effectrices (dont l'activation est consécutive à celles des caspases initiatrices) (Jih et al., 2001). Ceci traduit donc une régulation fine de l'angiogenèse par la balance de facteurs favorables et défavorables à la survie des CE en conditions physiologiques.

### **3.1.5.3. *Migration***

Le VEGF<sub>121</sub> et le VEGF<sub>165</sub> stimulent la migration des CE. Certaines études suggèrent l'implication de la neuropiline dans cet effet du VEGF, mais cela reste débattu (Pan et al., 2007). Le VEGF stimule la migration par un mécanisme de chimiotactisme positif : la sécrétion paracrine du VEGF au cours de l'angiogenèse crée ainsi un gradient chimioattractant (Villegas et al., 2005). Ce n'est cependant pas la seule molécule responsable de la chimio-attraction : le Stromal cell-derived Factor 1 (SDF-1), via ses récepteurs sont les Récepteurs de Chimioamines (CXCR) 4 et 7, attire les progéniteurs endothéliaux sur le site de l'angiogenèse et permettent l'organisation en tube de ces cellules (Yan et al., 2012).

Au niveau de la cellule, le VEGF augmente l'activité de l'uPA et l'expression en surface des CE de son récepteur (uPAR). Or l'activation des uPARs est nécessaire à la formation de pseudopodes et à la déformabilité des cellules, lesquelles permettent la migration (Mandriota et al., 1995).

#### **3.1.5.4. Recrutement de précurseurs**

Nous avons vu que l'angiogenèse impliquait entre autres le recrutement de précurseurs de CE dérivées de la moelle osseuse : ce recrutement passe par la fixation du VEGF sur ses récepteurs VEGFR1 et VEGFR2. Le VEGF induit la différenciation des cellules AC133+, les cellules souches hématopoïétiques, en progéniteurs endothéliaux via l'activation du VEGFR2 et de la neuropiline-1 (Fons et al., 2004 ; Rafii et al., 2002).

#### **3.1.5.5. Protéases**

Le remodelage des vaisseaux passe également par une dégradation de la matrice extracellulaire qui supporte la couche de CE. Le VEGF participe à cette étape en stimulant l'expression de métalloprotéases matricielles (MMP) par ces cellules, et notamment la collagénase interstitielle, aussi appelée MMP-1 (Unemori et al., 1992).

#### **3.1.5.6. Perméabilité**

Outre sa fonction pro-proliférative, le VEGF induit une augmentation de la perméabilité des capillaires en régulant leur fenestration et la formation des VVO sur lesquelles est exprimé le VEGFR2. Il provoque également, comme nous l'avons vu, la phosphorylation et l'internalisation des protéines constituant les jonctions intercellulaires via le VEGFR2 et la voie src (Dvorak and Feng, 2001 ; Roberts and Palade, 1995 ; Sun et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que la stimulation d'HUVEC par le VEGF est responsable d'une rapide libération du Ca<sup>2+</sup>, ce qui est cohérent avec les études montrant une modulation de la perméabilité vasculaire par les influx de Ca<sup>2+</sup> (Brock et al., 1991 ; Curry, 1992). Un autre argument en faveur de cette fonction est la faible expression de VEGF dans les vaisseaux les plus imperméables, au niveau de la rétine et des barrières hémato-encéphalique et hémato-testiculaire par exemple (Maharaj et al., 2006).

Ces effets du VEGF sont cohérents avec les études montrant que la voie src, activée par la phosphorylation du VEGFR2, est impliquée dans la perméabilité de l'endothélium et les processus inflammatoires (Kim et al., 2009).

### 3.1.5.7. *Lésions et immunité*

Le VEGF est impliqué dans la coagulation : il stimule la libération du Facteur de Von Willebrand (vWF), un facteur impliqué dans l'agrégation plaquettaire en cas de lésions vasculaires. Pour ce faire, le VEGF déclenche vraisemblablement la libération du vWF contenu dans les corps de Weibel-Palade. Cet effet passe par le VEGFR2 et la PLC $\gamma$ , mais une régulation négative est opérée par la voie Akt (Brock et al., 1991 ; Xiong et al., 2013).

Le VEGF régule également le trafic des lymphocytes : il stimule la transmigration des lymphocytes T à travers la barrière endothéliale via son VEGFR2 (à l'inverse des monocytes, dont le recrutement, comme cela a déjà été noté, passe par le VEGFR1). Le VEGF oriente également les lymphocytes vers la voie Th1, en induisant une augmentation de l'Interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et une diminution de l'IL-10 (Mor et al., 2004). En revanche, ses effets mitogéniques et anti-apoptotiques sur les lymphocytes T sont négligeables (Barleon et al., 1996 ; Edelbauer et al., 2010).

Le VEGF intervient enfin dans la protection contre les effets du complément : il augmente l'expression du Decay-Accelerating Factor (DAF), qui limite la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) et donc protège la cellule contre la lyse dans un contexte inflammatoire. L'effet du VEGF passe par la voie PKC. En revanche, le VEGF ne régule pas l'expression du Membrane Cofactor Protein (MCP) ou du CD59, deux autres facteurs de protection contre le complément qui à la différence de DAF ne sont pas non plus régulés par les facteurs pro-inflammatoires ou le MAC (Mason et al., 2001, 2002 ; Pepper et al., 1992).

Par ailleurs, l'expression des molécules d'adhésion VCAM, ICAM et E-sélectine est stimulée par le VEGF via le VEGFR2, mais comme pour le vWF, est down-régulée par la voie PI3K/Akt (Kim et al., 2001).

D'autres travaux ont mis en évidence l'implication du VEGF dans de nombreux autres processus, qui ne seront pas détaillés ici ; certains d'entre eux découlent de l'angiogenèse elle-même. On peut noter par exemple les mécanismes de remodelage du cartilage et les processus d'ossification, qui sont régulés négativement par la présence de structures vasculaires. On retrouve par ailleurs une forte expression du VEGFR1 et une faible expression du VEGFR2

dans les ostéoblastes (cellules responsables de la formation du tissu osseux) (Gerber et al., 1999).

### 3.1.6. Régulation du VEGF

De nombreux facteurs interviennent dans la régulation du système du VEGF et de l'angiogenèse en situation physiologiques. Les mécanismes les plus importants seront détaillés ici.

- Auto-régulation de l'activité du VEGF par la régulation de ses récepteurs

Dans la cellule endothéliale, le VEGF lui-même diminue l'expression membranaire du VEGFR1 et du VEGFR2. En parallèle, il stimule la synthèse d'ARN de ces deux récepteurs, laquelle permet dans un deuxième temps de rétablir leur expression initiale en surface. L'activité des MAPK, qui témoigne de l'activation des récepteurs par leur ligand, est rétablie au bout de 6h. Ces mécanismes permettent de réguler la réponse de la cellule au VEGF (Wang et al., 2000).

- Régulation par l'hypoxie

L'un des mécanismes de régulation du VEGF les plus documentés est l'hypoxie. In vivo, la formation d'une néovascularisation induite par la déprivation en oxygène des tissus a été longuement décrite, notamment dans le cadre des tumeurs ; il y a alors une importante libération de VEGF qui est responsable de la rapide prolifération des CE. Cette synthèse accrue de VEGF est aussi observée au niveau des macrophages et des cellules musculaires lisses maintenues à une faible tension en oxygène *in vitro*. En réponse à l'hypoxie, le Facteur Induit par l'Hypoxie-1 (HIF-1) peut activer de façon similaire le gène du VEGF grâce à un élément cis-régulateur. Enfin, l'expression du VEGFR2 lui-même est stimulée après 24h d'hypoxie (Brogi et al., 1994 ; Forsythe et al., 1996 ; Harmey et al., 1998 ; Shweiki et al., 1992 ; Waltenberger et al., 1996).

- Régulation par les contraintes physiques exercées sur l'endothélium

Comme cela a été noté précédemment, les contraintes physiques (étirement, cisaillement) exercées sur la paroi vasculaire et les CE induisent une réponse de l'endothélium. Or, l'étirement de l'endothélium influe sur l'expression par la cellule

endothéliale du VEGF et de HIF-1a et HIF-2a. Cet effet passe par deux voies, la première provoquée par l'activation ligand-dépendante du VEGFR2, la seconde par son activation indépendante de la fixation du ligand, c'est à dire induite uniquement par les contraintes du flux sanguin (Jin et al., 2003 ; Milkiewicz et al., 2007).

- Régulation par les cytokines inflammatoires

Les cytokines pro-inflammatoires peuvent aussi réguler le système du VEGF. En effet, le TNF- $\alpha$  augmente la transcription de VEGFR2 et de la neuropiline 1 dans les CE ainsi que l'expression en surface du VEGFR2 et stimule la migration de ces même CE après activation par le VEGF. Cet effet passe par l'induction de l'IL-8 et de son récepteur. Le TNF- $\alpha$  et le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) induisent aussi directement la libération de VEGF. Contrairement à l'hypoxie, plus spécifique du VEGF, ces facteurs influent aussi sur d'autres facteurs de croissance, tels que le bFGF (Brogi et al., 1994 ; Defilippi et al., 1991 ; Giraud et al., 1998 ; Yoshida et al., 1997).

- Régulation par l'héparine

Enfin, l'héparine soluble et l'héparane sulfate régulent la sécrétion de certains isoformes du VEGF : ainsi, elles activent fortement la libération du VEGF189, l'un des isoformes basiques se liant à la matrice extracellulaire grâce aux héparines qu'elle contient. La libération de VEGF165 est quant à elle augmentée, alors que celle de VEGF121 n'est pas modifiée (Houck et al., 1992).

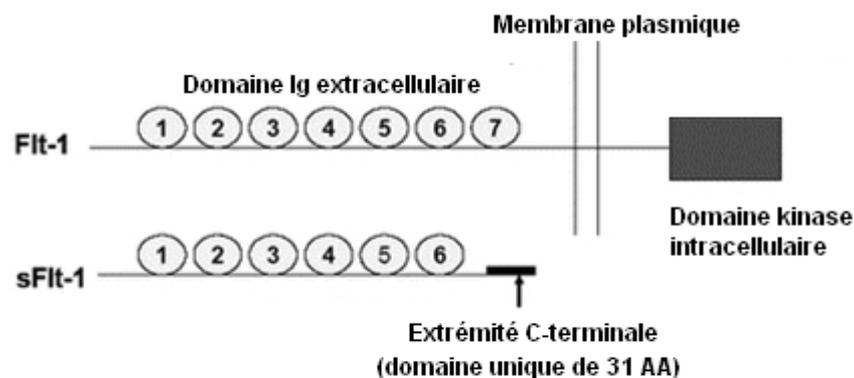
Nous avons donc vu dans cette première partie que les principaux effets pro-angiogéniques du VEGF étaient médiés par le VEGFR2, malgré la plus forte affinité du ligand pour le VEGFR1. De ce fait, le VEGFR1 et son variant soluble vont jouer un rôle de piège et d'antagoniste au VEGF. Pour cette raison, nous nous intéressons tout particulièrement à cet acteur dans ce travail.

## 3.2. Le sFlt1

### 3.2.1. Structure du sFlt1

Le VEGFR1 soluble ou sFlt1 est un dérivé du VEGFR1 et présente donc une structure similaire, quoique tronquée, à celle de ce dernier. Selon le type de cellule dont il provient, sa taille varie entre 110kDa et 130kDa, cet écart étant lié à différents niveaux de glycosylation.

Enfin, il possède une partie spécifique de 31 acides-aminés à son extrémité C-terminale, ce qui permet de le distinguer du VEGFR1 membranaire (Figure 11).



**Figure 11 : VEGFR1 soluble et membranaire**

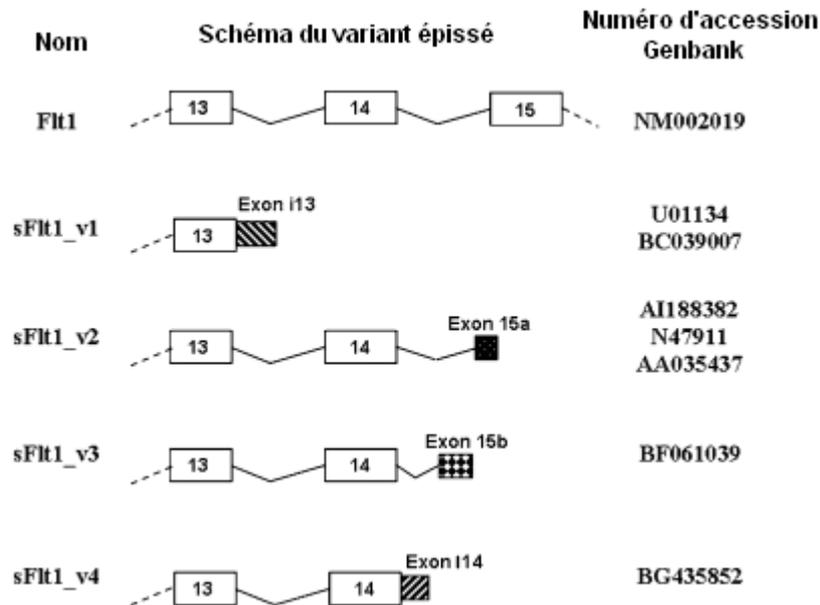
*Le sFlt1 est dépourvu du domaine transmembranaire et du domaine intracellulaire, mais présente un domaine unique de 31 acides aminés. D'après (Maynard et al., 2005)*

### 3.2.2. Synthèse du sFlt1

Le sFlt1 est synthétisé selon deux processus différents.

Le premier, décrit de longue date, consiste en un **épissage alternatif du récepteur**. Il s'agit de l'épissage d'un transcrite de 3.2Kb, qui subit un clivage sur trois sites (un proximal et deux distaux) et une polyadénylation. Un signal cis-régulateur dans l'intron 13 régule l'épissage et la polyadénylation : c'est lui qui détermine le ratio membranaire/soluble.

En outre, ce processus donne naissance à quatre variants qui diffèrent dans leur région 3'-UTR : le premier, sFlt1-v1, est coupé après l'exon 13, et les trois autres, sFlt1 v2 (fréquemment désigné par sFlt1-v14), v3 et v4, après l'exon 14. Ces versions tronquées sont sécrétées en plus grande quantité que la version membranaire (Heydarian et al., 2009 ; Huckle and Roche, 2004 ; Thomas et al., 2007, 2010). (Figure 12).



**Figure 12 : Structure des variants du sFlt1**  
D'après (Heydarian et al., 2009)

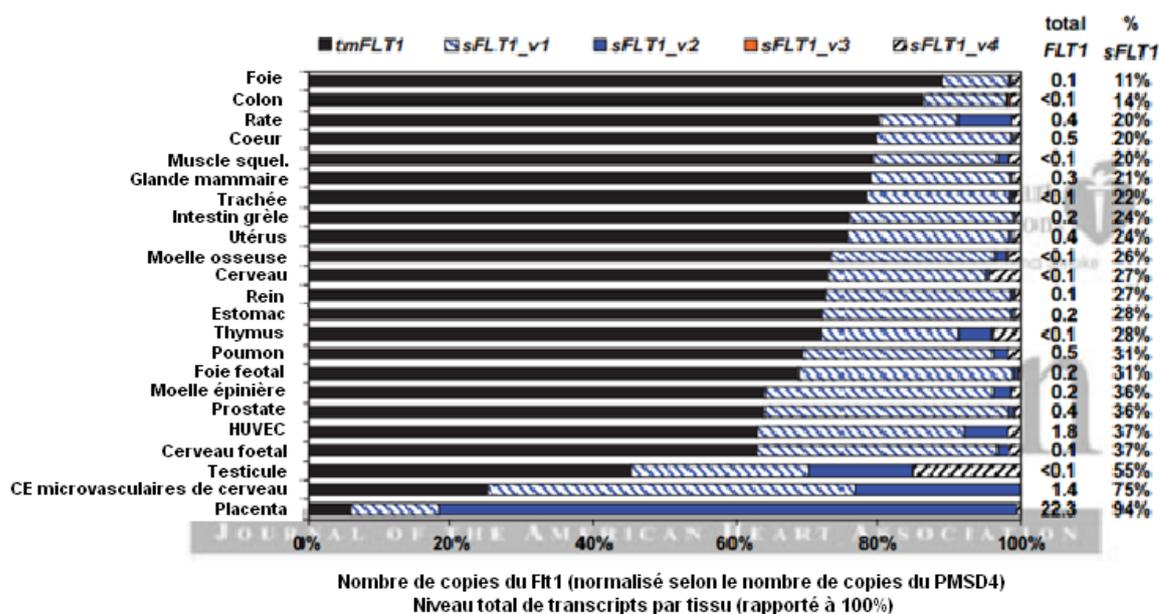
Le deuxième mécanisme de synthèse du sFlt1 consiste en un **clivage du récepteur à la membrane**. Il a été mis en évidence dans des lignées cellulaires de lymphome. Dans ces cellules, la production de sFlt1 s'accompagne d'une diminution du nombre de VEGFR1 en surface, et de l'apparition dans le cytoplasme d'un fragment de 60kDa environ. Ce fragment correspond à la fraction intracellulaire du récepteur (Rahimi et al., 2009).

Deux actions successives sont nécessaires à ce processus. La première, la libération de la partie extracellulaire ou ectodomaine, met en œuvre de métalloprotéases de la famille des A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM). Après cette étape de clivage, la partie intramembranaire est libérée dans le cytoplasme par des gamma-sécrétases et transportée au noyau (Cai et al., 2011 ; Rahimi et al., 2009).

Il est à noter que TIMP-1, un inhibiteur des métalloprotéases matricielles, induit une augmentation de la sécrétion de sFlt1 et réduit la prolifération induite par le VEGF. Cependant, il intervient dans d'autres mécanismes que la régulation des métalloprotéases, il n'est donc pas exclu que cette augmentation provienne de l'activation d'autres intermédiaires, ou que les protéines impliquées dans le clivage ne soient pas des cibles de TIMP-1 (Bruegmann et al., 2009).

### 3.2.1. Sources du sFlt1

S'il est décrit dans la majorité des tissus, c'est incontestablement au niveau du placenta que le sFlt1 est présent dans les quantités les plus importantes. Le Flt1 est exprimé également dans le cœur, le rein, les poumons, et de nombreux autres organes, mais en quantités plus faibles et différentes selon les variants (Hornig et al., 2000 ; Jebbink et al., 2011) (Figure 13). Par ailleurs, dans le placenta, le ratio membranaire/soluble est beaucoup plus déséquilibré en faveur du second que dans les autres organes, tant du point de vue de l'ARN que de celui de la protéine. Comme on peut s'y attendre, le facteur pro-angiogénique PlGF, ligand du VEGFR1, y est très exprimé également, mais en contrepartie, le placenta sécrète très peu de VEGF (Hornig et al., 2000).



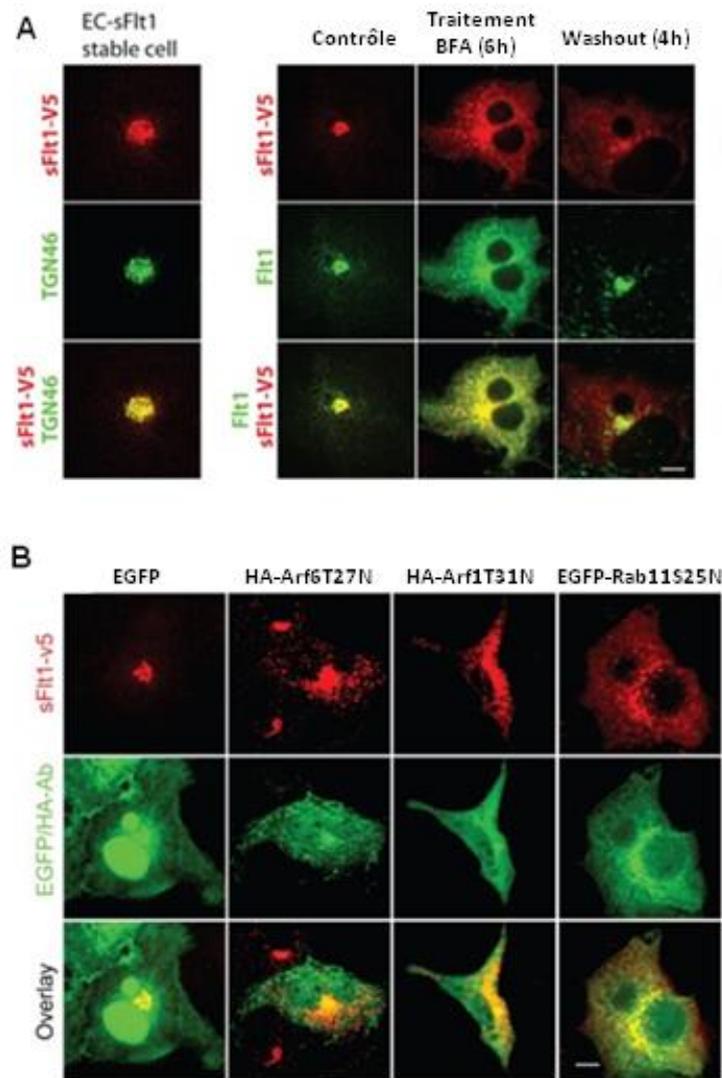
*Figure 13 : Expression des variants du sFlt1 dans différents tissus  
D'après (Jebbink et al., 2011)*

Le sFlt1 est présent dans le sang des individus sains à hauteur de 100 à 160pg/ml de sérum ou de plasma en moyenne. Il est sécrété par plusieurs types de CE, parmi lesquelles les HUVECS, les CE microvasculaires dermiques (HDMEC), les CE de l'artère du cordon ombilical (HUAEC), les CE microvasculaires rénales (HKMEC), les CE microvasculaires de la rétine (HRMVEC), mais aussi par des cellules non endothéliales telles que les monocytes, les cellules dendritiques, les trophoblastes, les péricytes et certaines lignées de cellules de mélanomes (Barleon et al., 2001 ; Hornig et al., 2000 ; Jin et al., 2012).

Les variants de sFlt1 sont sécrétés de manière différentielle par ces différents types cellulaires. Par exemple, l'un d'eux, identifié sous le nom de sFlt-14 par certaines équipes, est produit par des cellules non endothéliales, telles que les cellules du muscle lisse. Il est à noter que sa synthèse est stimulée par le VEGF. Il s'agit probablement d'un mécanisme de protection contre les effets du VEGF pour ces types cellulaires particuliers (Sela et al., 2008).

### **3.2.1. Mécanismes de sécrétion du sFlt1**

Jung et al. ont analysé le transport de sFlt1 dans la cellule ainsi que sa libération, et ainsi confirmé l'existence d'une synthèse *de novo*. En effet, le blocage du transfert des vésicules du Réticulum Endoplasmique (RE) vers l'appareil de Golgi par la Bréfeldine A (BFA) provoque une accumulation de sFlt1 dans des HUVECs générant une quantité accrue de sFlt1-v5 marqué (Figure 144). Les blocages de Arf1, Arf6 (protéines de la sous-famille ADP-Ribosylation Factor (ARF), appartenant à la famille des Petites Protéines G) et Rab11 (également de la famille des Petites Protéines G), responsables du trafic vésiculaire, induisent un effet similaire : Arf1 est nécessaire au transport de sFlt1 du RE au Golgi, alors que Rab11 permet son transport du Golgi à la membrane plasmique, et Arf6 son exocytose (Jung et al., 2012).



**Figure 14 : Accumulation de sFlt1 dans la cellule endothéliale**  
 A. après inhibition du transport protéiques du RE au Golgi par la BFA ; B. après inhibition de Arf1, Arf6, Rab11. D'après (Jung et al., 2012)

### 3.2.2. Actions du sFlt1

Le sFlt1 présente la capacité de se lier au VEGF 165 et au Placental Growth Factor-2, ce qui a été prouvé par des tests ELISA (Hornig et al., 1999, 2000).

En outre, comme son homologue membranaire, le sFlt1 est capable de se lier au VEGFR2. Cette fixation est possible en l'absence de VEGF, mais elle est augmentée en présence de ce dernier, dont la dimérisation est probablement favorable à la formation d'un tel complexe. Kendall et al ont mis en évidence des complexes formés d'une molécule de sFlt1 liée à un monomère ou un homodimère de VEGF, et deux molécules de sFlt1 complexées à

un homodimère de VEGF. L'affinité entre les deux molécules a été évaluée à 20pM (Kendall and Thomas, 1993 ; Kendall et al., 1996).

Lorsque le sFlt1 et le VEGF sont mis en compétition, on observe une réduction de la prolifération et de la migration des CE : le sFlt1 est donc capable de bloquer les effets du facteur de croissance. Il bloque également l'effet chimio-attractant du VEGF sur les cellules de lignées monocytaires THP-1 (Barleon et al., 2001 ; Zhu et al., 2011).

Si le sFlt1 agit comme un frein à l'angiogenèse, il n'en est pas moins nécessaire à son bon déroulement. Ainsi, il est exprimé même pendant les phases de développement des vaisseaux, pendant lesquelles les proportions relatives du soluble et du membranaire sont conservées. D'autre part, le sFlt1 est indispensable à une morphogenèse normale de vaisseaux (Kappas et al., 2008).

Dans le rein, le sFlt1 est garant du maintien de la filtration glomérulaire : une surexpression de VEGF provoque une dégradation de la fonction rénale, via un épaissement de la membrane basale, une perte de la fenestration de l'endothélium, et un effacement des podocytes (Qiu et al., 2010 ; Veron et al., 2010).

Le sFlt1 permet également de maintenir une barrière anti-angiogénique quand c'est nécessaire. Ainsi, il est présent en quantités élevées au niveau de la cornée, où il prévient toute angiogenèse induite par le VEGF (Ambati et al., 2007).

Nous avons souligné que le sFlt1 est sécrété également par les péricytes ; il se fixe ensuite sur des rafts lipidiques présents en surface de ces cellules et induit le remodelage de leur cytosquelette. Ainsi, il favorise la couverture des vaisseaux néoformés par les cellules périvasculaires, laquelle réduit la croissance des vaisseaux (Jin et al., 2012).

### 3.2.3. Régulation du sFlt1

#### 3.2.3.1. Régulation par le VEGF et le PlGF

Tout comme le VEGFR1 membranaire, la sécrétion du sFlt1 par les CE est stimulée par le VEGF. Il s'agit là d'une synthèse *de novo*, ce qui exclut (au moins en partie) la libération par clivage du récepteur. Cette stimulation est médiée par l'activation de la PI3K, ce qui indique un effet induit par la fixation du VEGF sur le VEGFR2 (Ahmad et al., 2011 ; Barleon et al., 1997). Ces résultats ont cependant été obtenus dans des HUVECS.

En revanche, Rahimi et al. montrent que dans les lignées cellulaires de lymphome, le PlGF et le VEGF augmentent la sécrétion de sFlt1 sans augmenter le nombre de transcrits, et diminuent l'expression du récepteur en surface : ils stimulent donc le clivage de l'ectodomaine. En revanche, ce mécanisme n'est pas observé dans les HUVECS (Rahimi et al., 2009). Ceci met donc en lumière des mécanismes différents selon les types cellulaires.

Enfin, d'autres facteurs de croissance, tels que le bFGF, augmentent la libération de sFlt1 (Hornig et al., 2000).

#### 3.2.3.2. Régulation par l'hypoxie

Comme le VEGF, le sFlt1 est régulé par la disponibilité de l'oxygène : ainsi, l'hypoxie induit une diminution de la sécrétion de sFlt1 dans les CE microvasculaires. L'épissage alternatif semble être le seul mécanisme impliqué ; le niveau d'ARNm du récepteur soluble est en effet le seul régulé, tandis que les niveaux d'ARNm et de protéines du récepteur membranaire ne le sont pas (Ikeda et al., 2011).

S'il peut sembler paradoxal que le VEGF, dont la synthèse est stimulée dans les cellules hypoxiques, n'induit pas en retour une augmentation du sFlt1 et du VEGFR1, Ikeda et al ont démontré que les quantités de VEGF sécrétées sont trop faibles pour entraîner une telle augmentation, (25pg/ml à 31pg/ml pour une teneur en oxygène de 2.5% et 1%, respectivement), alors que des concentrations de VEGF d'environ 100ng/ml sont nécessaires à cet effet stimulant sur la sécrétion de sFlt1 (Ikeda et al., 2011).

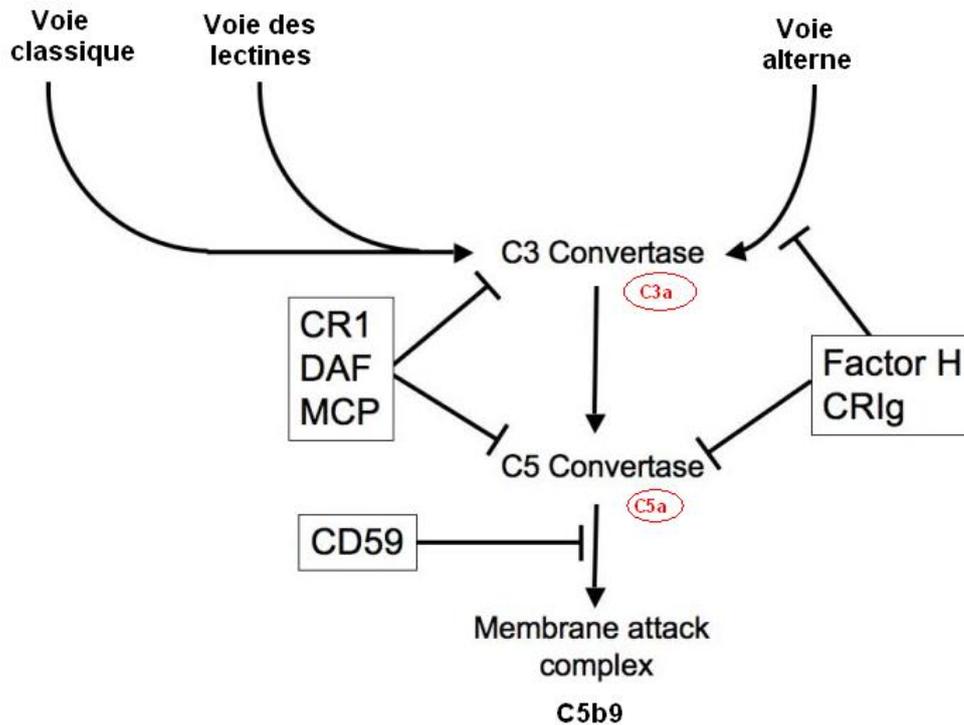
En revanche, ce n'est pas l'induction de HIF par l'hypoxie qui est responsable de l'inhibition de la synthèse de sFlt1, comme le démontre l'utilisation d'un inhibiteur du facteur de stabilisation de HIF, le HIF-PHD (Proxyl Hydroxylase). Les mécanismes en causes dans cette induction restent donc méconnus (Ikeda et al., 2011).

Dans les monocytes et les macrophages stimulés par le GM-CSF, l'hypoxie induit la sécrétion de sFlt1, ainsi que l'expression du VEGFR1 à la surface des monocytes. L'utilisation de siRNA spécifiques de HIF-2a et de souris déficientes en HIF-1a montre que la sécrétion de sFlt1 par les macrophages est indépendante de HIF-1a mais dépendante de HIF-2a (Eubank et al., 2011 ; Gao et al., 2002).

Par ailleurs, dans le cytotrophoblaste, le récepteur membranaire et son variant soluble sont tous deux up-régulés par l'hypoxie, et cette augmentation est quantitativement plus importante pour le second. Ceci peut expliquer la forte production de sFlt1 par le placenta dans un contexte d'hypoxie (Thomas et al., 2009).

### **3.2.3.3. Régulation par le système du complément**

Le complément est également impliqué dans la sécrétion du sFlt1. Ce système, qui consiste en une cascade d'activation d'éléments conduisant à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) C5b9 qui lyse les cellules cibles, produit en parallèle les anaphylatoxines C5a et C3a. Plusieurs inhibiteurs peuvent bloquer le processus à différentes étapes : le CD59 notamment empêche la formation du MAC (Figure 15).



**Figure 15 : Le système du complément**  
D'après (Thurman & Renner 2011)

L'activation du C5aR par le C5a conduit à une augmentation de la sécrétion du sFlt1 par le placenta, notamment en conditions pathologiques (Wang et al., 2012). Le C5a n'agit pas directement sur les CE, mais il stimule la sécrétion de sFlt1 par les macrophages. Cet effet sur le sFlt1 n'est pas observé avec le C3a (Langer et al., 2010).

#### 3.2.3.4. Régulation par le LPS

Dans les monocytes et les macrophages, la sécrétion du sFlt1 peut être stimulée par le lipopolysaccharide (LPS), et pour les macrophages au moins, la voie impliquée est celle de la PKC (Park et al., 2010). Or, la PKC est impliquée dans le clivage de l'ectodomaine du VEGFR1 (Rahimi et al., 2009). On peut donc raisonnablement penser que le clivage du récepteur membranaire est un des mécanismes impliqués dans cette régulation.

### **3.2.3.1. Régulation par la Jumonji domain-containing protein 6**

Certains facteurs de régulation de l'épissage alternatif du VEGFR1, ont également été identifiés. La Jumonji domain-containing protein 6 (Jmjd6) appartient à une famille d'enzymes contenant un domaine JmjC, et responsables de modifications épigénétiques telles que la déméthylation des histones. Il a été démontré que Jmjd6 est essentielle au développement de structures vasculaires par les CE. En effet, elle est impliquée dans l'épissage alternatif de sFlt1, via l'activation du facteur d'épissage U2AF65 : la réduction ou l'inhibition de Jmjd6 augmente la libération de sFlt1 (Boeckel et al., 2011)

Il est intéressant de noter que plusieurs membres de cette famille de protéine, dont Jmjd1 et Jmjd2, sont régulés en particulier par HIF, et que la synthèse de Jmjd6 elle-même est augmentée dans la CE en réponse à l'hypoxie, elle-même un important facteur de régulation du sFlt1 (Boeckel et al., 2011 ; Pollard et al., 2008).

### **3.2.3.1. Régulation de l'action du sFlt1 par les métalloprotéases**

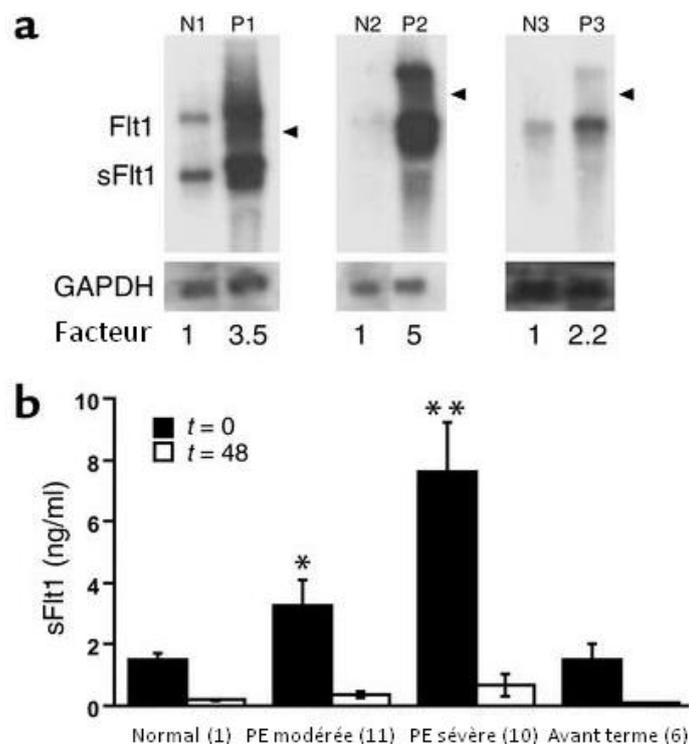
Les métalloprotéases sont impliquées dans la formation du sFlt1, mais elles régulent également son activité en exerçant une activité protéolytique contre lui. Certaines d'entre elles, les MMP-2 et -7 et dans une moindre mesure la MMP-9, libèrent le VEGF captif en dégradant le sFlt1 en plusieurs fragments instables de 12 à 45kDa. Le VEGF ainsi libéré est fonctionnel et peut agir sur la CE (Ito et al., 2009).

## 4. sFlt1 et VEGF en conditions pathologiques

### 4.1. sFlt1 et pré-éclampsie

Le sFlt1 est sécrété en grande quantité par le placenta dans des conditions physiologiques. Néanmoins, sa sécrétion est accrue lors de la pré-éclampsie, une complication de la grossesse qui associe hypertension et protéinurie. La pré-éclampsie s'accompagne en effet de l'augmentation du ration sFlt1/PlGF, ainsi que de l'augmentation d'un autre facteur anti-angiogénique, l'endogline (Levine et al., 2006).

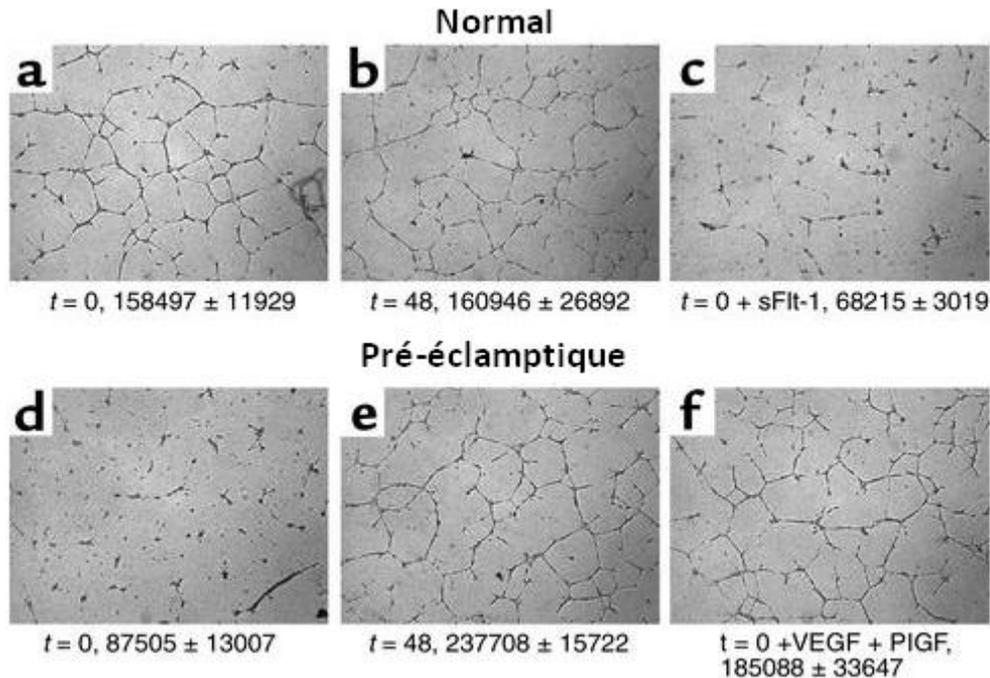
Dans une étude de Maynard et al., on observe une très forte augmentation du sFlt1, au niveau de l'ARNm et de la protéine, chez des patientes présentant une pré-éclampsie sévère (P1 et P2) ; le niveau de sFlt1 mesuré chez une patiente avec une pré-éclampsie modérée (P3) est plus réduit, quoique supérieur à celui mesuré au cours d'une grossesse normale. Le taux de sFlt1 diminue fortement après la délivrance (Maynard et al., 2003) (Figure 16).



**Figure 16 : Taux de sFlt1 dans la pré-éclampsie**

Quantification de l'ARNm (a) et de la protéine (b) pour trois témoins sains (N1, N2, N3) et trois patientes en pré-éclampsie (P1, P2, P3) ; et pour des patientes avant terme et 48h après délivrance. D'après (Maynard et al., 2003)

L'augmentation de la sécrétion de sFlt1 au cours de la pré-éclampsie s'accompagne au niveau du rein d'une souffrance endothéliale : œdème et détachement de la membrane basale entraînant une occlusion des capillaires glomérulaires. Il s'y associe également des dépôts de fibrine dans les capillaires glomérulaires et une altération de la structure des podocytes. *In vitro*, un modèle d'angiogenèse basé sur le développement de tubes endothéliaux sur du Matrigel met en évidence les effets anti-angiogéniques du sérum de patiente pré-éclamptique, mais aussi du sFlt1 lui-même (Maynard et al., 2003) (Figure 17).



**Figure 17 : Effets anti-angiogéniques du sFlt1 dans la pré-éclampsie**

(a) sérum de témoin à terme, sans pré-éclampsie. (b) sérum de témoin 48h après délivrance, sans pré-éclampsie. (c) t = 0 plus sFlt1 exogène (10 ng/ml). (d) sérum de patiente pré-éclamptique avant délivrance. (e) sérum de patiente pré-éclamptique 48h après délivrance. (f) t = 0 plus VEGF exogène (10 ng/ml) et PlGF (10 ng/ml). D'après (Maynard et al., 2003).

La nature exacte du ou des mécanisme(s) induisant cette augmentation de la sécrétion de sFlt1 au cours de la pré-éclampsie reste mal connue : sont principalement impliqués l'hypoxie et/ou le stress oxydatif. Le TNF- $\alpha$ , quoique surexprimé dans la pré-éclampsie en réponse à l'hypoxie, n'est pas nécessaire à l'augmentation de la sécrétion de sFlt1 (Murphy et al., 2013 ; Redman and Sargent, 2000). Le système du complément est également activé au cours de la pré-éclampsie, et son activation induit une sécrétion de sFlt1. L'activation du C3aR est associée chez la souris en gestation à de l'hypertension et de la protéinurie, ainsi

qu'à des dépôts de C3. Le blocage de ce récepteur induit une augmentation de l'angiogenèse, et une forte réduction de la libération de sFlt1 *in vivo* et *in vitro* (Wang et al., 2012). Dans un modèle murin de perte fœtale, le C5a provoque une hausse du sFlt1, un dépôt de C3 dans le tissu décidual et une infiltration de cellules inflammatoires. L'activation conduit à l'interruption de la gestation (Girardi et al., 2006).

## 4.2. Quand le VEGF est néfaste

Le VEGF peut présenter des effets délétères dans certains contextes.

En effet, certaines études suggèrent des effets anti-inflammatoires du VEGFR1 et de son variant soluble, et à l'inverse des effets pro-inflammatoires du VEGF. Ainsi, le sFlt1 réduit la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  induite par le LPS. Le VEGF, quant à lui, les augmente de façon dose dépendante (Tsao et al., 2007).

Les effets pro-inflammatoires du VEGF sont aussi observés dans le cadre de l'allogreffe. Au niveau du greffon, le VEGF stimule la production par les CE de chimio-attractants pour les monocytes et les lymphocytes T, ainsi que l'expression par ces mêmes cellules des molécules d'adhésion, favorisant ainsi l'infiltration des leucocytes. Le rejet de greffe s'accompagne d'un fort taux de VEGF, et ce dernier y participe donc, mais il ne provoque pas lui-même l'activation des lymphocytes (Reinders et al., 2003).

L'impact du VEGF sur l'inflammation est cependant très variable selon le type de pathologie observé : ainsi, le VEGFR1 est responsable de l'aggravation de certains troubles, tels que l'arthrite rhumatoïde. Il contribue à la stimulation des monocytes et macrophages et à l'induction des cytokines pro-inflammatoires et aggrave ainsi la progression de l'arthrite. Le VEGFR1 active en outre la prolifération et la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Murakami et al., 2006).

### **4.3. sFlt1 et maladies rénales**

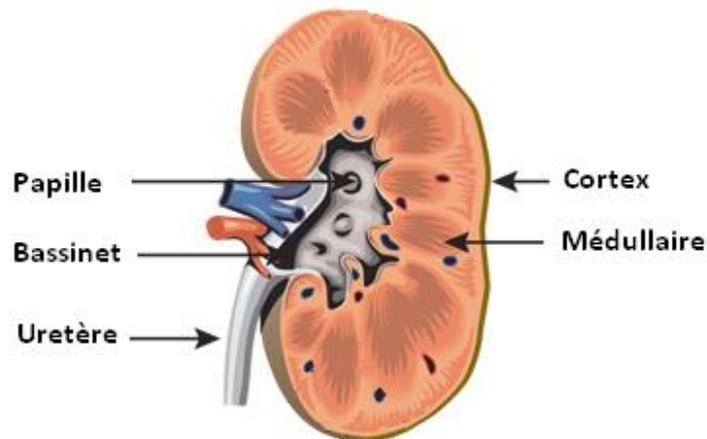
#### **4.3.1. Structure et fonction du rein**

La fonction première du rein est la filtration du sang et la formation de l'urine, mais il intervient également dans le maintien de l'homéostasie, et assure une fonction endocrine (contrôle de l'érythropoïèse et système rénine-angiotensine).

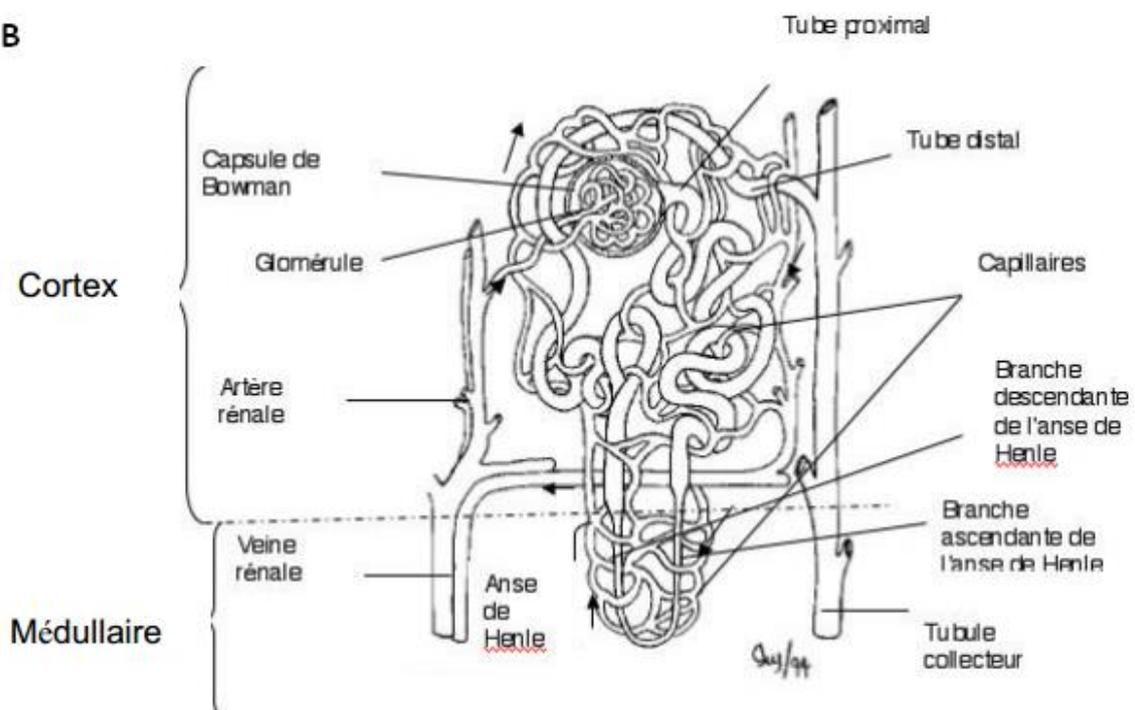
Le rein est divisé en une dizaine de lobes rénaux. La zone la plus externe du rein est le cortex ; il recouvre la médullaire, dans laquelle on trouve les pyramides de Malpighi, chacune d'entre elles définissant un lobe rénal. Les pyramides, dont la pointe est nommée papille, débouchent sur les calices, lesquelles se rejoignent au niveau du bassinet. Enfin, le bassinet est suivi par l'uretère (Figure 18).

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein : il y en a environ un million par rein, situés à la fois dans le cortex et dans la médullaire. Le néphron est constitué par le tubule, divisé en quatre parties (le tube contourné proximal, l'anse de Henle, le tube contourné distal et le tube collecteur), et par le corpuscule rénal qui comprend le glomérule et la capsule de Bowman (Figure 18) (Nguyen, 2009). Au niveau de chaque glomérule, des capillaires fenêtrés forment une vingtaine d'anses qui assurent la filtration grâce à une barrière formée de l'endothélium, de la lame basale et des fentes de filtration.

A



B



**Figure 18 : Structure du rein.**

(A) Le rein est composé du cortex, de la médullaire et du bassinnet, qui débouche sur l'uretère. Les néphrons sont situés dans le cortex et la médullaire. D'après (Bonventre et al., 2010) (B) Chaque néphron comprend un tubule et un corpuscule rénal. Le glomérule et la capsule de Bowman constituent le corpuscule rénal. D'après (Nguyen, 2009).

### 4.3.2. La balance VEGF/sFlt1 dans le rein

Le VEGF est essentiel au bon fonctionnement du rein. L'administration d'anticorps neutralisants anti-VEGF ou de sFlt1 entraîne au niveau du glomérule une perturbation de la membrane de filtration glomérulaire. Les CE deviennent hypertrophiées, altérées, et se détachent de la membrane basale glomérulaire. Le sFlt1 induit de cette façon et à très court terme une augmentation de la protéinurie (Sugimoto et al., 2003).

Nous avons souligné le rôle du sFlt1 dans le remodelage du cytosquelette des péricytes. Or, les podocytes, péricytes spécialisés des glomérules, expriment le VEGFR1 et sa version soluble. Le sFlt1 semble agir de façon autocrine pour réguler la formation des pédicelles. Un déficit en sFlt1 conduit par ailleurs à la formation de vaisseaux anormaux au niveau du glomérule. Le sFlt1 permet donc de contrôler l'angiogenèse dans le rein (Jin et al., 2012).

Un déficit en VEGF, en induisant l'augmentation des molécules d'adhésion et la diminution de la vasodilatation que cela induit, augmente le contact entre l'endothélium et les leucocytes et leur migration transendothéliale. Or VCAM-1, et son ligand leucocytaire Very Late Antigen-4 (VLA-4), sont impliqués dans l'apparition de croissants glomérulaires (accumulation extra-capillaire de cellules) et provoquent protéinurie et nécrose. En revanche, il est intéressant de noter que le sFlt1 seul ne provoque par l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, alors que d'autres facteurs anti-angiogéniques, comme l'endogline soluble, le font (Allen et al., 1999 ; Walshe et al., 2009).

Cependant, le sFlt1 favorise l'activation de l'endothélium par les cytokines pro-inflammatoires. Cela se traduit par une augmentation accrue de l'adhésion des leucocytes et de l'expression de VCAM-1, ICAM-1, ET-1 et vWF, en présence de TNF- $\alpha$ . Cet effet passe effectivement par le blocage du VEGF et l'absence de signalisation de ses récepteurs (et notamment de la voie PI3K/Akt), comme en témoigne les effets similaires d'anticorps neutralisant les VEGFR1 et 2.

Or dans le rein, un déficit de VEGF entraîne l'invasion de l'espace glomérulaire par les macrophages. Elle est par ailleurs associée à l'apparition de fibrose. Ces éléments induisent une dégradation de la fonction rénale et une protéinurie. Le déficit de VEGF est également lié, comme on peut s'y attendre, à un nombre de capillaires intrarénaux réduit (Cindrova-Davies et al., 2011 ; Kang et al., 2001).

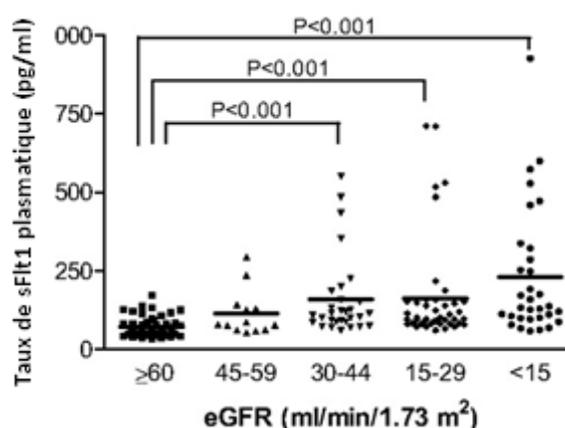
Ces études mettent en évidence l'importance de la balance sFlt1/VEGF, notamment dans le rein.

L'impact des anti-angiogéniques sur la fonction rénale souligne cette importance. Ainsi, des patients traités au bevacizumab, un antagoniste du VEGF, développent une microangiopathie thrombotique. Un modèle murin permet de déterminer que le blocage de la production de VEGF par les podocytes provoque des lésions au niveau du glomérule et donc une augmentation de la protéinurie, mais également de l'hypertension (Eremina et al., 2008).

#### 4.3.3. Le sFlt1 dans l'insuffisance rénale chronique (IRC)

Les maladies rénales chroniques induisent une perte progressive de la fonction rénale, conduisant à l'insuffisance rénale au stade terminal, qui doit être traitée par la dialyse ou la transplantation rénale.

Une étude menée par Di Marco et al., portant sur 130 patients, a entrepris de mettre en évidence le rôle du sFlt1 dans l'insuffisance rénale chronique. Les patients ont été catégorisés en fonction de leur débit de filtration glomérulaire estimé (eGFR), et leur taux de sFlt1 a été mesuré : il existe un lien entre la filtration glomérulaire réduite et un taux de sFlt1 élevé (Figure 19). Le taux de sFlt1 est également corrélé à la protéinurie, et à la libération de marqueurs solubles de la dysfonction endothéliale (Di Marco et al., 2009).

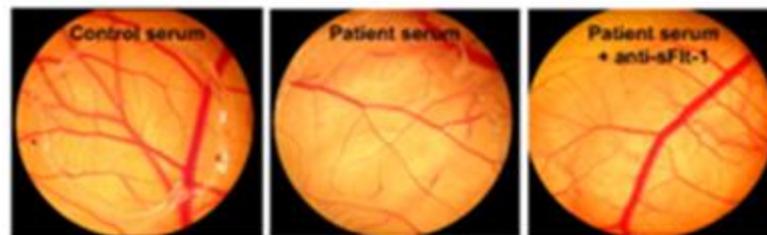


**Figure 19 : débit de filtration glomérulaire et taux plasmatique de sFlt1**  
La diminution du débit de filtration glomérulaire s'accompagne d'une augmentation du taux de sFlt1. D'après (Di Marco et al., 2009)

Le sFlt1 est également lié aux risques d'accident cardiovasculaire, les patients avec un fort taux de sFlt1 étant plus susceptibles de connaître des événements cardiovasculaires.

Le rôle du sFlt1 dans l'induction d'un état anti-angiogénique a été mesuré grâce au modèle CAM. Les sérums de patients en insuffisance rénale chronique induisent une diminution du nombre de vaisseaux formés ; de plus l'angiogenèse est rétablie par l'ajout d'un anticorps anti-sFlt1, ce qui confirme son implication dans l'activité anti-angiogénique des sérums (Figure 20).

Le sérum des patients induit également, dans des CE en culture, la diminution de la présence intracellulaire d'Oxyde Nitrique (NO), responsable de la vasodilatation endothélium-dépendante (Di Marco et al., 2009).



**Figure 20 : Induction d'un état anti-angiogénique par le sFlt1**

*Le sérum de patients réduit le nombre de vaisseaux formés dans un modèle de CAM. Le blocage du sFlt1 avec un anti-sFlt1 rétablit l'angiogenèse. D'après (Di Marco et al., 2009)*

Enfin, Di Marco et al. ont constaté que la sécrétion du sFlt1 par des monocytes des patients en IRC est supérieure à celle des monocytes de témoins sains (45pg/ml et 18pg/ml respectivement) (Di Marco et al., 2009).

Néanmoins, d'autres études apportent un éclairage différent sur l'impact du sFlt1 dans les maladies rénales chroniques. Ainsi, Onoue et al. observent une diminution du taux de sFlt1 de lorsque l'eGFR diminue. De plus, la réduction du taux de sFlt1, en augmentant le ratio PlGF/sFlt1, aggrave l'athérosclérose favorisée par le PlGF, lequel stimule l'angiogenèse et favorise l'infiltration des monocytes et macrophages (Onoue et al., 2009).

Ces travaux mettent donc en évidence le rôle du sFlt1 dans les maladies rénales chroniques. Notre équipe s'est intéressée à son implication dans des maladies aiguës, et plus précisément dans les vascularites causées par les anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA).

#### 4.3.4. sFlt1 et vascularites à ANCA

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication en 2012 dans le *Journal of the American Society of Nephrology* (cf. Annexe).

Les vascularites associées aux anticorps anti-cytoplasme des polynucléaires neutrophiles (ANCA) sont un trouble caractérisé par la nécrose inflammatoire des petits vaisseaux capillaires, notamment dans le rein. Les ANCAs sont de deux types principaux, les uns dirigés contre la protéinase 3 (PR3), les autres contre la myéloperoxydase (MPO), deux enzymes présentes dans les neutrophiles mais également les monocytes.

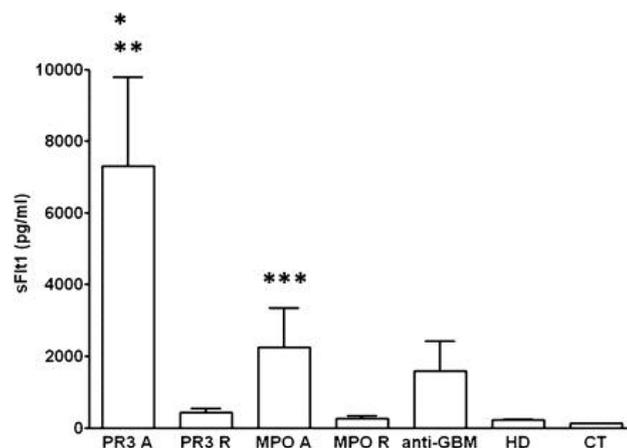
Les vascularites associées aux ANCA (AAV) sont caractérisées par des lésions endothéliales, comme le montrent plusieurs études menées sur des modèles animaux (Guilpain et al., 2007 ; Xiao et al., 2002). Les patients en phase aiguë (par opposition aux phases de rémission) présentent un taux élevé de CE circulantes avec des marqueurs de mort cellulaire (annexine, iodure de propidium) et un phénotype « pro-coagulant » (expression du facteur tissulaire) (Woywodt et al., 2003).

Sous l'action des ANCAs, les neutrophiles induisent les lésions endothéliales via la production notamment de radicaux libres. Par ailleurs, des études indiquent que l'activation du complément est également cruciale pour l'induction de ces lésions endothéliales au cours des AAV (Van Timmeren et al., 2009).

D'autre part, les neutrophiles, stimulés par le TNF- $\alpha$  et les ANCAs, activent le système du complément, ce qui conduit à une production de C5a. De plus, cette anaphylatoxine elle-même induit une augmentation de l'expression membranaire de la PR3 par les neutrophiles, via le C5aR, créant ainsi une boucle d'amplification (Schreiber et al., 2009).

Étant donné l'importance de la réparation endothéliale au cours des vascularites associées aux ANCA et l'implication du complément dans l'apparition de ces vascularites d'une part, et dans la sécrétion du sFlt1 d'autre part, notre équipe, associée au Centre de Néphrologie de l'University College London, a étudié le rôle du sFlt1 dans les vascularites associées aux ANCA.

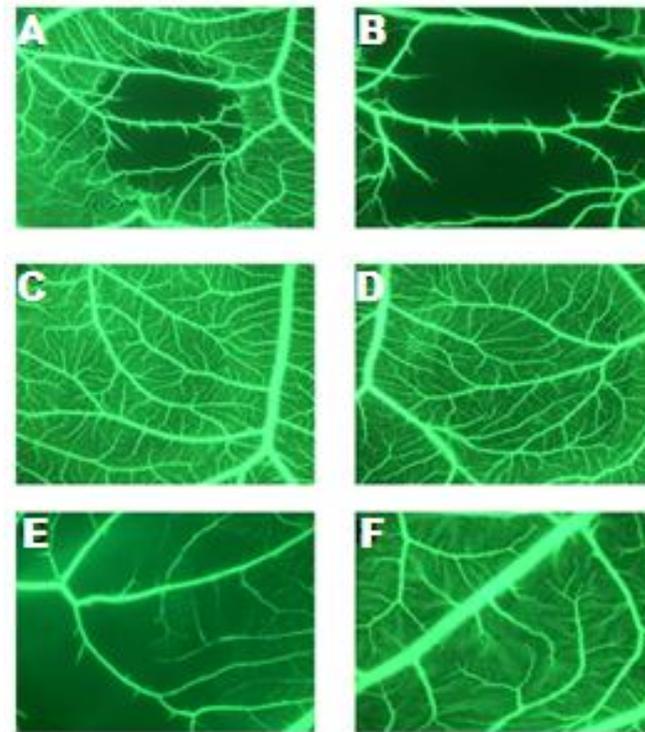
Le taux de sFlt1 a été mesuré dans le plasma de patients en phases aiguës et en rémission de vascularites associées aux anti-PR3 et aux anti-MPO. Notre équipe a ainsi montré que le taux de sFlt1 est élevé dans les phases aiguës des vascularites associées aux ANCA, et tout particulièrement dans les patients atteints de vascularites associées aux anti-PR3 (Figure 21). Le taux de C5a est également élevé chez les patients en phase aiguë pour les anti-PR3 (290% des contrôles) et les anti-MPO (180% des contrôles). Il est intéressant de noter que ces taux sont corrélés aux taux de sFlt1. Enfin, l'élévation de sFlt1 est aussi corrélée à la protéinurie (Le Roux et al., 2012).



**Figure 21 : Taux de sFlt1 dans les AAV**

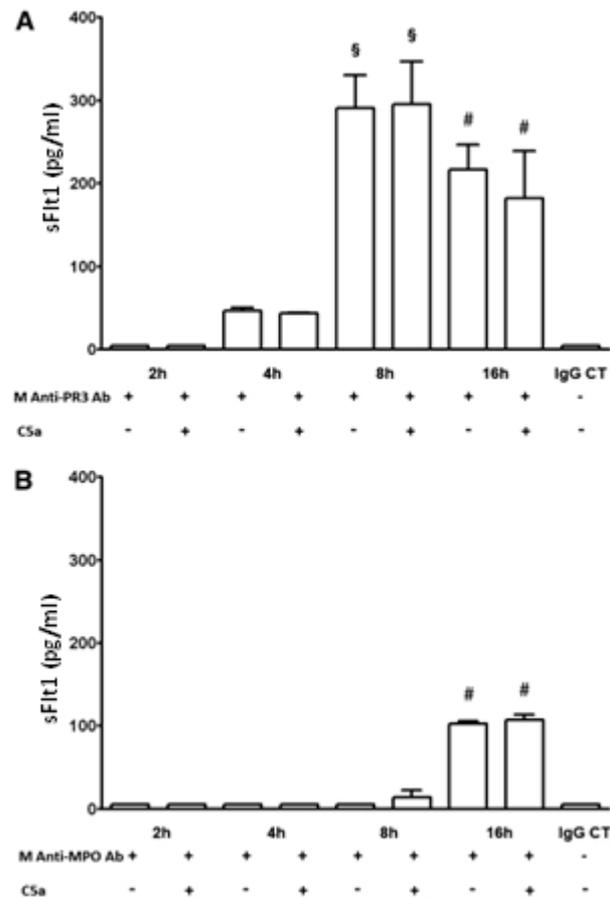
Quantification du sFlt1 dans le sérum des patients en phase aiguë (A), en rémission (R), de témoins sains (CT), de patients avec anticorps anti-membrane basale glomérulaire (GBM), et de patients sous hémodialyse. \* $P < 0.0001$  pour PR3 A vs CT, \*\* $P < 0.001$  pour PR3 A vs PR3 R, MPO R, et HD. \*\*\* $P < 0.001$  pour MPO A vs CT. D'après (Le Roux et al., 2012).

D'autre part nous avons montré, à l'aide d'un test d'angiogenèse sur la membrane chorio-allantoïde de poulet, les effets anti-angiogéniques des sérums de patients présentant une vascularite associée aux ANCA en phase aiguë. Or, une pré-incubation de ces sérums pendant 2h avec du VEGF annule ces effets et préserve la microcirculation dans ce modèle, ce qui suggère que ces effets sont dus à un antagoniste du VEGF, vraisemblablement le sFlt1 (Figure 22).



**Figure 22 : Impact sur l'angiogenèse des sérums de patients atteints de AAV**  
 (A) sérum de patient atteint de vascularites à ANCA de type anti-PR3, grossissement  $\times 31.25$  ; (B) grossissement  $\times 34$  ; (C) PBS ; (D) sérum de patient sain ; sérum de patient anti-PR3 sans (E) et avec (F) VEGF (0.5ng/ml). D'après (Le Roux et al., 2012)

Nous avons ensuite montré in vitro que la sécrétion de sFlt-1 par les monocytes, une des principales sources de sFlt-1 in vivo, était induite par des anticorps anti-PR3 et anti-MPO (dans une moindre mesure), ainsi que par les sérums de patients AAV anti-PR3+ en phase aiguë, mais qu'elle n'était pas accrue par le C5a (Figure 23). De plus, de manière surprenante, aucun de ces facteurs n'a eu d'effet sur la sécrétion de sFlt-1 par les HUVECS, autre source principale de sFlt-1 in vivo.



**Figure 23 : Effet des ANCA sur la sécrétion de sFlt1 par les monocytes**  
 (A) anticorps monoclonal anti-PR3 ; (B) anticorps monoclonal anti-MPO. D'après (Le Roux et al., 2012).

Ces données montrent donc une augmentation du taux de sFlt1 chez des patients AAV en phase aiguë, responsable d'un état anti-angiogénique néfaste et à même d'expliquer les dommages subis par les microvaisseaux rénaux. Enfin, ces données montrent également que le sFlt1 constitue un marqueur potentiel de l'évolution des vascularites à ANCA anti-PR3 (Le Roux et al., 2012).

## OBJECTIFS

---

Nous avons vu précédemment que les maladies rénales chroniques sont caractérisées par un excès de sFlt1 circulant d'origine monocyttaire, excès proportionnel au degré d'insuffisance rénale, corrélé aux taux plasmatiques de marqueurs connus de dysfonction endothéliale, et participant ainsi aux complications cardiovasculaires fréquemment rencontrées chez ces patients. De plus, nous avons également montré un effet anti-angiogénique du sFlt1 dans une autre maladie rénale, l'AAV.

Dans le premier projet réalisé au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle du sFlt1 dans les maladies rénales chroniques, et en particulier dans le traitement par hémodialyse de l'insuffisance rénale au stade terminal.

Pour répondre à cette question, nous avons dans un premier temps évalué l'impact de l'hémodialyse sur le taux de sFlt1 chez les patients dialysés. Ces derniers présentent une morbidité et une mortalité cardiovasculaire élevées, il est important de déterminer si le matériel de dialyse et/ou les techniques employées induisent une augmentation de la sécrétion de sFlt1, un facteur anti-angiogénique impliqué dans la survenue des complications cardiovasculaires des patients dialysés.

Puis, nous avons cherché à identifier les sources du sFlt1 chez les patients dialysés ainsi que les modes de sécrétion. Enfin, nous avons tenté de déterminer *in vitro* l'effet anti-angiogénique du sFlt1 contenu dans le sérum des patients dialysés.

Dans un deuxième projet, nous nous sommes intéressés à l'impact du sFlt1 dans la transplantation rénale. Nous avons dans un premier temps analysé les taux de sFlt1 présents dans les plasmas de patients greffés. Puis, comme pour l'étude sur la dialyse, nous avons cherché à identifier les sources du sFlt1 chez les patients greffés et enfin, nous avons évalué *in vitro* l'effet du sFlt1 contenu dans le sérum des patients greffés sur le retard de reprise de fonction du greffon (DGF) ainsi que sur l'angiogénèse.

Dans un troisième projet, nous nous sommes intéressés au système du VEGF/sFlt1 dans la CE glomérulaire rénale. En effet, si le rôle et les mécanismes de régulation du sFlt1 sont le plus souvent étudiés dans les HUVECs, qui le synthétisent en grande quantité, aucune étude n'a cherché à élucider ses particularités dans la CE rénale. Or, le rein est souvent la cible de dommages importants dans le cadre de pathologies telles que celles que nous avons décrites précédemment, ce qui pourrait suggérer une sensibilité particulière du rein et des CE glomérulaires au sFlt1 et à son impact anti-angiogénique.

Nous avons donc entrepris de décrire les différents acteurs du système du VEGF et du sFlt1 des CE glomérulaires rénales (HRGECS), en comparaison à un autre type d'EC, les CE microvasculaires dermiques (HDMEC).

Ces axes d'étude visent donc à dresser un tableau des mécanismes liés au sFlt1, dans le cadre de maladies rénales.

# MATERIEL ET METHODES<sup>1</sup>

---

## – Prélèvement de sérums de patients dialysés et greffés et de témoins sains

Les sérums de patients dialysés ont été prélevés avant le début de la séance de dialyse (T0) puis après 30 minutes de dialyse (T30) (Meffray et al., soumis). Les patients ont été sélectionnés aléatoirement parmi ceux de la cohorte étudiée par Meffray et al.

Les sérums de patients greffés ont été prélevés avant la greffe (J0) puis 3 et 7 jours (J3 et J7) après la greffe (Chapal et al., 2013). Les patients ont été sélectionnés aléatoirement parmi ceux de la cohorte étudiée par Chapal et al.. 33% des patients sélectionnés présentaient un délai de reprise de fonction du greffon (3dialyses post-greffe en moyenne) ; 83% étaient sous hémodialyse avant transplantation et 17% sous dialyse péritonéale ; pour 33%, il s'agissait de la première greffe rénale, et pour 66% de la seconde.

Les sérums contrôles ont été prélevés sur des témoins sains sélectionnés aléatoirement au sein du personnel de l'établissement (INSERM U1064, CHU de Nantes).

Les sérums ont été congelés à -80°C pour une utilisation extemporanée.

## – Isolement des monocytes de patients dialysés

Les monocytes de patients dialysés ont été isolés, à partir de prélèvements sanguins réalisés à T0, 1h et 2h de dialyse, à l'aide d'un kit de séparation Whole Blood CD14 MicroBeads (Miltenyi, Paris, France).

## – Isolement des microparticules

---

<sup>1</sup> Les informations détaillées dans cette section portent sur les résultats obtenus en sus de ceux présentés dans les articles soumis et sous presse. Les articles comprennent la présentation des matériels et méthodes les concernant.

Pour isoler les microparticules, 250µl de plasma prélevé en tubes citratés ont subi (immédiatement après prélèvement) une première centrifugation de 30 minutes à 18900G et à 20°C, à l'issue de laquelle les surnageants ont été prélevés et les culots repris dans 225µl de PBS citrate ; une deuxième centrifugation identique a alors été effectuée, et culots et surnageants ont été congelés à -80°C pour utilisation ultérieure.

#### – **Étude de l'effet anti-angiogénique des sérums de patients sur les CE**

L'effet anti-angiogénique des sérums de témoins sains et de patients dialysés ou greffés a été évalué sur des CE de la veine de cordon ombilical humain (HUVECs) (Lonza, Basel, Suisse), cultivées à 37°C, 5% Co<sub>2</sub>, en milieu Endothelial Cell Basal Medium (ECBM) (PromoCell, Heidelberg, Allemagne). 10% de sérum a été ajouté au milieu de culture pendant 24h (pour l'étude de la prolifération) ou 48h (pour l'étude de l'apoptose).

Les tests d'inhibition des effets des sérums sur l'angiogenèse ont été effectués avec du VEGF165 recombinant humain (PreproTech, Rocky Hill, USA) : les cellules ont été pré-incubées avec 50 à 100ng/ml de VEGF pendant 1h avant l'ajout du sérum.

#### – **Étude du système du VEGF dans la CE**

Deux types de CE ont été employées : des Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMEC), et des Human Renal Glomerular Endothelial Cells (HRGEC) (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, USA).

Elles ont été cultivées dans de l'Endothelial Cell Medium (ECM) (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, USA), contenant 1% d'Endothelial Cell Growth Supplément (ECGS) et 1% de solution Peniciline/Streptomycine, et supplémentées avec 5% de Sérum de Veau Foetal (SVF). L'ECGS contient lui-même des suppléments pour une concentration finale dans le milieu de 10µg/ml de BSA, 10µg/ml d'apo-transferrine, 5µg/ml d'insuline, 10ng/ml d'EGF, 2ng/ml de FGF-2, 2ng/ml de VEGF, 2ng/ml d'IGF-I, 1µg/ml d'hydrocortisone et 10<sup>-7</sup>M. d'acide rétinoïque.

Les cellules ont été récupérées à l'aide de trypsine-EDTA 0.05% et marquées pour la cytométrie en flux.

### – Quantification du sFlt1 et du VEGF par ELISA

La quantification du sFlt1 et du VEGF a été réalisée à l'aide des kits ELISA Quantikine Human sVEGFR1 et Quantikine Human VEGF (R&D Systems, Minneapolis, USA) selon les recommandations du fournisseur. Le sFlt1 et le VEGF présents dans le surnageant des cellules endothéliales a été dosé après centrifugation du surnageant afin d'éliminer les débris cellulaires. Le surnageant pour le dosage du sFlt1 a été prélevé à confluence

### – Analyse par cytométrie en flux des CE, monocytes et microparticules

L'induction de l'apoptose par les sérums sur les HUVECs a été évaluée en quantifiant l'expression membranaire des phosphatidylsérines par de l'Annexine V couplée à l'Allophycocyanine (APC) (BD Biosciences, San Diego, USA) et au 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) pour détecter les cellules en nécrose, selon les recommandations du fournisseur.

Les cellules en prolifération exprimant le Ki-67, l'induction de la prolifération par les sérums sur les HUVECs a été évaluée par un marquage du Ki-67 à l'aide d'un anticorps couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (BD Biosciences, San Diego, USA) selon les recommandations du fournisseur.

Pour quantifier les monocytes CD14+/CD16+ des patients dialysés, les monocytes ont été marqués avec des anticorps anti-CD14 FITC et anti-CD16 Phycoerythrine (PE) (BD Biosciences, San Diego, USA).

Les microparticules ont d'abord été marquées à l'aide d'anticorps anti-CD41 couplé à la Protéine de Peridine Phlorophylle (PerCP), anti-CD31 PE (eBioscience, San Diego, USA), anti-VEGFR1 APC et PE (R&D Systems, Minneapolis, USA), anti-VEGFR2 PE et anti-CD14 FITC (BD Biosciences, San Diego, USA). Dans un deuxième temps, elles ont été marquées à l'Annexine V selon les recommandations du fournisseur puis analysées par cytométrie en flux.

Les résultats de la cytométrie ont été traités avec le logiciel FlowJo 7.6.5 et les analyses statistiques ont été effectuées avec GraphPad Prism.

# RESULTATS

---

## 1. sFlt1 et dialyse

### 1.1. Impact de la dialyse sur la sécrétion de sFlt1

#### **Heparin induces a peridialytic increase in the antiangiogenic factor soluble Flt1.**

*Emmanuelle Meffray, Ruth J. Pepper, Mélanie Néel, Catherine Delcroix, Alan D. Salama Fadi Fakhouri and Frederic Lavainne.*

#### **Article soumis pour publication**

Le sFlt1 est associé à une fonction rénale dégradée et à un risque élevé d'accidents cardio-vasculaires. Par ailleurs, l'insuffisance rénale s'accompagne d'un état d'inflammation chronique, qui est exacerbé au cours de la dialyse, du fait de la biocompatibilité limitée des matériaux employés. Dans la mesure où l'inflammation peut conduire à une augmentation du taux de sFlt1 chez les patients, notre objectif était de déterminer l'impact de la dialyse en elle-même sur les taux sériques du sFlt1.

Pour cela, nous avons mesuré le taux de sFlt1 dans le sérum de 48 patients suivant différents types de dialyses, l'hémodialyse et l'hémodiafiltration, et à différents temps : avant le début de la séance, puis à 1 minute, 15 minutes, 30 minutes, 1h, 2h et 4h de dialyse.

Nous avons alors observé une augmentation très significative et très rapide du taux de sFlt1 (dès la première minute, avec un pic à 15 minutes), que nous avons cherché à expliquer par différents facteurs tels que la modalité de dialyse elle-même. L'hémodialyse provoquait une sécrétion significativement plus importante que l'hémodiafiltration, ce qui nous a conduits à tester l'influence de l'héparine, dont l'action sur le sFlt1 a déjà été observée auparavant. Or, dans le service de dialyse du CHU de Nantes, une des différences entre ces deux techniques porte sur les modalités d'héparinisation, ce qui nous a conduits à analyser l'impact de l'héparine sur la sécrétion de sFlt1. Nous avons alors constaté que le décalage de

trente minutes de l'administration d'héparine retarde d'autant le pic de sFlt1, et une hémodiafiltration avec prédilution pour éviter l'héparine annule quant à elle totalement ce pic. Ces résultats suggèrent donc que l'héparine joue un rôle dans l'induction de la synthèse de sFlt1.

En revanche, l'utilisation d'une membrane sur laquelle est fixée l'héparine pour la dialyse n'induit aucune augmentation de sFlt1, suggérant un effet de l'héparine au niveau systémique, et notamment sur les CE.

Enfin, pour évaluer l'implication potentielle des monocytes dans la sécrétion de sFlt1, nous avons soumis des monocytes en culture à des concentrations et durées d'incubations variables d'héparine. Pour cette expérience, des monocytes de témoins sains et de patients avant dialyse et en cours de dialyse ont été testés, mais là encore, aucune augmentation de la synthèse de sFlt1 n'est à noter. Par contre, la stimulation de monocytes avec du sérum de patients prélevés après une heure de dialyse induit la sécrétion de sFlt1 au bout de 16h d'incubation.

En conclusion, l'hémodialyse induit donc une forte augmentation de la libération de sFlt1 dans le sérum des patients dès les premières minutes en raison de l'utilisation d'héparine. Si les mécanismes en œuvre restent à élucider, ce phénomène induit un état anti-angiogénique prolongé qui ne peut qu'être néfaste à long terme.

Heparin induces a peridialytic increase in the antiangiogenic factor soluble Flt1.

Emmanuelle Meffray<sup>1</sup>, Ruth J. Pepper<sup>3</sup>, Mélanie Néel<sup>1</sup>, Catherine Delcroix<sup>2</sup>, Alan D. Salama<sup>3</sup>, Fadi Fakhouri<sup>1,2</sup> and Frédéric Lavainne<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> INSERM U643, ITUN, Université de Nantes and <sup>2</sup> Nephrology Department CHU de Nantes, Nantes, France.

<sup>3</sup> Centre for Nephrology, University College London, Royal Free Hospital, London, United Kingdom.

Short title: soluble Flt1 and dialysis.

Word count: abstract 300; text 2964.

Corresponding author:

Fadi Fakhouri

INSERM U643, ITUN, Université de Nantes and Nephrology Department CHU de Nantes, Nantes, France.

Telephone: 0033240087437

Fax: 0033240084660

E-mail: fadi.fakhouri@univ-nantes.fr

**Abstract**

**Background:** Soluble Flt1 (sFlt1) is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor, secreted mainly by placenta, endothelial cells and monocytes. Increased sFlt1 serum levels correlate with endothelial dysfunction and cardiovascular complications in dialysis patients. However, the impact of dialysis by itself on sFlt1 serum levels remains unknown.

**Study design:** Prospective single-centre study.

**Settings and participants:** 48 patients on regular haemodialysis in an university hospital.

**Methods:** We assessed peridialytic sFlt1 kinetics in included patients and the impact of different dialysis techniques (high-flux haemodialysis (HD) and haemodiafiltration (HDF)) and heparinization procedures on sFlt1 serum levels.

**Results:** sFlt1 serum levels increased as early as 1 minute after the start of dialysis and peaked at 15 minutes before returning to baseline at 4 hours (mean peak level 2551 pg/ml, vs 102 before dialysis ( $p < 0.0001$ )). sFlt1 kinetics were similar with two different dialysis membranes. In contrast, when unfractionated heparin (UH) and low molecular weight heparin (LMWH) were omitted during dialysis (HD or pre dilution HDF), no significant increase in sFlt1 levels occurred. Conversely, delayed administration of LMWH (after 30 minutes of a heparin-free HD) induced a sharp increase in sFlt1. Similarly, when UH and LMWH were omitted and citrate-based dialysate or a heparin-coated membrane was used, sFlt1 levels remained unchanged. When heparinizations procedures were the same, no difference in sFlt1 levels was noted between HD and HDF. In vitro, UH and LMWH failed to induce sFlt1 release by monocytes from controls or HD patients. These findings suggest that either priming of monocytes on the extracorporeal circuit is required for heparin-induced sFlt1 release or that endothelial cells contribute to this increase.

**Limitations:** Limited number of tested membranes.

**Conclusion:** Our results indicate that heparin-based HD induces a major peridialytic sFlt1 release which may exacerbate the anti-angiogenic state and thus endothelial dysfunction, commonly found in dialysis patients.

## Introduction

Cardiovascular disorders remain the leading cause of morbidity in patients with end-stage renal disease (ESRD), and account for roughly half the mortality in these patients<sup>1,2</sup>. Chronic kidney disease (CKD) by itself, particularly ESRD, is an independent cardiovascular risk factor and is associated with endothelial dysfunction<sup>3,4</sup>. Traditional cardiovascular risk factors explain only half of the cardiovascular mortality in ESRD patients<sup>5</sup>. Non-traditional risk factors have been identified in CKD/ESRD patients including various markers of inflammation (C-reactive protein, IL6, TNF $\alpha$ )<sup>5-7</sup> and asymmetric dimethyl arginine (ADMA)<sup>8</sup>. Recently, endothelial dysfunction and cardiovascular outcomes in CKD and ESRD patients have been linked to an increase in soluble Flt1 (sFlt1), an inhibitor of the vascular endothelial growth factor (VEGF)<sup>9</sup>. VEGF is the most potent growth factor for endothelial cells. Several types of VEGF receptors have been identified, the two main ones being VEGF-R1 and -R2. A circulating form of VEGF-R1, soluble Flt1 (sFlt1), (molecular weight 78 kDa)<sup>10</sup> lacking the transmembrane domain of the intact protein, results from an alternative splicing of VEGF-R1 transcript, but probably also from cleavage of the membrane-bound form of VEGFR-R1<sup>11, 12</sup>. sFlt1 is secreted mainly by monocytes, endothelial cells and placental cytotrophoblasts and binds and thus inhibits VEGF. Elevated levels of sFlt1 lead to functional VEGF deficiency, and promote an effective “anti-angiogenic state”. The clinical importance of such a sFlt1-driven “antiangiogenic state” has been illustrated by the association of elevated serum sFlt1 levels with preeclampsia<sup>13</sup>. More recently, Di Marco et al. showed that sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in patients with CKD<sup>9</sup>. In their study, increased sFlt1 serum levels were correlated to the occurrence of cardiovascular events, particularly myocardial infarction and stroke.

Accumulating experimental data indicate that sFlt1 release may be promoted by inflammation mainly through complement activation (anaphylatoxin C5a)<sup>14, 15</sup>. ESRD is perceived as a state of chronic low-grade inflammation. Besides, haemodialysis (HD) procedures per se exacerbate inflammation, mainly through the contact of blood with materials (dialysis membranes and extracorporeal circuit elements)<sup>16</sup>. Even though significant progress has been achieved in order to increase the biocompatibility of haemodialysis material, release of inflammatory cytokines (IL-1, -6 and -8) still occurs during haemodialysis sessions with biocompatible membranes<sup>17</sup>.

To date, no data regarding the impact of HD by itself on sFlt1 serum levels in ESRD patients have been reported. In the present study, we aimed to assess the impact of various dialysis procedures on the serum levels of sFlt1 in patients with ESRD.

## Methods

### *Patients and serum analysis*

Blood samples were drawn from patients on chronic HD (department of Nephrology and Immunology, CHU de Nantes, France) before and 1 min, 15 min, 30 min, and 1, 2 and 4 hours after the start of a regular four-hour HD or HDF session. Blood samples before the session were drawn from the arterial needle prior to connecting arterial blood tubing, and all the others samples were drawn from the sample site on the arterial side. All samples were collected in stable patients in the absence of acute or chronic infections, profound anaemia (haemoglobin 10-12 g/dl) or recent surgery. We also included as controls 20 healthy individuals, who underwent venesection. Detailed dialysis modalities are shown in the supplementary data (section A).

The same ultrapure water was used for all dialysis modalities. Anticoagulation consisted of low-molecular weight heparin (LMWH), enoxaparin, 2000 to 6000 units injected on the arterial side during the first minute after the start of the session.

Circulating sFlt1 and C5a levels were assayed using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions (R & D systems, Minneapolis, USA).

All patients gave informed consent before inclusion in the study which was approved by the Ethics Committee of CHU de Nantes.

### *Human monocytes culture*

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were extracted from blood using Ficoll (Eurobio, Les Ulis, France) and monocytes were isolated using elutriation and cultured as previously described<sup>18</sup>. After stimulation for 30 min with TNF- $\alpha$  (2 ng/ml) monocytes were incubated with serum (10%) or various reagents for a variable duration ranging from 30 minutes to 16 hours. Subsequently, cells supernatants were harvested, cells debris were removed by centrifugation and samples were stored at -20°C until further processing.

Real-time quantitative PCR for the detection of the four sFlt1 isoforms was performed as previously described<sup>18</sup>.

### *Statistics*

All values are means with values range indicated. Data were analyzed using one-way ANOVA, paired *t* test, and Spearman rank correlation using Prism software (version 4; GraphPad, La Jolla, CA).

## Results

### *Circulating sFlt1 levels increase during a dialysis session (figure 1).*

The main clinical and biological characteristics of 48 consecutive patients included are summarized in the table.

sFlt1 levels were slightly increased at baseline (mean 102 pg/ml; range: 32-237) compared to healthy controls (69 pg/ml; range: 28-168) ( $p= 0.054$ ). In all patients, an additional increase in serum sFlt1 was noted at all time points during high-flux HD or post-dilution HDF, starting as early as 1 minute (1180 pg/ml; range: 71-6440.  $p < 0.001$ ) and reaching a maximum at 15 minutes (2551 pg/ml; range: 194-6393.  $p < 0.0001$ ) after the start of HD. Serum sFlt1 remained higher compared to baseline levels at 30 minutes , 1h and 2h after the start of haemodialysis, but decreased to baseline levels by 4h (figure 1).

### *Impact of the type of dialysis membrane on sFlt1 levels during HD (figure 2).*

To assess the impact of the type of membrane on sFlt1 levels during HD, 10 consecutive patients underwent HD using successively PEPA-FDX or NEPHRAL 500 membranes, and sFlt1 serum levels were assessed at different time-points. Serum sFlt1 levels did not differ between the two types of membranes at all time-points (  $p= 0.5$  paired t test)(figure 2).

### *Impact of dialysis techniques and/or heparin on sFlt1 levels during dialysis (figure 3).*

In order to assess the impact of dialysis procedures on sFlt1 kinetics, 27 consecutive patients underwent successively high-flux HD and postdilution HDF using the same membrane (PEPA-FDX) and sFlt1 serum levels were assessed at different time-points. Serum sFlt1 levels were significantly higher during HD compared to HDF at all time points, particularly, at 15 minutes (2987 pg/ml (577-5655) for HD versus 888 pg/ml (344-2807) for HDF), ( $p= 0.01$  t paired test, for all time-points).

There were two main differences in our unit between these two dialysis modalities: on the one hand, the technique itself (HD vs HDF) and on the other hand, the heparinization procedures (supplementary data, section A). In order to test the respective roles of techniques and heparinization procedures, eleven consecutive patients underwent dialysis sessions with three different modalities :

- A) a “conventional” HD session (extracorporeal circuit rinsed with heparinized saline, UH 5000 UI/l, and LMWH used for maintenance anticoagulation),

B) a postdilution HDF session (priming on line, with ultrapure water, LMWH used for maintenance anticoagulation)

and C) a HD session during which the dialysis circuit was not rinsed with heparinized saline but prefilled with ultrapure water (no use of UH, LMWH used for maintenance anticoagulation).

LMWH dose was the same for each patient in the three modalities.

When the rinsing of the extracorporeal circuit with heparinized saline was avoided during a HD session (modality C), sFlt1 increase was blunted compared to “conventional” HD (15 minutes sFlt1-peak : 920 pg/ml (415-1680) vs 3166 pg/ml (1474-5655),  $p < 0.001$ ), but was similar to the increase noted in a post-dilution HDF session (765 pg/ml (344-1319),  $p = ns$ ). (figure 3).

These findings suggested that heparin is a major driver of sFlt1 increase during dialysis. In order to test this hypothesis, the same eleven patients underwent a HD session during which the dialysis circuit was prefilled with ultrapure water but LMWH administration was delayed for 30 minutes until after the start of the session. sFlt1 increase was completely prevented during the first 30 minutes of dialysis. LMWH injection was followed by a significant and rapid increase in sFlt1 serum levels (1320 pg/ml (667-1834)). Finally, these eleven patients subsequently underwent a predilutional HDF session without any use of heparin. sFlt1 serum levels remained unchanged compared to baseline levels during dialysis (figure 4).

#### *A heparin-coated membrane does not induce circulating sFlt1 levels increase (figure 4)*

Finally, we assessed the effect of a heparin-coated membrane (EVODIAL®) on sFlt1 serum levels. Eight patients underwent a predilutional HDF session, with standard dialysate concentrates (bicarbonate-based buffer/BiCart Select®, acetic acid-based concentrate/SelectBag® One) but without the use of either UH or LMWH. No per dialytic increase in sFlt1 levels occurred. Similarly, when these patients underwent a HD session, with EVODIAL® and a citrate-based dialysate (Citrasate®) without the use of either UH or LMWH, no increase in sFlt1 levels was noted.

#### *Change in endothelial cells markers during a dialysis session*

Next, we assessed whether the increase of sFlt1 levels was associated with any per dialytic change in the levels of two markers of endothelial cell activation, sVCAM and soluble E-selectin. No significant per dialytic change in serum levels of sVCAM or E-selectin was detected (supplementary data, figure S1).

*Effect of UH and LMWH on sFlt1 secretion by human monocytes in vitro.*

Our in vivo findings prompted us to test the effect of various types of heparin on sFlt1 release by monocytes. Monocytes from healthy donors (n=4) and monocytes from HD patients drawn at t0 before the start of a HD session (n=5) and at 30 minutes after the start of a heparin-free HD (n=5) were incubated with UH at different doses (10 and 50 IU/ml) and LMWH (0.5, 5, 25 and 50 IU/ml) for 30 minutes, 2, 4, 8 and 16 hours. No significant and reproducible increase in the release of sFlt1 by monocytes was detected at the various time-points, regardless of the type and dose of heparin or the source of monocytes (data not shown).

*Effect of haemodialysis patients' serum on sFlt1 secretion by human monocytes in vitro (figure 5).*

Finally, we assessed the impact of HD patients' serum, drawn before and during a "conventional" HD session, on sFlt1 release by monocytes in vitro. Only the serum drawn 1h after the start of haemodialysis induced a significant sFlt1 release by monocytes and only after 16h incubation (mean sFlt1: 452 pg/ml (250-846) for serum t1h vs 181 pg/ml (73-132) for control serum ( $p < 0.001$ ). Inhibition of C5a receptor or metalloproteases involved in the cleavage of membrane-bound VEGFR1 did not alter sFlt1 release by monocytes (figure 5).

Besides, an increase in sFlt1 mRNA levels was detected in monocytes drawn from healthy donors following 4-hour incubation with serum (n=5) drawn 1h after the start of a HD session, compared to control serum (1.52 fold increase compared to control serum (n=5);  $p=0.02$ , t paired test).

## Discussion

Our data clearly show that heparin, and not dialysis by itself, induces a dramatic perodialytic increase in the serum levels of sFlt1, a potent antiangiogenic factor. During the first hour of a conventional heparin-based HD session, mean sFlt1 serum levels peaked at roughly 25-30 times their baseline levels, reaching values only detected in women with preeclampsia<sup>13</sup>. In the previous study by Di Marco et al., markers of endothelial dysfunction and the incidence of cardiovascular events in CKD/ESRD patients were correlated to a milder (2-fold the normal range), albeit chronic, increase in sFlt1 levels<sup>9</sup>. In a relatively limited number of dialysis patients, and in accordance with previously published data<sup>19</sup>, we did not detect a significant perodialytic increase in two endothelial activation soluble markers, sVCAM and sE-selectin. However, one cannot exclude that the impressive and repeated (thrice weekly) perodialytic increase in sFlt1 serum levels may contribute in the long-term to the impairment of endothelial repair and thus to the high cardiovascular burden in ESRD patients. This point warrants further assessment in prospective long-term studies.

The introduction of UH and later of LMWH represented a key step in the improvement and thus the rapid development of dialysis<sup>20</sup>. HD is a unique situation that allows an *in vivo* assessment of the impact of heparin on sFlt1 release. Our data clearly indicate that heparin, and not dialysis by itself, is the main inducer of sFlt1 increase during HD sessions. When UFH or LMWH administration was avoided or delayed during a HD or a predilutional HDF session, no significant increase in sFlt1 serum levels occurred. Our data are in accordance with recent reports on the impact of heparin on the release of sFlt1 by two of its main sites of production: the placenta and endothelium/vessel wall<sup>21, 22</sup>. *In vitro*, heparin induces sFlt1 release by placental explants through the shedding of the extracellular domain of membrane-bound Flt1. Heparins and the endogenous heparanase, an endo- $\beta$ -D-glucuronidase, also induce the displacement of cell or heparan/sulfate-bound sFlt1 stored in the placenta and arterial wall<sup>23</sup>. *In vivo*, pregnant women and patients undergoing cardiac catheterization procedures, and receiving heparin experience an increase in circulating sFlt1 levels<sup>22</sup>. However, this is the first demonstration of the impact of heparin on sFlt1 kinetics in dialysis patients, who unlike other types of patients, are repeatedly (thrice a week) and for several years, exposed to a dramatic heparin-induced perodialytic increase in sFlt1 serum levels.

As monocytes are main secretors of sFlt1, one could assume a major role of these cells in the sharp increased of sFlt1 during HD session. The increase in sFlt1 serum levels started as early as 1 minute after the beginning of the dialysis and therefore could be due to the early contact

of blood components (monocytes) with the heparinized extracorporeal circuit, before the injection of LMWH, at least during a “conventional” HD session. However, *in vitro*, LMWH and UH did not induce sFlt1 release by monocytes isolated from healthy control or HD patients. Our *in vitro* experiments only assessed the effect of heparin on sFlt1 release by circulating monocytes collected during a HD session. The discrepancy between the effect of heparins on sFlt1 release *in vitro* and *in vivo* may be due to the fact that prior activation of monocytes through adhesion to the extracorporeal circuit is mandatory for an induction of sFlt1 release by heparins.

In contrast, LMWH systemic administration (on the arterial line) may impact both monocytes and endothelial cells release of sFlt1. Endothelial cells may also play a central role in the perodialytic increase of sFlt1 serum levels. The impact of heparin on sFlt1 release by endothelial cells/arterial wall has been previously documented *in vitro*<sup>22, 23</sup>. Therefore, LMWH administration on the arterial line is very likely to have an effect on endothelial cells and (subsequently) on sFlt1 increase. Secondly, the absence of any perodialytic increase in sFlt1 levels with a heparin-coated membrane, EVODIAL®, also argues for a role of endothelial cells. Heparin on the surface of this membrane is irreversibly fixed by multiple ionic bonds and thus is not released in the bloodstream. The absence of any perodialytic increase in sFlt1 levels with the use of this membrane, suggests that the systemic administration of heparin is crucial for the induction of sFlt1 release by endothelial cells. However, one can not exclude an effect of systemic heparin on monocytes or a reduced heparin-induced activation of monocytes at the contact of the EVODIAL membrane.

Besides our data indicate that heparin-based dialysis not only induces a sharp increase of sFlt1 during a HD session, but also contributes to the maintenance of the previously documented low-grade chronic increase of sFlt1 in these patients<sup>9</sup>. Serum drawn after 1h of HD session, but not serum drawn before a HD session, induced a late release of sFlt1 by human monocytes. This effect was mediated through an increase in the synthesis of sFlt1 but not through a cleavage of the membrane-bound Flt1 and was independent of the complement anaphylatoxin C5a. sFlt1 release was not mediated by the LMWH contained in the patients' serum as heparin by itself did not induce any significant release of sFlt1 by monocytes. The nature of the mediators which induce this sFlt1 increase remains unknown and is currently being investigated.

Our findings have several important implications for the management of ESRD patients undergoing haemodialysis. Firstly, the evaluation of the efficiency and biocompatibility of membranes and dialysis procedures has been traditionally based on their potential to induce

the activation of the coagulation and complement cascade, the release of various inflammatory cytokines and the clearance of small and medium-size molecules<sup>24</sup>. sFlt1 may be an additional pertinent parameter for the evaluation of dialysis biocompatibility. For instance, in the present study, peak serum sFlt1 levels were significantly reduced during a HDF session compared to a HD session. This difference was ultimately linked to the different use of heparin during these two dialysis procedures. There is an ongoing debate on the potentially improved survival of HDF patients compared to HD patients, due mainly to the reduction in cardiovascular complications<sup>25-27</sup>. The assessment of sFlt1 kinetics could be helpful in the comparison of these two techniques. Importantly, we have assessed the impact of only two high-flux biocompatible membranes on sFlt1 kinetics. The comparison of other types of dialysis membranes and is therefore warranted. Due to its molecular weight (78 kDa), no dialysis removal of sFlt1 is expected whatever the membrane. Nevertheless, the potential adsorption of sFlt1 on membranes remains to be assessed.

Secondly, our findings suggest that heparin-sparing HD techniques may be better options for ESRD patients. The impact of different modalities of heparin administration (bolus versus continuous infusion, doses), and of available alternatives to heparins (citrate-based HD or predilutional heparin-free HDF) on sFlt1 kinetics and most importantly long-term cardiovascular events remain to be evaluated. In the present study, we simply used Citrasate® in association with EVODIAL® as a way to achieve a totally heparin-free HD session. However, the concentration of Citrasate® was low and it remains unknown whether higher dose of citrate (as in regional citrate anticoagulation) for longer heparin-free session would impact sFlt1 secretion.

In conclusion, heparin-based dialysis induces a major sFlt1 release and therefore may exacerbate the sFlt1-associated anti-angiogenic state in ESRD patients and thus aggravate their endothelial dysfunction and cardiovascular burden. This should be taken into account for the assessment and establishment of optimal dialysis procedures.

#### Disclosure

The authors have no conflict of interest to declare.

This study was funded by a grant from INSERM (ATIP-AVENIR).

**Table:** Clinical and biological characteristics of 48 patients on regular dialysis included in the study.

	<b>n = 48</b>
<b>Female</b>	<b>22 (46%)</b>
<b>Age (years)</b>	<b>70 (20-89)</b>
<b>Time on dialysis (months)</b>	<b>48 (1-355)</b>
<b>Fistula / Indwelling catheter</b>	<b>40 (83%) / 8 (17%)</b>
<b>Hypertension</b>	<b>43 (90%)</b>
<b>Diabetes Mellitus</b>	<b>23 (48%)</b>
<b>Myocardial infarction / Cerebral ischemia</b>	<b>12 (25%)</b>
<b>Revascularization procedths</b>	<b>15 (31%)</b>
<b>Hemoglobin (g/dl)</b>	<b>10.8 (8-12.7)</b>
<b>CRP (mg/l)</b>	<b>10 (0-66)</b>
<b>Albuminemia (g/l)</b>	<b>35.8 (25-46)</b>
<b>Phosphatemia (mmol/l)</b>	<b>1.3 (0.74-2.26)</b>
<b>Erythropoien use</b>	<b>45 (94%)</b>
<b>Renin angiotensin system blockers</b>	<b>11 (23%)</b>
<b>Statin use</b>	<b>16 (33%)</b>

## Figures legends

### *Figure 1*

sFlt1 serum levels dramatically increased during a dialysis session in 48 consecutive patients on regular haemodialysis (HD) or haemodiafiltration (HDF). Maximum levels of sFlt1 were reached 15 minutes after the start of dialysis.

\*:  $p < 0.001$  versus t0, 1h, 2h and 4h.

\*\* :  $p < 0.0001$  versus all other time points.

\*\*\*:  $p < 0.001$  versus all time points except for 15 minutes.

‡ :  $p = 0.04$  versus t0.

### *Figure 2*

No significant difference in sFlt1 kinetics during dialysis was noted when 12 patients underwent a haemodialysis session using successively a PEPA-FDX or NEPHRAL 500 membrane.

### *Figure 3*

Eleven consecutive patients underwent dialysis session with three different modalities :

A - “Conventional HD” with UH for rinsing the extracorporeal circuit and LMWH for maintenance anticoagulation.

B - Post-dilution HDF. No use of UH. LMWH used for maintenance anticoagulation.

C - “Modified HD”. Priming with ultra pure water, no use of UH, and LMWH used for maintenance anticoagulation.

The same doses of heparins were used in the three modalities.

Compared to “conventional HD” (A), sFlt1 increase was blunted when heparinized saline was avoided during HD (C), and during a postdilution HDF session (B) (\*\*:  $p < 0.001$ ).

When heparinization procedures were the same, there was no difference in sFlt1 kinetics between HDF (B) or HD (C) ( $p = NS$ )

### *Figure 4*

The same eleven patients underwent dialysis sessions with four different dialysis modalities :

A - HD with priming with ultra pure water, no use of UH, and the injection of LMWH delayed till 30 minutes after the start of HD.

B - Predilutional HDF without the use of neither UH nor LMWH.

C- Predilutional HDF using a heparin-coated membrane (Evodial) but without the use of neither UH nor LMWH.

D- HD using a heparin-coated membrane (Evodial) and citrate-based dialysate (Citrasate®) but without the use of neither UH nor LMWH.

With modality A, sFlt1 increase was completely prevented during the first 30 minutes of dialysis. LMWH injection was followed by a significant and rapid increase in sFlt1 serum levels (§:  $p < 0.01$  versus all time-points except 1h in modality A). In contrast, with modalities B, C and D, no increase in sFlt1 levels occurred during the dialysis session.

### *Figure 5*

Serum drawn from haemodialysis (HD) patients 1 hour after the start of conventional HD induces a delayed (16 hour-incubation) increase in sFlt1 release by normal monocytes in vitro.

Monocytes from healthy donors were incubated with serum (10%) drawn from HD patients (n=12) before, 1h, 2h and 4h after the start of conventional HD or with serum from healthy controls (n=8) for 2, 4, 8 and 16 hours. Culture supernatants were collected and sFlt1 levels measured.

Sera drawn between 1 and 30 minutes after the start of HD were not tested due to their high sFlt1 concentration that preclude any further assessment of sFlt1 release by monocytes in vitro. In order to correct for the sFlt1 present in sera drawn 1h after the start of HD, these sera were incubated without monocytes for up to 16h and residual sFlt1 levels assessed. Negligible levels of sFlt1 were detected after 16h incubation (mean sFlt1: 16 pg/ml (7-20)).

Only the serum drawn 1 hour after the start of HD induces a significant increase in sFlt1 release by monocytes in vitro. Pretreatment of monocytes for 1 hour with GM 6001 (25µM), a broad-spectrum inhibitor of the matrix metalloproteinases family (MMPinh) or with an anti-C5a human receptor (aC5aR) mAb (10 µg/ml) before incubation (16h) with serum from haemodialysis patients (n=9) did not alter sFlt1 release.

\*\*\*:  $p < 0.001$  for serum t1h versus t0 and controls.

Figure 1

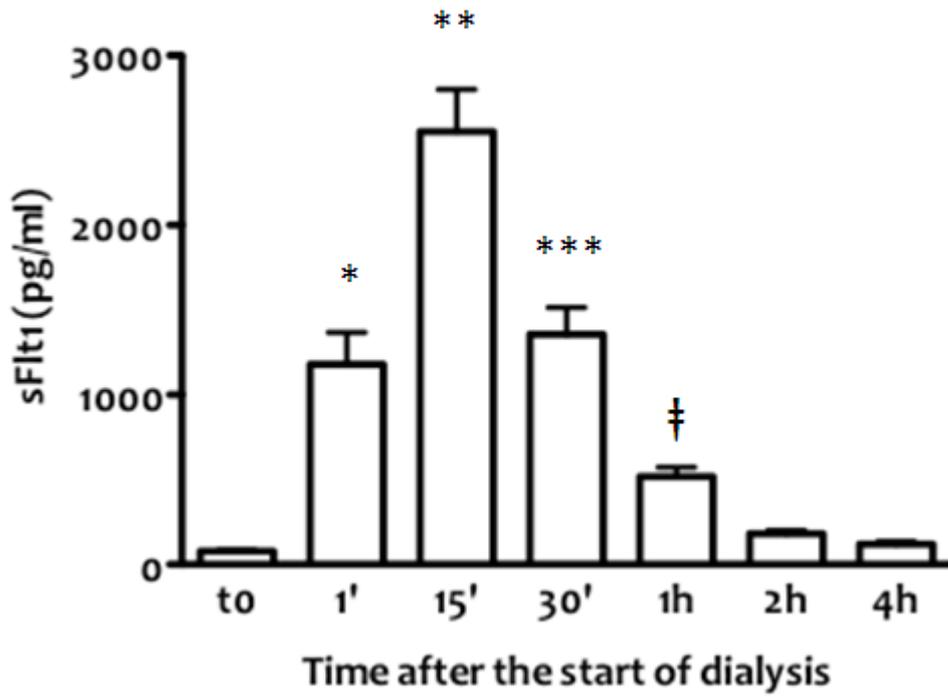


Figure 2

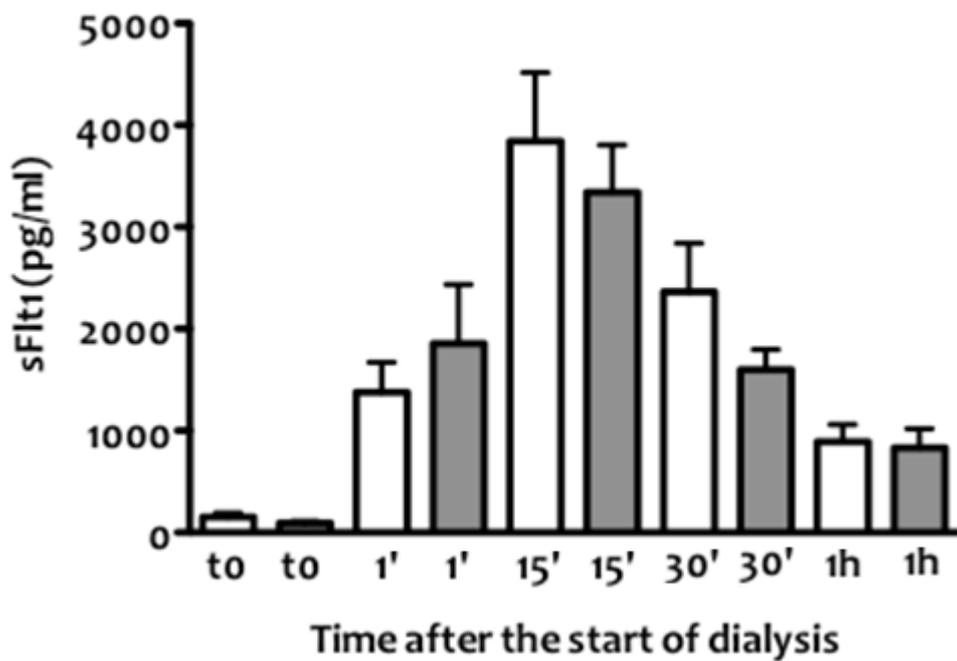


Figure 3

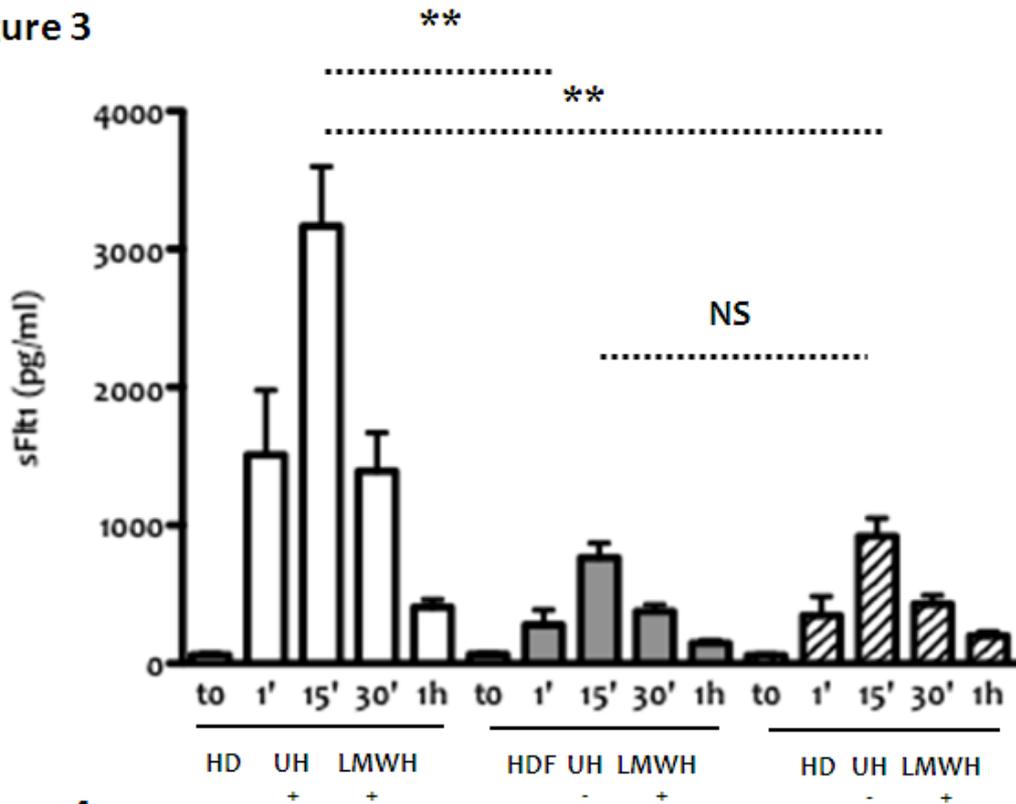


Figure 4

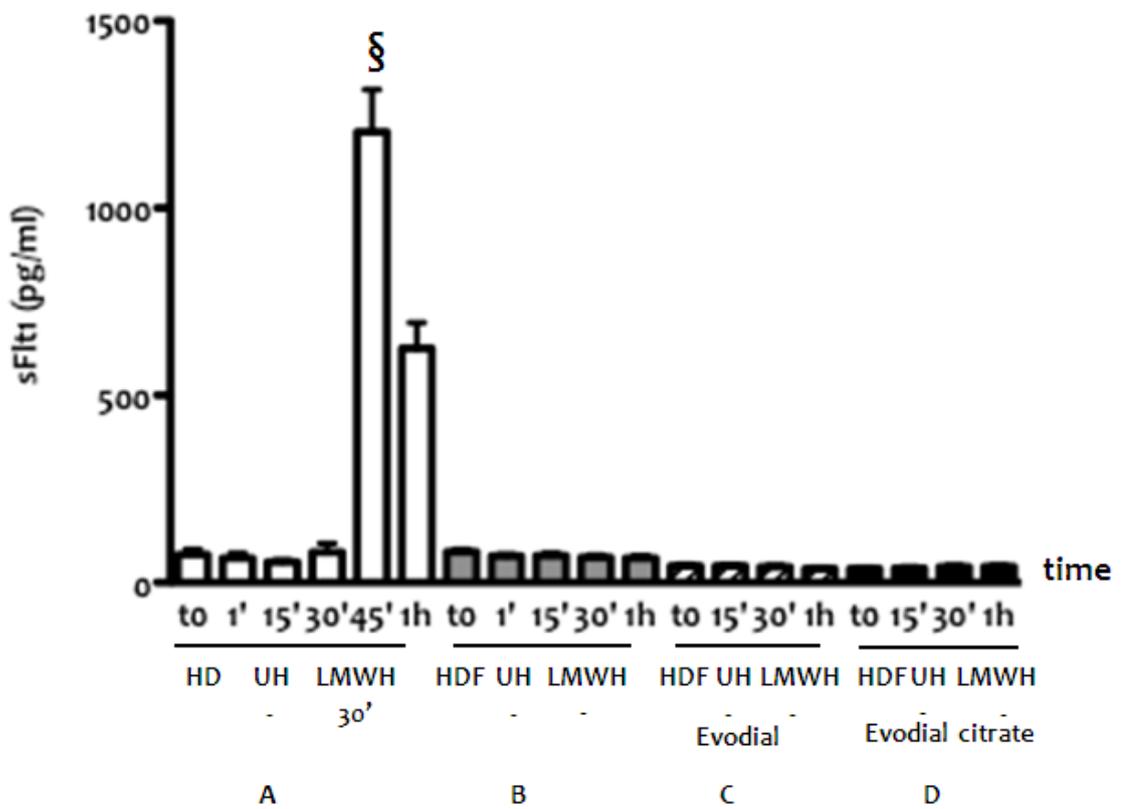
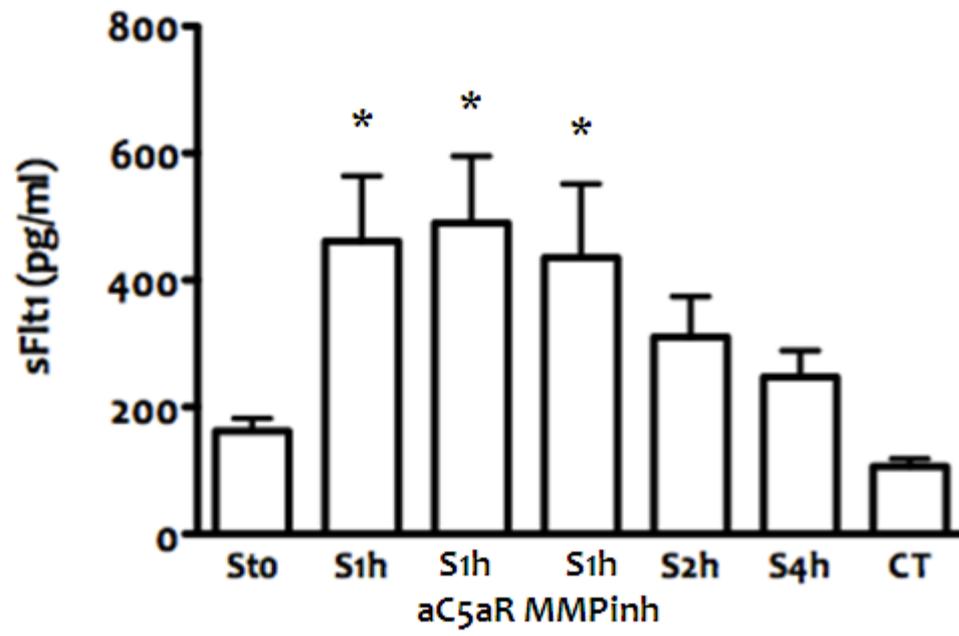


Figure 5



## Supplementary data

### A. Dialysis modalities in patients included in the study.

Haemodialysis sessions were performed using AK200 ULTRA S generator (GAMBRO<sup>®</sup>) and one of the following membranes: polyester polyarylate (PEPA-FDX 210 GW, NIKKISO<sup>®</sup>) or polyacrylonitrile (AN69 ST/ NEPHRAL 500, HOSPAL<sup>®</sup>). HDF sessions were performed with the same generator, either using postdilution and Gambro ULTRACONTROL<sup>®</sup> system in pressure control mode, or predilution with volume control mode. For hemodiafiltration, only PEPA-FDX 210 GW membrane was used.

Blood flow was between 300 and 350 ml/min for HD and HDF. Dialysate flow was: 500 ml/min in HD, 575 ml/min in postdilution HDF and 700 ml/min in predilution HDF, respectively. In postdilution and predilution HDF, mean infusion volume/session was 21.6 l (range: 14.6-30) and 44.3 l (range: 34-48), respectively.

Heparinization procedures were different for HD and HDF sessions. During a HD session, the extracorporeal circuit was rinsed with 2 liters of heparinized saline using unfractionated heparin (UH) (5000UI/l) before the start of dialysis. In HDF, priming was on-line with ultrapure water (no use of UH). Low molecular weight heparin (LMWH) was used as maintenance anticoagulation for both, HD and HDF.

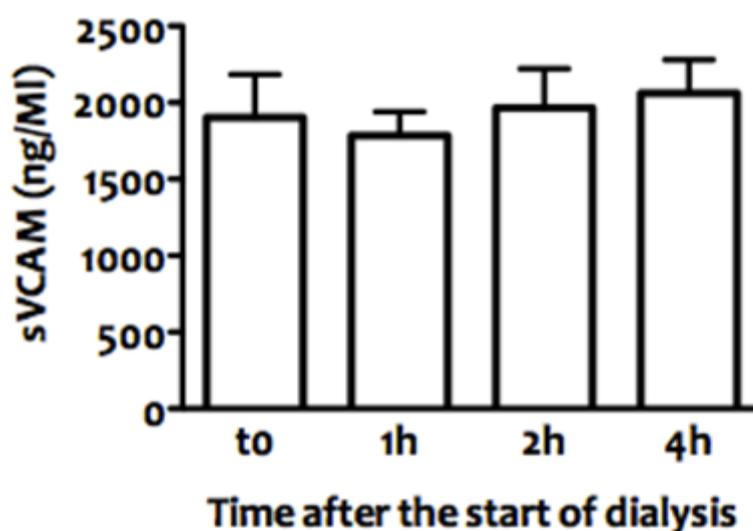
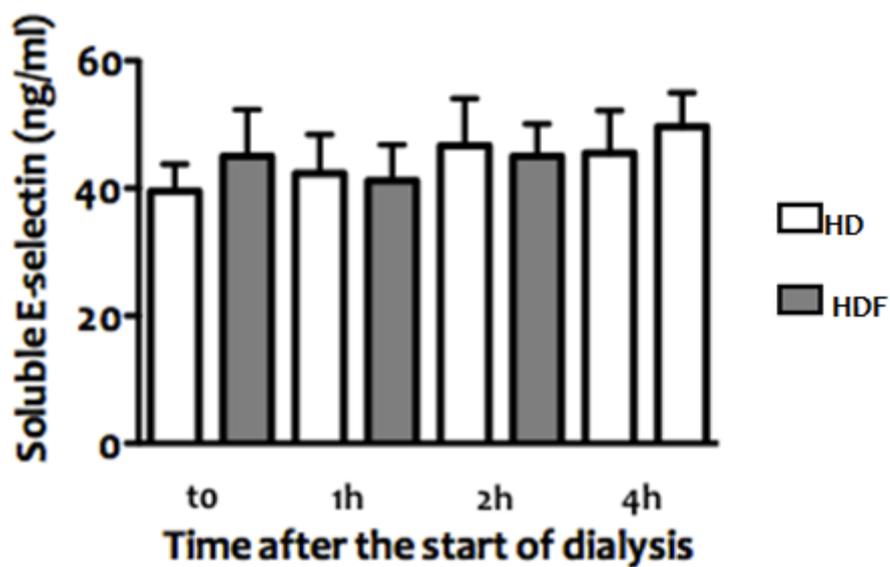


Figure S1 : Plasma levels of soluble VCAM and E-selectin were assessed in 9 patients undergoing hemodialysis (HD) or hemodiafiltration (HDF) at t0, 1h, 2h and 4h after the start of dialysis. No significant per dialytic change in serum levels of sVCAM or E-selectin was detected.

## References

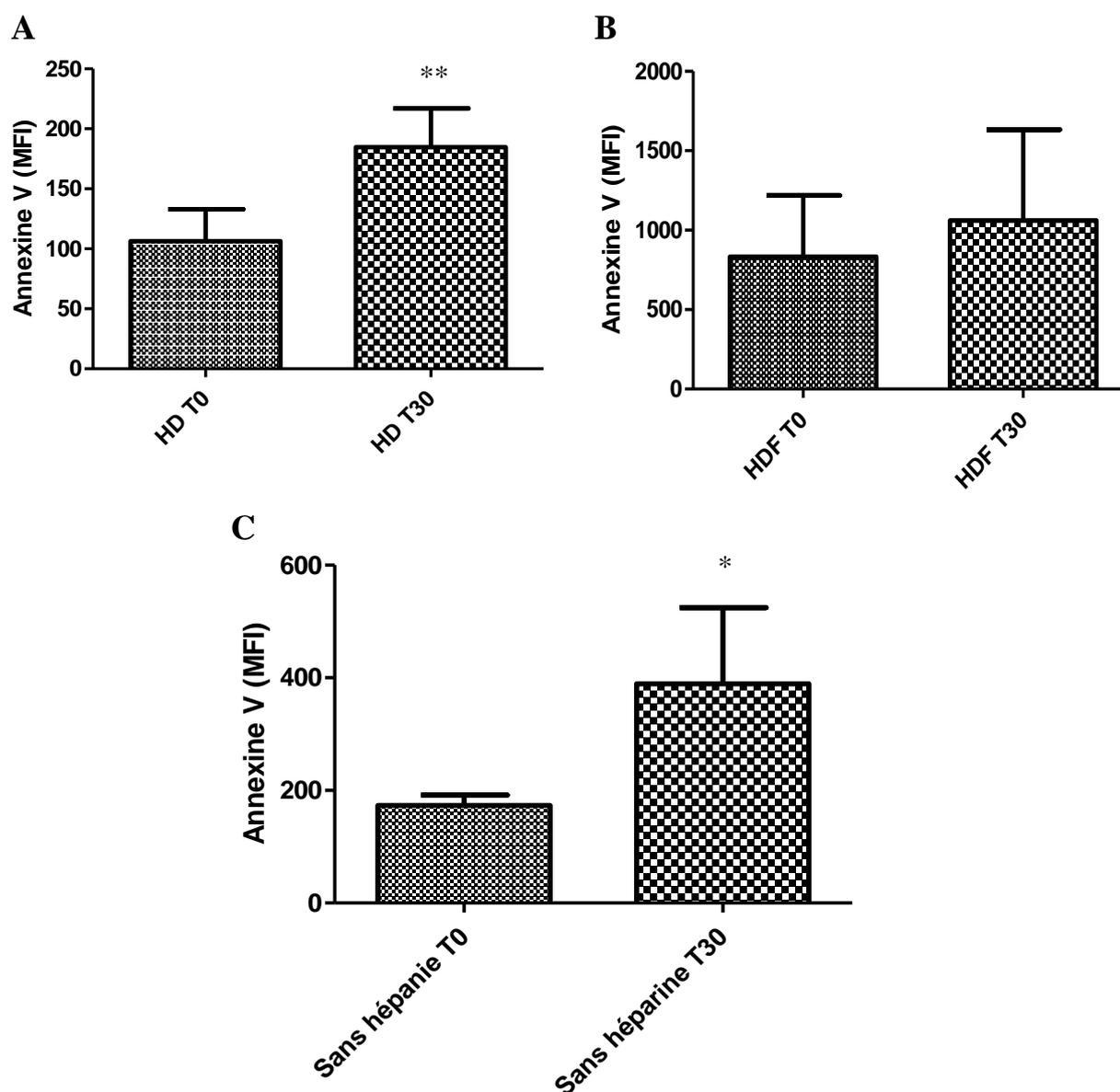
1. Himmelfarb, J, Ikizler, TA: Hemodialysis. *N Engl J Med*, 363: 1833-1845.
2. Herzog, CA, Ma, JZ, Collins, AJ: Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N Engl J Med*, 339: 799-805, 1998.
3. Stam, F, van Guldener, C, Becker, A, Dekker, JM, Heine, RJ, Bouter, LM, Stehouwer, CD: Endothelial dysfunction contributes to renal function-associated cardiovascular mortality in a population with mild renal insufficiency: the Hoorn study. *J Am Soc Nephrol*, 17: 537-545, 2006.
4. Wu-Wong, JR: Endothelial dysfunction and chronic kidney disease: treatment options. *Curr Opin Investig Drugs*, 9: 970-982, 2008.
5. Zoccali, C, Tripepi, G, Mallamaci, F: Predictors of cardiovascular death in ESRD. *Semin Nephrol*, 25: 358-362, 2005.
6. Honda, H, Qureshi, AR, Heimbürger, O, Barany, P, Wang, K, Pecoits-Filho, R, Stenvinkel, P, Lindholm, B: Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis*, 47: 139-148, 2006.
7. Stenvinkel, P, Ketteler, M, Johnson, RJ, Lindholm, B, Pecoits-Filho, R, Riella, M, Heimbürger, O, Cederholm, T, Girndt, M: IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. *Kidney Int*, 67: 1216-1233, 2005.
8. Zoccali, C, Bode-Boger, S, Mallamaci, F, Benedetto, F, Tripepi, G, Malatino, L, Cataliotti, A, Bellanuova, I, Fermo, I, Frolich, J, Boger, R: Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*, 358: 2113-2117, 2001.
9. Di Marco, GS, Reuter, S, Hillebrand, U, Amler, S, König, M, Larger, E, Oberleithner, H, Brand, E, Pavenstadt, H, Brand, M: The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 20: 2235-2245, 2009.
10. Jung, JJ, Tiwari, A, Inamdar, SM, Thomas, CP, Goel, A, Choudhury, A: Secretion of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 (sVEGFR1/sFlt1) requires Arf1, Arf6, and Rab11 GTPases. *PLoS One*, 7: e44572.
11. Rahimi, N, Golde, TE, Meyer, RD: Identification of ligand-induced proteolytic cleavage and ectodomain shedding of VEGFR-1/FLT1 in leukemic cancer cells. *Cancer Res*, 69: 2607-2614, 2009.
12. Thomas, CP, Andrews, JI, Liu, KZ: Intronic polyadenylation signal sequences and alternate splicing generate human soluble Flt1 variants and regulate the abundance of soluble Flt1 in the placenta. *Faseb J*, 21: 3885-3895, 2007.
13. Levine, RJ, Lam, C, Qian, C, Yu, KF, Maynard, SE, Sachs, BP, Sibai, BM, Epstein, FH, Romero, R, Thadhani, R, Karumanchi, SA: Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 355: 992-1005, 2006.
14. Girardi, G, Yarilin, D, Thurman, JM, Holers, VM, Salmon, JE: Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med*, 203: 2165-2175, 2006.
15. Langer, HF, Chung, KJ, Orlova, VV, Choi, EY, Kaul, S, Kruhlak, MJ, Alatsianos, M, Deangelis, RA, Roche, PA, Magotti, P, Li, X, Economopoulou, M, Rafail, S, Lambris, JD, Chavakis, T: Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis. *Blood*, 116: 4395-4403.

16. Caglar, K, Peng, Y, Pupim, LB, Flakoll, PJ, Levenhagen, D, Hakim, RM, Ikizler, TA: Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney Int*, 62: 1408-1416, 2002.
17. Gamboa, JL, Pretorius, M, Todd-Tzanetos, DR, Luther, JM, Yu, C, Ikizler, TA, Brown, NJ: Comparative Effects of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin-Receptor Blockade on Inflammation during Hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*, 23: 334-342.
18. Le Roux, S, Pepper, RJ, Dufay, A, Neel, M, Meffray, E, Lamande, N, Rimbart, M, Josien, R, Hamidou, M, Hourmant, M, Cook, HT, Charreau, B, Larger, E, Salama, AD, Fakhouri, F: Elevated soluble Flt1 inhibits endothelial repair in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol*, 23: 155-164.
19. Liakopoulos, V, Eleftheriadis, T, Kyropoulos, T, Voliotis, G, Potamianos, S, Zengos, N, Stefanidis, I, Heintz, B: Hemodialysis procedure does not affect the levels of sICAM-1 and sVCAM-1 in patients with end stage renal disease. *Ren Fail*, 27: 315-321, 2005.
20. Davenport, A: What are the options for anticoagulation needs in dialysis for patients with heparin-induced thrombocytopenia? *Semin Dial*, 24: 382-385.
21. Rosenberg, VA, Buhimschi, IA, Lockwood, CJ, Paidas, MJ, Dulay, AT, Ramma, W, Abdel-Razeq, SS, Zhao, G, Ahmad, S, Ahmed, A, Buhimschi, CS: Heparin elevates circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 immunoreactivity in pregnant women receiving anticoagulation therapy. *Circulation*, 124: 2543-2553.
22. Searle, J, Mockel, M, Gwosc, S, Datwyler, SA, Qadri, F, Albert, GI, Holert, F, Isbruch, A, Klug, L, Muller, DN, Dechend, R, Muller, R, Vollert, JO, Slagman, A, Mueller, C, Herse, F: Heparin strongly induces soluble fms-like tyrosine kinase 1 release in vivo and in vitro--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31: 2972-2974.
23. Sela, S, Natanson-Yaron, S, Zcharia, E, Vlodaysky, I, Yagel, S, Keshet, E: Local retention versus systemic release of soluble VEGF receptor-1 are mediated by heparin-binding and regulated by heparanase. *Circ Res*, 108: 1063-1070.
24. Horl, WH: Hemodialysis membranes: interleukins, biocompatibility, and middle molecules. *J Am Soc Nephrol*, 13 Suppl 1: S62-71, 2002.
25. Panichi, V, Tetta, C: On-line hemodiafiltration in the large RISCVID study. *Contrib Nephrol*, 175: 117-128.
26. Locatelli, F, Manzoni, C, Vigano, S, Cavalli, A, Di Filippo, S: Hemodiafiltration - state of the art. *Contrib Nephrol*, 168: 5-18.
27. Maduell, F, Moreso, F, Pons, M, Ramos, R, Mora-Macia, J, Carreras, J, Soler, J, Torres, F, Campistol, JM, Martinez-Castelao, A: High-efficiency postdilution online hemodiafiltration reduces all-cause mortality in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol*, 24: 487-497.

## 1.2. sFlt1 et dialyse : un contexte anti-angiogénique ?

Les travaux décrits plus haut démontrent que la dialyse induit une libération de sFlt1, de façon très rapide et très intense. Cependant, ils ne permettent pas d'élucider les mécanismes impliqués, ni de démontrer leur impact sur l'endothélium. C'est à ces questions que nous avons ensuite tenté de répondre.

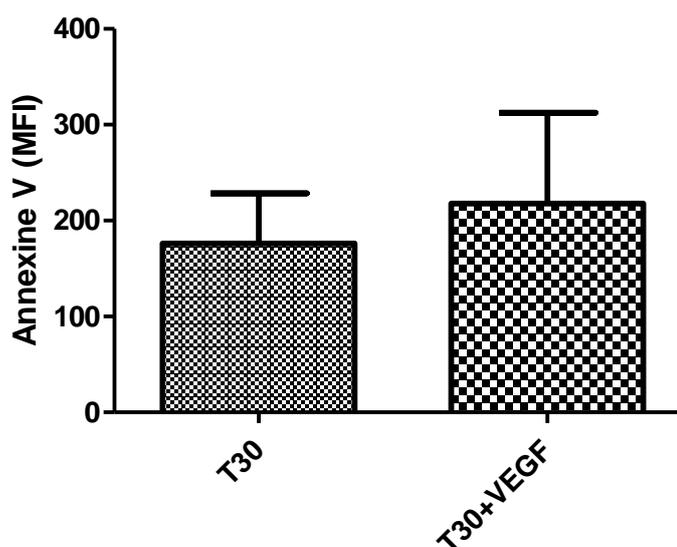
Afin de démontrer l'effet anti-angiogénique de la sécrétion de sFlt1 sur l'endothélium des patients, des HUVECs ont été incubées avec les sérums de 8 à 9 patients prélevés avant le début de la séance (T0) puis au bout de 30 minutes de dialyse (T30). Après 48h d'incubation, les cellules ont été marquées à l'Annexine V, un marqueur de l'apoptose. Cette expérience a été répétée pour des patients sous hémodialyse (rinçage du circuit à l'héparine non fractionnée et injection d'héparine de bas poids moléculaire), hémodiafiltration (pré-remplissage du circuit à l'eau ultrapure et injection d'héparine de bas poids moléculaire) et sans héparine, selon les modalités décrites plus haut. Il convient de noter que, pour les sérums de chaque patient, ces six modalités ont été testées simultanément, avec les mêmes cellules et les mêmes réglages du cytomètre.



**Figure 24 : Impact du sérum de dialysé sur l'apoptose des CE en culture.**  
 A : Hémodialyse (n=9),  $p=0.0039$ . B : Hémodiafiltration (n=9),  $p=0.3828$ . C : Dialyse sans héparine (n=8),  $p=0.0156$ . L'hémodialyse et la dialyse sans héparine, contrairement à l'hémodiafiltration, induisent un effet pro-apoptotique des sérums de patients prélevés à T30 sur des HUVECs en culture. Test de Wilcoxon.

Le sérum T30 induit une augmentation significative de l'apoptose par rapport au T0, pour les patients sous hémodialyse, mais pas pour les patients en hémodiafiltration. Néanmoins, le sérum des patients dialysés sans héparine, bien que ne présentant pas une augmentation significative du taux de sFlt1 à 30 minutes (Meffray et al., soumis), provoque également une augmentation de l'apoptose (Figure 24).

Par ailleurs, nous avons pré-incubé les sérums avec du VEGF165, dans le but de contrer l'effet anti-angiogénique du sFlt1 pour confirmer son implication dans l'augmentation de l'apoptose. Or, l'ajout de 50ng/ml de VEGF n'induit pas une diminution significative de l'apoptose provoquée par le sérum T30 ( $p=0.625$ ) (Figure 25). Une concentration de 100ng/ml a également été testée, pour un même résultat (données non présentées). Néanmoins, il n'est pas à exclure que le taux de sFlt1 très élevé mesuré dans ces sérums ne puisse être contré par le VEGF à des concentrations physiologiques.



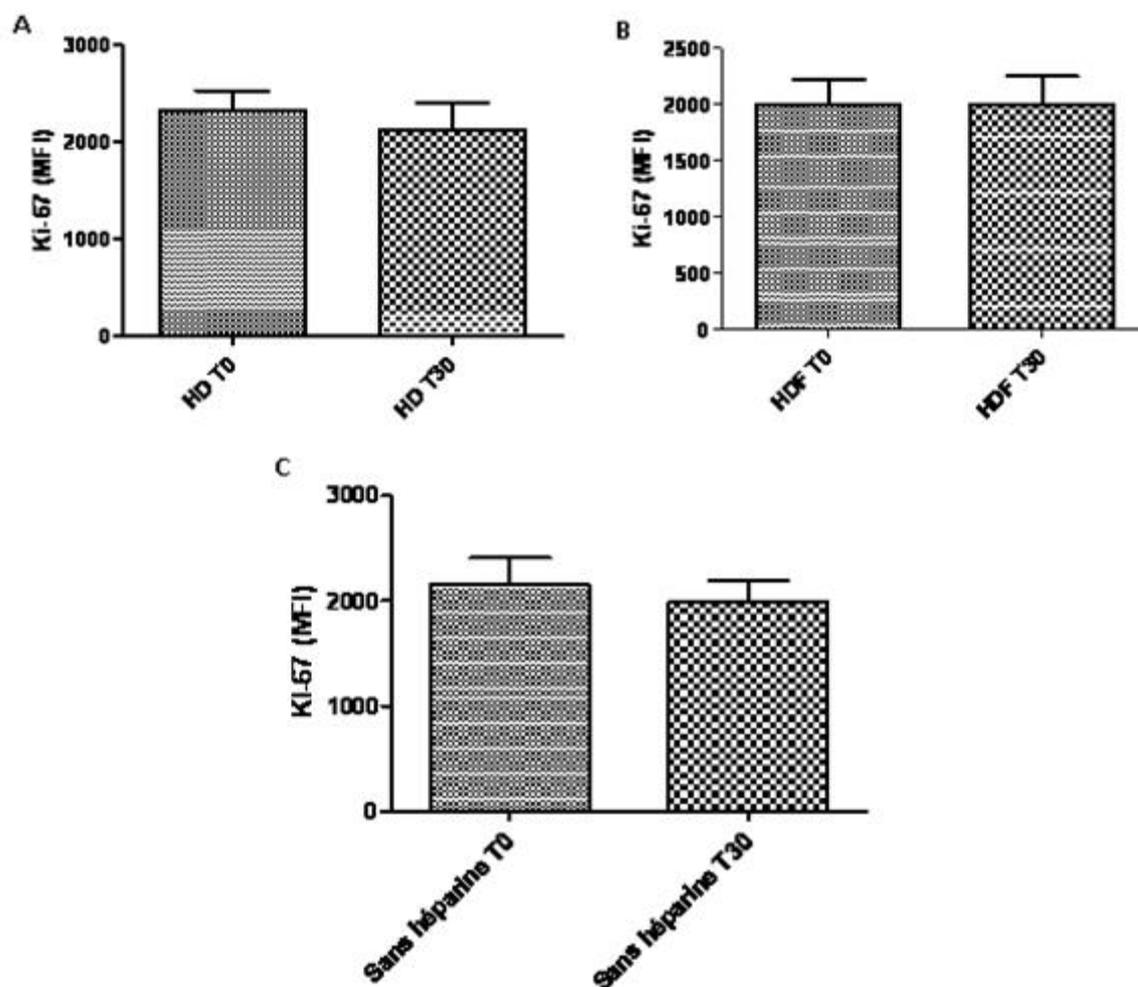
**Figure 25 : Effet du VEGF sur l'induction de l'apoptose par le sérum T30 d'hémodialysé**

*Le VEGF ne permet pas de réduire de façon significative l'effet pro-apoptotique des sérums de dialysés sur les HUVECs en culture ( $p=0.625$ ), test de Wilcoxon*

Ces données montrent donc un effet anti-angiogénique des sérums de patients sous hémodialyse. En revanche, elles ne suffisent pas à confirmer la responsabilité du sFlt1, puisque cet effet est retrouvé avec les sérums de patients sous dialyse sans héparine (n'induisant pas d'augmentation du taux de sFlt1), et que des doses élevées de VEGF ne parviennent pas à compenser leur action anti-angiogéniques

Enfin, après évaluation de l'apoptose, nous avons observé l'impact des sérums de patients sur la prolifération (pour un patient donné, le même sérum a été testé pour l'apoptose et la prolifération). Pour ce faire les cellules ont été marquées au Ki-67. Aucune différence

significative n'a été constatée entre les cellules traitées avec les sérums T0 et celles traitées avec les sérums T30, quelle que soit la technique de dialyse (Figure 26).



**Figure 26 : Impact du sérum de dialysé sur la prolifération des CE en culture**  
 A : Hémodialyse (n=6),  $p=0.5625$ . B : Hémodiafiltration (n=6),  $p=0.4375$ . C : Dialyse sans héparine (n=5),  $p=0.4375$ . Aucune technique de dialyse ne modifie l'impact des sérums de patients sur la prolifération des HUVECs en culture. Test de Wilcoxon

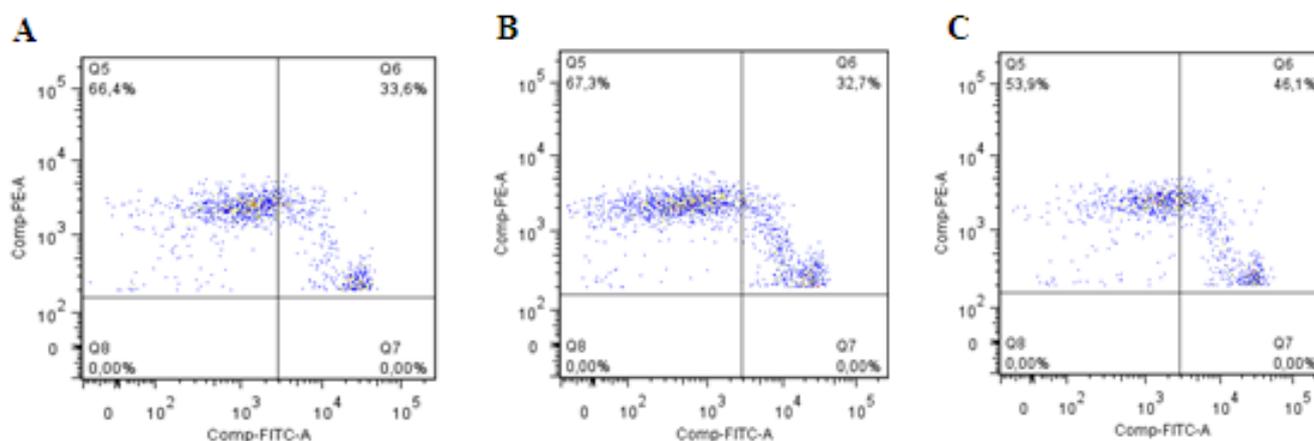
### 1.3. Dialyse : quelles sources pour le sFlt1 ?

Les résultats obtenus *in vivo* soulèvent la question de l'origine du sFlt1. Si certains arguments jouent en faveur d'une origine endothéliale (impact de l'héparine sur les CE et effets de la membrane coâtée à l'héparine), d'autres semblent indiquer plutôt une provenance des monocytes (précocité de la sécrétion). Nous proposons et testons ici deux hypothèses pouvant expliquer l'augmentation rapide de sFlt1 au cours de la dialyse.

### 1.3.1. Cellules CD14+/CD16+

Une équipe s'est intéressée à une population de monocytes en particulier et à son comportement au cours de la dialyse, celle des CD14+/CD16+. En effet, la dialyse s'accompagne d'une inflammation chronique ; or les CD14+/CD16+ présentent des propriétés pro-inflammatoires supérieures à celles des CD14+/CD16- (Ramirez et al., 2007). D'autre part, il a été démontré que les monocytes et les neutrophiles subissaient une séquestration par le dispositif de dialyse dans les premières dizaines de minutes de la séance de dialyse (Sester et al., 2001). Sester et al. ont donc évalué la proportion de ces cellules au cours de la dialyse, et observé une forte diminution de leur proportion dès les dix premières minutes, avec un retour à leur taux initial après deux heures. Ces cellules sont donc plus capturées et retenues que les CD14+/CD16- (Sester et al., 2001).

Nous avons alors émis l'hypothèse que ces cellules pouvaient être responsables de la sécrétion accrue de sFlt1, et avons quantifié leur présence au cours des deux premières heures de dialyse pour trois patients sous hémodialyse classique (Figure 27).



**Figure 27 : Exemple représentatif de l'évolution de la proportion de CD14+/CD16+ À T0 (A), 1h (B) et 2h (C) de dialyse (n=3). PE : anti-CD16 ; FITC : anti-CD14**

Néanmoins, nous n'avons pas observé la diminution de cette population montrée par Sester et al (Sester et al., 2001). Rien ne permet donc de penser que les CD14+/CD16+ jouent un rôle particulier dans la sécrétion de sFlt1, et si rien ne permet non plus de l'exclure, ce n'est en tout cas pas lié à une séquestration préférentielle de ces cellules.

### 1.3.2. Microparticules

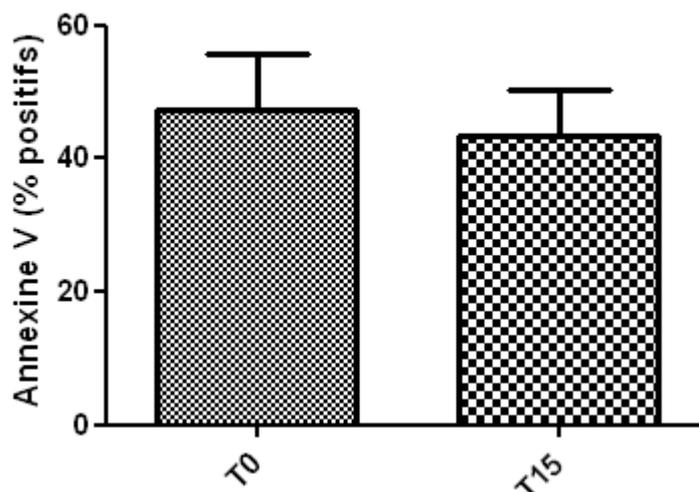
Les microparticules (MP) sont des vésicules formées par des fragments de membrane et libérées suite à l'activation ou à l'apoptose de différents types cellulaires tels que les neutrophiles, les plaquettes ou encore les EC (Mercier et al., 2001). De ce fait, les MP présentent une grande variété de molécules en surface, mais également le VEGFR1, lequel peut être détecté par les ELISA spécifiques du sFlt1 (Lok et al., 2008).

Nous avons donc souhaité déterminer si l'augmentation soudaine de sFlt1 que nous avons observée dans le sérum des patients dialysés pouvait être imputée à une forte libération de MP produites par les leucocytes ou les EC au passage de la membrane.

Pour cette partie de l'étude cependant, les patients étaient soumis, suite aux résultats précédents, à une hémodialyse sans rinçage préalable à l'héparine, afin de limiter l'induction d'un état anti-angiogénique délétère. Cette procédure limitant la sécrétion de sFlt1 (de l'ordre de 700pg/ml à T15 pour les patients étudiés), nous avons donc tenu compte de cette modification dans l'analyse de nos résultats, sans toutefois souhaiter revenir aux modalités de dialyse antérieure.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer la présence de ces MP dans les sérums de patients dialysés. Pour cela, nous avons donc effectué des prélèvements à T0 et T15 chez des patients en hémodialyse, puis isolé les MP par centrifugations successives, et analysé par cytométrie les marqueurs qu'elles présentaient. En effet, la libération des MP s'accompagne d'une perte de la symétrie de la membrane plasmique, et donc de l'apparition de phosphatidylsérines en surface : ces dernières permettent la détection des MP en cytométrie à l'aide de l'Annexine V couplée à un fluorochrome.

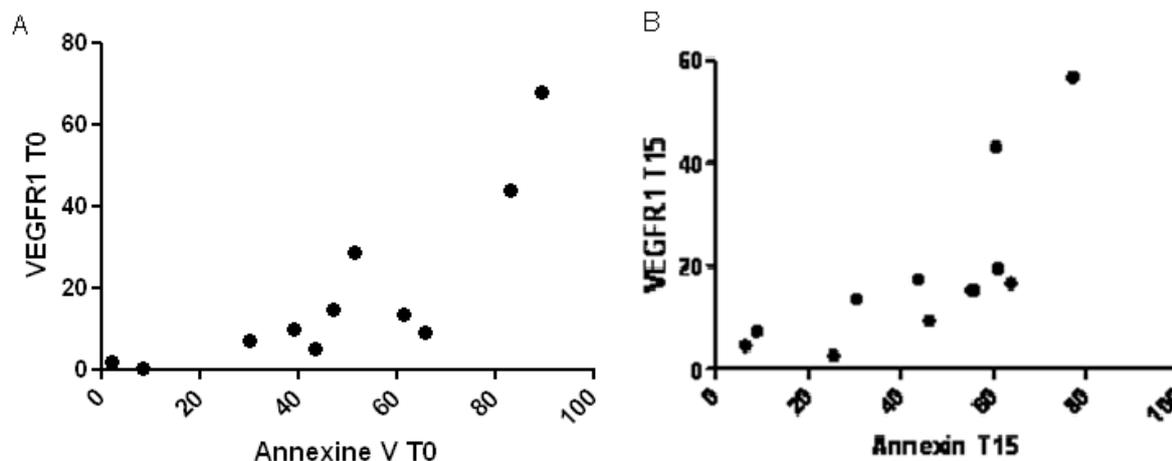
Nous avons ainsi observé la présence de MP à T0. Cependant, le taux de MP n'était pas augmenté de manière significative entre T0 et T15 (Figure 28).



**Figure 28 : Quantification des MP à T0 et T15**  
 Test de Wilcoxon  $p=0.3981$  ( $n=11$ )

Dans un second temps, nous avons étudié la provenance des MP à travers les marqueurs exprimés. Les MP exprimant le CD14+, donc venant des monocytes, représentent respectivement 1.34% et 2.51% des Annexines V+ à T0 et T15 ; celles exprimant le CD41+, marqueur des plaquettes, constitue 26.62% et 26.12% ; quant aux MP issues des CE, de manière surprenante, elles ne représentent que 0.09% et 0.1%. De plus, les variations observées dans les proportions des différents types de MP entre T0 et T15 ne sont pas significatives.

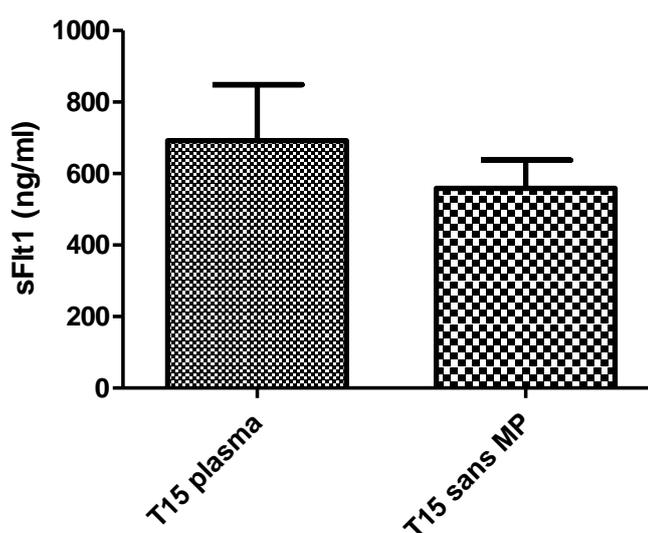
L'analyse de l'expression du VEGFR1 et de l'Annexine V en surface des MP montre une corrélation entre les deux éléments à T15, ce qui confirme l'expression du VEGFR1 par les MP. Un résultat similaire est observé pour les MP à T0 (Figure 29).



**Figure 29 : Expression de VEGFR1 et de l'Annexine V par les MP**  
 À T0 (A),  $p=0.0022$  ; à T15 (B),  $p= 0.0018$ . Test de Spearman ( $n=11$ )

De la même façon, l'expression du VEGFR1 sur chaque type de MP n'augmente pas entre T0 et T15 (respectivement 0.94% et 1.04% pour les CD14+/VEGFR1+ et 2.13% et 1.89% pour les CD41+/VEGFR1+).

Enfin, nous avons cherché à déterminer si ces MP observées étaient responsables de l'augmentation de sFlt1 détectée dans le plasma des patients dialysés. Pour cela, nous avons comparé les taux de sFlt1 (mesuré par ELISA) dans le plasma de quatre patients à T15 avant et après élimination des MP par centrifugation.



**Figure 30 : Comparaison de la concentration en sFlt1 entre le plasma de dialysé sans MP et le plasma « complet »**  
 Plasmas prélevés à T15 et centrifugés ou non pour éliminer les MP ( $n=4$ )

Ainsi, nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative entre le taux de sFlt1 dans le plasma dépourvu de MP et celui du plasma contenant les MP (692.09ng/ml pour le plasma avec MP versus 558.93ng/ml pour le plasma sans MP) (Figure 30). Ces résultats semblent donc invalider l'hypothèse que les MP représentent une part significative du sFlt1 détecté dans le plasma. Cependant, ils n'ont été réalisés que sur quatre patients et il serait intéressant d'augmenter la cohorte afin de pouvoir confirmer ou non ces résultats.

En conclusion, l'hémodialyse provoque chez les patients une hausse rapide et quantitativement importante du taux de sFlt1. Cette hausse est liée à l'injection d'héparine systémique et peut être limitée par différentes stratégies, en supprimant l'héparine non fractionnée pour le pré-rinçage des circuits ou en employant une membrane greffée à l'héparine.

Bien que les CE ne présentent pas d'activation *in vivo* dans le temps de la dialyse, le sérum de patient *in vitro* présente un effet anti-angiogénique en induisant l'apoptose de CE en culture. Cet effet ne peut cependant être imputé au seul sFlt1, dans la mesure où il n'est pas aboli par l'ajout de VEGF, et où des sérums contenant un taux réduit de sFlt1 (prélevé sur des patients soumis à une dialyse sans héparine) induisent un effet similaire.

Dans un troisième temps, différentes hypothèses ont été testées quant aux sources potentielles du sFlt1. Les sérums de patients induisent une libération de sFlt1 par des monocytes en culture après 16h d'incubation. En revanche, l'héparine échoue à induire la sécrétion de sFlt1 par les monocytes de témoins sains et de patients dialysés, quel que soit le temps d'incubation. Nous avons évalué la présence des CD14+/CD16+, une sous-population de monocytes décrite dans la littérature comme préférentiellement séquestrée par la membrane de dialyse et particulièrement pro-inflammatoire, avec l'hypothèse qu'elle pouvait être impliquée dans la sécrétion de sFlt1, mais nous n'avons pas observé de diminution de sa proportion par rapport à la population totale de monocytes. Enfin, nous avons quantifié la libération de MP par différentes populations de cellules (CE, monocytes et plaquettes) et tenté de déterminer si elles pouvaient être à l'origine de la totalité ou d'une partie du sFlt1 sécrété, mais les résultats se sont avérés non concluants. La source du sFlt1 au cours de la dialyse reste donc à déterminer.

## 2. sFlt1 et greffe rénale

### 2.1. Impact du sFlt1 sur le délai de reprise de fonction du greffon (DGF)

#### **Increased soluble Flt-1 correlates with delayed graft function and early loss of peritubular capillaries in the kidney graft**

*M. Chapal, M. Néel, F. Le Borgne, E. Meffray, O. Carceles, M. Hourmant, M. Giral, Y. Foucher, A. Moreau and F. Fakhouri.*

#### **Transplantation, 2013**

Cette étude vise à déterminer les facteurs susceptibles d'influer sur la sécrétion de sFlt1 suite à une greffe de rein, et à évaluer l'impact du sFlt1 dans le succès de la greffe, et notamment le délai de reprise de fonction du greffon (Delayed Graft Function, DGF).

Nous avons dans un premier temps mesuré les taux plasmatiques de sFlt1 chez 136 patients ayant reçu une greffe à partir de donneurs vivants ou décédés (cœurs arrêtés ou non). Ces taux ont été mesurés avant la greffe puis à J1, J3, J7 et jusqu'à trois mois après l'intervention. Nous avons ainsi pu mettre en évidence une augmentation du taux de sFlt1 maximale autour de J3 et J7, d'environ 2.5 fois le taux de sFlt1 basal.

Une analyse multivariée a démontré une corrélation entre le taux maximum de sFlt1 sérique mesuré chez les patients et la DGF ; le taux de sFlt1 est également corrélé, selon une analyse univariée, à une baisse des capillaires péritubulaires (CPT) après 3 mois de greffe.

Cette augmentation est variable selon le type de donneur : trois catégories ont été comparées : les donneurs vivants, les donneurs à cœur battant et les donneurs à cœur non battant. Les donneurs vivants induisaient une sécrétion de sFlt1 inférieure à celle des donneurs à cœur battant, elle-même inférieure à celle des donneurs à cœur arrêtés. Ceci démontre un impact de l'ischémie-reperfusion sur la libération de sFlt1. En revanche, cette dernière n'est pas corrélée à la durée de l'ischémie froide.

Nous avons ensuite voulu déterminer la source de sFlt1. Pour cela, nous avons analysé la sécrétion de sFlt1 par des monocytes isolés à partir du sang de patients après trois jours de greffe et nous avons observé une sécrétion basale de sFlt1 plus de sept fois supérieure à celle de monocytes issus de donneurs sains (35pg/ml contre 4.5pg/ml en moyenne).

La DGF et la baisse des CPT étant prédictives de la fonction du greffon à long terme, ces résultats pourraient avoir des implications thérapeutiques : l'inhibition du sFlt1 pourrait permettre une amélioration de la fonction du greffon rénal à court et long terme.

Increased soluble Flt-1 correlates with delayed graft function and early loss of peritubular capillaries in the kidney graft.

M. Chapal<sup>1</sup>, M. Néel<sup>1</sup>, F. Le Borgne<sup>2</sup>, E. Meffray<sup>1</sup>, O. Carceles<sup>1</sup>, M. Hourmant<sup>1</sup>, M. Giral<sup>1</sup>, Y. Foucher<sup>1,2</sup>, A. Moreau<sup>3</sup> and F. Fakhouri<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>ITUN, Department of Nephrology and Immunology, UMR S-1064, <sup>2</sup>SPHERE (bioStatistics, Pharmacoepidemiology and Human sciEnces Research) Laboratory – EA 4275, LabEx Transplantex, Nantes University and <sup>3</sup> Department of Pathology, CHU de Nantes, Nantes, France.

Running head: sFlt1 and delayed graft function.

Word count: abstract 211; text 2997.

Number of tables: 1.

Number of figures: 4.

Key words: ischemia reperfusion, vascular repair, delayed graft function, VEGF.

Corresponding author:

Fadi Fakhouri

INSERM U643, ITUN, Université de Nantes and Nephrology Department CHU de Nantes, Nantes, France.

Telephone: 0033240087437

Fax: 0033240084660

E-mail: [fadi.fakhouri@univ-nantes.fr](mailto:fadi.fakhouri@univ-nantes.fr)

**Abbreviations:**

I/R: ischemia-reperfusion.

RT: renal transplantation.

DCD: donation after cardiac death.

DGF: delayed graft function.

sFlt-1: soluble Fms like tyrosine kinase 1.

PRA: panel reactive antibodies.

LD: living donor.

DBD: donation after brain death.

PTC: peritubular capillaries.

**Abstract**

**Background:** Ischemia-reperfusion (I/R) induces tubular and endothelial damage in the renal graft and leads to delayed graft function (DGF) and to an early loss of peritubular capillaries (PTC). Few, if any, clinical studies have assessed the impact of pro and antiangiogenic factors on endothelial repair during renal-transplantation (RT)-related I/R.

**Methods:** We prospectively assessed the kinetics of the antiangiogenic factor, sFlt-1, in 136 consecutive RT patients and analyzed sFlt1 impact on DGF and PTC loss.

**Results:** sFlt-1 plasma levels increased by 2-3 fold throughout the first week after RT. This increase was more marked in recipients of grafts from deceased donors compared to living donors. Patients with a DGF had higher sFlt1 levels at all time-points during the first 7 days after RT and a higher peak sFlt1 compared to those without DGF. In multivariate analysis, a peak plasma sFlt1  $\geq 250$  pg/ml was associated with 2.5-fold increase in the risk of DGF ( $p=0.04$ ). Similarly, patients with a peak plasma sFlt1  $\geq 250$  pg/ml had a more pronounced early decrease in PTC compared to those with a peak sFlt1  $< 250$  pg/ml.

**Conclusions:** sFlt-1 is a new non-immunological independent risk factor for DGF and PTC loss. Its inhibition may help improve the outcome of RT.

## Introduction

Ischemia-reperfusion (I/R) injury is a common complication of organ transplantation. In the setting of renal transplantation (RT), I/R is associated mainly to delayed graft function (DGF). DGF occurs with a variable clinical severity in 2 to 50% of renal allografts, depending on the type of donors and treatment strategies<sup>1</sup>. DGF is commonly defined by the need for dialysis within the first week after RT, assuming that the other causes of non-immediate graft function have been excluded<sup>2</sup>. DGF is known to be an independent risk factor for acute rejection, impaired renal function at one year post RT and decreased long-term graft from DBD donors and recipient survival, in addition to its economic burden due to prolonged hospitalization and dialysis requirement<sup>3-5</sup>.

I/R and the associated excess risk of DGF arise from immunologic and non-immunologic factors related to the activation of a cascade of molecular events: activation of endothelial cells with increased expression of adhesion molecules, increased adherence of leucocytes (particularly monocytes/macrophages) to the endothelium and activation of the coagulation and complement systems<sup>6, 7</sup>. The final renal consequences are tubular and endothelial cellular injury. While acute tubular necrosis is potentially completely reversible, endothelial repair is usually, for ill-defined reasons, incomplete. The mechanisms underlying the impaired endothelial cells repair following renal I/R, particularly in the setting of RT, remain ill-defined. While the immunological factors involved in renal I/R injury have attracted a substantial body of work, few data regarding the non-immunological factors are available. For instance, the implication of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), the most potent growth factor of endothelial cells<sup>8</sup> in human renal I/R, has not been fully addressed. The pro-angiogenic effect of VEGF, which promotes the survival and regeneration of endothelial cells, is mediated mainly through the VEGF receptor 2 (VEGF-R2). In contrast, the role of VEGF-R1 remains uncertain. A soluble form of VEGF-R1, sFlt-1 (soluble Fms like tyrosine kinase

1), is released by endothelial cells, trophoblastic cells and monocytes via an alternative splicing of VEGF-R1 transcript and, possibly, through the cleavage and shedding of membrane-bound VEGF-R1<sup>9</sup>. sFlt-1 binds to VEGF and thus exerts potent anti-angiogenic effect. The pathogenic roles of sFlt-1 have been previously documented in preeclampsia<sup>10, 11</sup> and more recently in chronic<sup>12</sup> and acute renal disease<sup>13</sup>. Moreover, accumulating data have linked an increased release of sFlt-1 to complement<sup>14</sup> and monocytes<sup>15</sup> activation, both of which occur during renal I/R<sup>16, 17</sup>. In the present study, we prospectively assessed the kinetics of sFlt-1 in the setting of post RT-related I/R and its impact on DGF and renal vascular repair in the renal graft.

## Results

Characteristics of the 136 patients included in the study are described in table S1 and in figure S1 (supplementary data).

### **sFlt-1 plasma levels are increased during the first week post RT.**

In all included patients, plasma sFlt-1 increased starting day 1 after RT (253.2 (49-1492) pg/ml) and throughout day 3 (266.5 (44-1380) pg/ml) and day 7 (227.0 (29-1001) pg/ml), compared to baseline (109.3 (29-333) pg/ml) ( $p < 0.0001$ ) (figure 1). The mean peak sFlt-1 level during the first seven days after RT was 349.5 (68-1492) pg/ml. In 29 tested patients, sFlt-1 levels decreased by day 14 (168.3 (73-548) pg/ml) and returned to baseline levels by day 21 (data not shown).

Maximal sFlt1 levels during the first seven days varied according to the donor's age (243.0 (68-1001) pg/ml for donors aged  $< 40$  years v/s 369.5 (221-1492) for donors aged  $\geq 40$  y;  $p = 0.03$ ) and the type of the donor, being the lowest in LD (235.7 (59-724) pg/ml) compared to DBD (344 (68-1492) pg/ml,  $p < 0.001$ ) and DCD (408.9 (213-1001) pg/ml;  $p < 0.001$ , figure 1). In contrast, peak sFlt1 level was not significantly associated with the duration of cold ischemia, the history of cardiovascular events in the donor or the recipient or the use of dialysis before RT ( $p > 0.05$ ).

### **sFlt-1 plasma levels decrease after kidney donation in LD**

We further assessed whether the increase in circulating sFlt-1 levels was related to the renal I/R per se and not to the surgery procedure. We assayed plasma sFlt-1 levels before and 2- as well as 4-days after kidney donation in 14 living related donors. sFlt-1 levels didn't increase at any time after kidney donation but tended to decline in time ( 98.7 pg/ml (40-166) before

surgery versus 73.5 pg/ml (27-104) at 2-day and 64.5 pg/ml (22-106) at 4-day ( $p > 0.05$ , figure 2).

### **Monocytes from renal transplant recipients display increased sFlt-1 secretion compared to monocytes from healthy individuals in vitro.**

In order to determine the potential source of sFlt-1 release during RT-related I/R, we compared sFlt-1 concentration in the culture supernatant of monocytes isolated from recently transplanted patients (at day 3) and from healthy individuals. After an incubation of 24 hours, mean sFlt-1 in the supernatant of monocytes from renal transplant recipients ( $n=10$ , 35 (21-56) pg/ml) was higher compared to monocytes from healthy volunteers ( $n=12$ , 4.5 (1-7) pg/ml;  $p= 0.006$ ) (figure S2, supplementary data).

### **sFlt-1 increase correlates with the occurrence of DGF**

Patients' characteristics according to the occurrence or not of DGF are summarized in table S1. Patients with RT from LD ( $n=20$ ) were excluded from the analysis of risk factors for DGF due to their low risk of DGF (figure S1, supplementary data). Thus this analysis was restricted to patients with RT from DBD and DCD ( $n=116$ ). Among the 116 patients included in the analysis, 55 (47.4%) experienced a DGF. Mean plasma sFlt-1 levels were higher in DGF patients compared to those without DGF at 1-day (262.0 (60-1492) pg/ml versus 223.5 (49-1471);  $p < 0.01$ ), 3-day (273.3 (52-1380) pg/ml versus 252.9 (44-1121) pg/ml;  $p > 0.05$ ) and 7-day (269.0 (60-1001) pg/ml versus 162.4 (29-582) pg/ml;  $p < 0.01$ ) post RT (figure 3a). Similarly, the mean peak sFlt-1 level during the first week post RT was higher in DGF patients (394.3 (194-1492) pg/ml) compared to patients without DGF (316.0 68-471 pg/ml; ( $p < 0.01$ ) (figure 3b). Patients with a peak sFlt1  $\geq 250$  pg/ml had a higher risk of DGF compared to those with a peak sFlt1  $< 250$  pg/ml (54.1% versus 28.8%;  $p= 0.008$ ). An

univariate analysis that included 25 established risk factors for DGF (table S2, supplementary data) showed that the risk of DGF was associated with ( $p < 0.20$ ): a pre-RT dialysis duration  $\geq 1.5$  years, a male recipient, a non pre-emptive RT, a non first RT, a donor aged over 55, a male donor, a donor serum creatinine  $\geq 133 \mu\text{mol/l}$ , a DCD, a number of HLA incompatibilities equal to 5 or 6, the use of a perfusion machine and the use of antithymocytes globulins as induction therapy. In multivariate logistic analysis, only a peak plasma sFlt-1 during the first week post RT  $\geq 250 \text{ pg/ml}$ , the implementation of dialysis prior to RT, and RT from DCD were the three risk factors significantly and independently associated with the occurrence of DGF ( $p < 0.05$ , table 1). A peak sFlt1 level  $\geq 250 \text{ pg/ml}$  increased 2.46-fold the risk of DGF (CI 95% from 1.5 to 6.09).

#### **sFlt-1 levels correlate with a reduction of PTC density**

Finally, we assessed the association of increased sFlt-1 and defective endothelial repair in RT-related I/R injury. We analysed the reduction in PTC density during the first 3 months post RT in 42 consecutive DBD RT patients for whom a protocol graft biopsy taken at implantation and at 3-months post RT was available. A mean reduction of 23.8% (0.01 – 45.8) in PTC density was observed ( $p < 0.0001$ ). The reduction in PTC density was more marked in patients with a peak sFlt1  $\geq 250 \text{ pg/ml}$  ( $n=25$ ), compared to those with a peak sFlt1  $< 250 \text{ pg/ml}$  ( $n=17$ ), whether expressed as a mean number of PTC lost (0.36 (0.1-1.12) versus 0.57 (0.01-0.6);  $p = 0.01$ ) or the mean percentage of PTC loss (27.1% (8.7-45.7) versus 18.9% (0.8-30.4);  $p = 0.0078$ ) (figure 4).

In linear regression analysis (table S3, supplementary data), a peak plasma sFlt-1 during the first week post RT  $\geq 250 \text{ pg/ml}$  tended to be associated with the decrease in PTC (3.71 %,  $p=0.21$ ), independently of the other possible confounding factors.

## Discussion

Renal I/R injury is a complex injury process that damages mainly tubular epithelial and endothelial cells. The regeneration of tubular cells is usually virtually complete and occurs through a dedifferentiation and proliferation of surviving tubular cells<sup>18</sup>. In contrast, endothelial damage in the setting of renal I/R injury is only partially reversible and a rarefaction of PTC after renal I/R injury has been documented in several animal<sup>19, 20</sup> as well as in human studies<sup>21</sup>. Vascular rarefaction leads to chronic renal hypoxia which promotes tubulointerstitial fibrosis and long-term renal damage<sup>22</sup>.

I/R injury is manifested at the initial stage of RT by a DGF and by a significant decrease in the density of PTC, that negatively impact the long-term function of the renal graft<sup>3, 21</sup>.

In a striking contrast to other organs, the VEGF system is not activated during renal I/R injury. Data from animal models indicate that VEGF expression is decreased throughout the first 7 days of I/R, a crucial period for vascular repair<sup>23</sup>. The mechanisms underlying the paradoxical repression of the VEGF system during renal I/R injury are not fully understood.

The present study, the first to prospectively address the issue of antiangiogenic factors during the early stages of RT, a unique clinical model of I/R, clearly shows that the serum level of the antiangiogenic factor, sFlt1, is increased by roughly 2-3 fold. This increase starts at day 1 and persists throughout the first 7 days post RT. It is mainly correlated to the type of the donor, being the lowest in recipients of grafts from LR donors and the highest in recipients of grafts from DCD. Two sets of arguments corroborate the fact that sFlt1 increase is related to I/R per se and not to interfering factors such as surgery or immunosuppressive treatments. Firstly, in a rodent model of pure renal I/R induced via the bilateral clamping of renal vessels, a similar increase in serum sFlt1 during the first 7 days after I/R injury has been documented<sup>23</sup>. Secondly, no increase in sFlt1 was detected in living donors after the surgical

procedure of kidney donation. sFlt1 tended rather to decline, in accordance with previous animal data<sup>24</sup>. The reasons of this reduction are unknown.

Monocytes are most probably a major source of sFlt1 release in the setting of renal I/R injury. Monocytes isolated from renal graft recipients secreted in vitro higher levels of sFlt1 compared to monocytes from healthy individuals and sFlt1 release reflects monocyte/macrophage activation<sup>13</sup>. Monocyte/macrophage recruitment and activation in the kidney during I/R have been documented in animal models and in post-reperfusion human renal graft biopsies<sup>17, 25, 26</sup>. Monocyte/macrophage activation and intrarenal infiltration are more pronounced in recipients of grafts harvested in deceased donors (compared to living donors) and in RT patients with DGF, the two groups of patients with the highest levels of sFlt1 in our study. However, activation and apoptosis of endothelial cells, another major source of sFlt1, also occurs during renal I/R<sup>27</sup>. Thus, one cannot exclude that endothelial cells also contribute to the increase in sFlt1 after renal I/R.

The increase in the potent antiangiogenic factor sFlt1, combined to the repression of the proangiogenic VEGF, clearly tip the balance towards a deleterious antiangiogenic state during renal I/R injury, particularly in the setting of RT. However, the causative role of sFlt1 in DGF remains to be established in animal studies.

Nevertheless, our data indicate that increased sFlt1 levels are associated with two main complications of RT-related I/R: DGF and vascular rarefaction.

In the era of new potent immunosuppressive drugs and the ensuing dramatic decrease in the incidence of acute rejection, DGF is currently one of the major obstacles for a successful RT and its incidence is on the rise due to the use of kidney grafts from expanded criteria donors and from DCD. In our study, patients who experienced a DGF had a more pronounced and sustained increase in sFlt1 compared to patients without DGF. Most importantly, in a

multivariate regression analysis that included all established risk factors for DGF, sFlt1 level  $\geq 250$  pg/ml was associated to an increase by roughly 2.5 fold of the risk of DGF.

In univariate analysis, sFlt1 was also associated to an impaired endothelial repair and thus to the early reduction in PTC density during the first three months post RT. In multivariate analysis, this association did not reach statistical significance probably due to the limited number of cases included. A recent study by Steeg et al. et al. has highlighted the prognostic importance of early PTC loss in the renal graft which correlates with interstitial fibrosis and tubular atrophy and inflammation scores in 3-month biopsy and predicts the long-term decline in graft function<sup>21</sup>. The link between the antiangiogenic sFlt1 and PTC loss is corroborated by data from I/R rodent models in which the early (initial 14 days) , but not delayed ( $> 14$  days), restoration of a proangiogenic state through the administration of VEGF121 preserves vascular structure after ischemia and influence the development of chronic kidney disease<sup>28</sup>.

Our data have several implications. Firstly, we have identified a new non-immunological independent risk factor for DGF. These findings highlight the increasingly recognized importance of non-immunological factors in the management of short and long-term complications of RT. sFlt1 increase and the occurrence of DGF are simultaneous and thus sFlt1 can not be used as a predictive marker of DGF. However, the increase in sFlt1 provides new and valuable insights in vascular damage and repair during renal I/R. Secondly, considering that DGF and PTC loss negatively impacts the long-term prognosis of the renal graft, the impact of sFlt1 per se on the long-term evolution of the graft warrants further studies. Thirdly, in contrast to other risk factors associated with DGF and PTC loss, such as donor age or the quality of the renal graft sFlt1 is a potentially amendable risk factor. A proangiogenic state during the crucial initial phase of RT-related IR could be restored through the antagonism/removal of sFlt1. The impact of such strategies on renal I/R remains to be assessed in experimental models and, potentially, in clinical studies, especially in patients at

high risk for DGF. Noteworthy, anti-sFlt1 strategies are currently under development and in a recent study, removal of sFlt1 was achieved using apheresis in preeclamptic women <sup>29</sup>. Our data need to be confirmed in a larger cohort of RT patients. Nevertheless, our findings indicate that a sFlt1-dependent antiangiogenic state occurs during RT-related I/R and is associated with DGF and PTC rarefaction, two major determinants of long-term outcome of the renal graft. The restoration of a proangiogenic state during the crucial initial phase of RT-related I/R may decrease the incidence of DGF and improve the vascular repair and long-term survival of the renal graft.

## **Materials and methods**

### **Study population**

136 consecutive patients who underwent a RT in the Nephrology and Immunology department at the CHU de Nantes, between November 2009 and August 2012, were prospectively included in the study. Adults (> 18 years) with isolated RT, who had given a written informed consent and for whom serum samples were available, were included in the study. The study was approved by the CHU de Nantes ethics committee. The clinical and research activities being reported are consistent with the Principles of the Declaration of Helsinki.

DGF was defined by the need for at least one dialysis session within the first week after RT<sup>7</sup>. For each case, relevant clinical and biological data regarding donors, recipients and RT characteristics were extracted from DIVAT (Données informatisées et Validées en Transplantation, [www.divat.fr](http://www.divat.fr)), a computerized database that includes clinical and biological characteristics of all RT patients at Nantes University Hospital.

### **Soluble Flt-1 sample collection and detection**

Patients' plasma samples (EDTA) were obtained just before RT (day 0) and then at one, three and seven days post RT. For a subgroup consisting of the first 29 recipients, additional plasma samples were collected at 14, 21 days and 1, 2 and 3 months post RT. Soluble Flt-1 plasma levels were measured using commercial ELISA kits (R and D systems, Minneapolis, USA).

### **Human monocytes culture and in vitro production of sFlt-1**

Monocytes from healthy volunteers and from RT patients were isolated from anticoagulated whole blood samples drawn 3 days after RT, using a "Whole Blood CD14 Microbeads human" kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and cultured with RPMI medium

and 10% FCS (Foetal Calf Serum) at 37°C during 72 hours. Supernatants were collected after 24 hours and frozen at -80°C.

### **Quantification of peritubular capillaries (PTC) density in kidney grafts**

PTC density was quantified as previously described<sup>21, 30</sup>. Briefly, paraffin-embedded kidney grafts sections were stained using a murine monoclonal anti-CD34 antibody (Immunotech; dilution 1/150). Each CD34 stained paraffin tissue section was analysed with light microscope (X400) by one blinded expert renal pathologist (AM). Ten images of the renal cortex were obtained per section and PTC were identified by positive CD34 staining. Per image, the number of PTC and tubular sections were counted and the mean number of CD34+ PTC sections per number of tubular sections was calculated for each renal biopsy section

### **Statistical analysis**

All statistical analyses were performed using R version 2.15 (<http://www.R-project.org/>). GraphPad Prism version 4.0 was used for graphic representations. Quantitative variables were presented as means (range) and qualitative variables were presented as the absolute number and the relative frequency of each class. Univariate comparisons of variables distribution between different groups were performed using two-sided one-way ANOVA with Bonferroni-corrected t test, Kruskal-Wallis test or Chi-square statistics. Univariate ( $p < 0.20$ ) and multivariate ( $p < 0.05$ ) logistic regression models were performed for the analysis of DGF probability. As sFlt1 variable didn't respect the log-linearity hypothesis, it was redefined as a two-class variable with the median value (250 pg/ml) used as a threshold. A similar strategy using linear regression models was performed for the analysis of the decrease in PTC density.

## References:

1. Perico, N, Cattaneo, D, Sayegh, MH, Remuzzi, G: Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet*, 364: 1814-1827, 2004.
2. Yarlalagadda, SG, Coca, SG, Garg, AX, Doshi, M, Poggio, E, Marcus, RJ, Parikh, CR: Marked variation in the definition and diagnosis of delayed graft function: a systematic review. *Nephrol Dial Transplant*, 23: 2995-3003, 2008.
3. Giral-Classe, M, Hourmant, M, Cantarovich, D, Dantal, J, Blancho, G, Daguin, P, Ancelet, D, Souillou, JP: Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney Int*, 54: 972-978, 1998.
4. Tapiawala, SN, Tinckam, KJ, Cardella, CJ, Schiff, J, Cattran, DC, Cole, EH, Kim, SJ: Delayed graft function and the risk for death with a functioning graft. *J Am Soc Nephrol*, 21: 153-161.
5. Yarlalagadda, SG, Coca, SG, Formica, RN, Jr., Poggio, ED, Parikh, CR: Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*, 24: 1039-1047, 2009.
6. Boros, P, Bromberg, JS: New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant*, 6: 652-658, 2006.
7. Siedlecki, A, Irish, W, Brennan, DC: Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant*, 11: 2279-2296.
8. Ferrara, N, Gerber, HP, LeCouter, J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9: 669-676, 2003.
9. Rahimi, N, Golde, TE, Meyer, RD: Identification of ligand-induced proteolytic cleavage and ectodomain shedding of VEGFR-1/FLT1 in leukemic cancer cells. *Cancer Res*, 69: 2607-2614, 2009.
10. Levine, RJ, Lam, C, Qian, C, Yu, KF, Maynard, SE, Sachs, BP, Sibai, BM, Epstein, FH, Romero, R, Thadhani, R, Karumanchi, SA: Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med*, 355: 992-1005, 2006.
11. Maynard, SE, Karumanchi, SA: Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol*, 31: 33-46.
12. Di Marco, GS, Reuter, S, Hillebrand, U, Amler, S, Konig, M, Larger, E, Oberleithner, H, Brand, E, Pavenstadt, H, Brand, M: The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol*, 20: 2235-2245, 2009.
13. Le Roux, S, Pepper, RJ, Dufay, A, Neel, M, Meffray, E, Lamande, N, Rimbart, M, Josien, R, Hamidou, M, Hourmant, M, Cook, HT, Charreau, B, Larger, E, Salama, AD, Fakhouri, F: Elevated soluble Flt1 inhibits endothelial repair in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J Am Soc Nephrol*, 23: 155-164.
14. Langer, HF, Chung, KJ, Orlova, VV, Choi, EY, Kaul, S, Kruhlak, MJ, Alatsatianos, M, Deangelis, RA, Roche, PA, Magotti, P, Li, X, Economopoulou, M, Rafail, S, Lambris, JD, Chavakis, T: Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis. *Blood*, 116: 4395-4403.
15. Girardi, G, Yarilin, D, Thurman, JM, Holers, VM, Salmon, JE: Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med*, 203: 2165-2175, 2006.
16. Peng, Q, Li, K, Smyth, LA, Xing, G, Wang, N, Meader, L, Lu, B, Sacks, SH, Zhou, W: C3a and C5a promote renal ischemia-reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol*, 23: 1474-1485.
17. Sadeghi, M, Daniel, V, Naujokat, C, Schmidt, J, Mehrabi, A, Zeier, M, Opelz, G: Decreasing plasma soluble IL-1 receptor antagonist and increasing monocyte activation early post-transplant may be involved in pathogenesis of delayed graft function in renal transplant recipients. *Clin Transplant*, 24: 415-423.
18. Lin, F, Moran, A, Igarashi, P: Intrarenal cells, not bone marrow-derived cells, are the major source for regeneration in postischemic kidney. *J Clin Invest*, 115: 1756-1764, 2005.
19. Basile, DP, Donohoe, D, Roethe, K, Osborn, JL: Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function. *Am J Physiol Renal Physiol*, 281: F887-899, 2001.

20. Lee, SY, Horbelt, M, Mang, HE, Knipe, NL, Bacallao, RL, Sado, Y, Sutton, TA: MMP-9 gene deletion mitigates microvascular loss in a model of ischemic acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 301: F101-109.
21. Steegh, FM, Gelens, MA, Nieman, FH, van Hooff, JP, Cleutjens, JP, van Suylen, RJ, Daemen, MJ, van Heurn, EL, Christiaans, MH, Peutz-Kootstra, CJ: Early loss of peritubular capillaries after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*, 22: 1024-1029.
22. Basile, DP, Donohoe, DL, Roethe, K, Mattson, DL: Chronic renal hypoxia after acute ischemic injury: effects of L-arginine on hypoxia and secondary damage. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284: F338-348, 2003.
23. Basile, DP, Friedrich, K, Chelladurai, B, Leonard, EC, Parrish, AR: Renal ischemia reperfusion inhibits VEGF expression and induces ADAMTS-1, a novel VEGF inhibitor. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294: F928-936, 2008.
24. Onoue, K, Uemura, S, Takeda, Y, Somekawa, S, Iwama, H, Imagawa, K, Nishida, T, Morikawa, Y, Takemoto, Y, Asai, O, Soeda, T, Okayama, S, Ishigami, K, Nakatani, K, Kawata, H, Horii, M, Nakajima, T, Akai, Y, Iwano, M, Saito, Y: Reduction of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 plays a significant role in renal dysfunction-associated aggravation of atherosclerosis. *Circulation*, 120: 2470-2477, 2009.
25. Hoffmann, SC, Kampen, RL, Amur, S, Sharaf, MA, Kleiner, DE, Hunter, K, John Swanson, S, Hale, DA, Mannon, RB, Blair, PJ, Kirk, AD: Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*, 74: 916-923, 2002.
26. Sadeghi, M, Daniel, V, Weimer, R, Wiesel, M, Hergesell, O, Opelz, G: Differential early posttransplant cytokine responses in living and cadaver donor renal allografts. *Transplantation*, 75: 1351-1355, 2003.
27. Basile, DP: The endothelial cell in ischemic acute kidney injury: implications for acute and chronic function. *Kidney Int*, 72: 151-156, 2007.
28. Leonard, EC, Friedrich, JL, Basile, DP: VEGF-121 preserves renal microvessel structure and ameliorates secondary renal disease following acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 295: F1648-1657, 2008.
29. Thadhani, R, Kisner, T, Hagmann, H, Bossung, V, Noack, S, Schaarschmidt, W, Jank, A, Kribs, A, Cornely, OA, Kreyssig, C, Hemphill, L, Rigby, AC, Khedkar, S, Lindner, TH, Mallmann, P, Stepan, H, Karumanchi, SA, Benzing, T: Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation*, 124: 940-950.
30. Kaukinen, A, Lautenschlager, I, Helin, H, Karikoski, R, Jalanko, H: Peritubular capillaries are rarefied in congenital nephrotic syndrome of the Finnish type. *Kidney Int*, 75: 1099-1108, 2009.

	OR	CI 95%	p value
<b>Peak sFlt1 D 1-7</b>			
< 250 pg/ml	1.00		
≥ 250 pg/ml	2.46	[1.5-6.09]	0.04
<b>Dialysis use prior to RT</b>			
No	1.00		
PD	90.01	[8.63-2977.27]	0.0012
HD	54.40	[8.44-1456.53]	0.001
<b>DCD</b>			
No	1.00		
Yes	19.62	[2.8 -458.8]	0.0144

Table 1: In multivariate regression analysis, a peak sFlt1 level  $\geq 250$  pg/ml during the first 7 days after renal transplantation (RT), the use of dialysis prior to renal transplantation and a donation after cardiac death (DCD) were associated with the occurrence of delayed graft function (DGF).

OR, odds ratio, CI, confidence interval.

## Figures Legends:

## Figure 1:

Upper panel: sFlt1 plasma levels increased starting day 1 after renal transplantation (RT) and this increase was sustained throughout the first 7 days after RT. Serum sFlt1 levels returned to baseline levels at day 21.

Plasma (EDTA) was obtained in 136 consecutive patients undergoing renal transplantation (RT) before (Do) and 1, 3 and 7 days after RT. For the first 29 patients, samples were also obtained at day 14, 21 and at 1, 2 and 3 months after RT. Plasma sFlt1 levels were assayed using ELISA.

\*, \*\*, \*\*\*:  $p < 0.0001$  versus Day 0. D, day. M, month.

Lower panel: Peak sFlt1 plasma levels during the first 7 days after renal transplantation (RT) were significantly lower in patients with living donor (LD)-RT (n=20) compared to RT from donation after brain death (DBD) (n=112) or donation after cardiac death (DCD) (n=14)-RT.

\*:  $p < 0.001$ , \*\*:  $p < 0.001$  versus LD.

Figure 2: In contrast to renal transplant recipients, sFlt1 serum levels tended to decrease in living donors in the 4 days following kidney donation.

Plasma (EDTA) samples were collected in 14 consecutive kidney donors before (Do) and 2 and 4 days after kidney donation.

The difference between the three groups was not statistically significant.

Figure 3: Patients with delayed graft function (DGF) (n=55) had higher serum levels at all time-points during the first 7 days after renal transplantation compared to patients without DGF (n=61) (panel a). Patients with DGF also had a higher peak sFlt1 level compared to patients without DGF (panel b).

\*, \*\*:  $p < 0.01$  for DGF+ versus DGF-.

\*:  $p < 0.01$ .

Figure 4: Compared to patients with a peak sFlt1 level  $< 250$  pg/ml, patients with a peak sFlt1  $\geq 250$  pg/ml had a more pronounced decrease in the density of peritubular capillaries (PTC) (mean number of PTC lost (panel a) and the percentage of PTC loss (panel b)) in the kidney graft biopsy performed 3 months after renal transplantation (RT) as compared to the biopsy taken at implantation. Illustrative pictures of a moderate (P1) and a marked (P2) decrease in PCT density in the graft biopsy performed 3 months post RT are shown in panel c. Areas with a complete disappearance of PTC (\*) were present in patients with severe PTC loss. \*:  $p = 0.01$ . \*:  $p = 0.007$ .

**Table 1**

	All (n=136)	DGF – (n=81)	DGF+ (n=55)	pvalue
<b>Recipient</b>				
Age (y)	51.8 ± 14.1	52.7 ± 14.3	50.6 ± 13.8	0.39
Gender				0.16
male	87 (64%)	48 (59%)	39 (71%)	
female	49 (36%)	33 (41%)	16 (29%)	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.8 ± 4.6	24.7 ± 4.6	25 ± 4.7	0.67
Dialysis duration prior to RT (y)	2.4 ± 3.5	1.7 ± 3.3	3.3 ± 3.6	0.008
pre-emptive RT	36 (26.5%)	35 (43.2%)	1 (1.8%)	0.0000
PD	11 (8.1%)	6 (7.4%)	5 (9.1%)	
HD	89 (65.4%)	40 (49.4%)	49 (89.1%)	
Rank of RT				0.07
1st	111 (81.6%)	70 (86.4%)	41 (74.5%)	
≥2nd	25 (18.4%)	11 (13.6%)	14 (25.5%)	
Anti-class I PRA + (%)	9.3 ± 21.8	7.6 ± 19.8	11.6 ± 24.4	0.31
Anti-class II PRA + (%)	11.4 ± 27	8.8 ± 23.7	15.3 ± 31.1	0.19
<b>Donor</b>				
Age (y)	54.7 ± 16.4	54.7 ± 18.5	54.6 ± 12.8	0.95
Gender				0.06
male	81 (59.6%)	43 (53.1%)	38 (69.1%)	
female	55 (40.4%)	38 (46.9%)	17 (30.9%)	
Cause of death				0.9607
vascular	59 (43.4%)	35 (43.2%)	24 (43.6%)	
others	77 (56.6%)	46 (56.8%)	31 (56.4%)	
LD	20 (14.8%)	20 (24.6%)	0	0.005
DCD	14 (10.3%)	1 (1.2%)	13 (23.6%)	0.0001
Final SCr (µmol/l)	90.6 ± 45.9	84.3 ± 41.4	99.9 ± 50.8	0.06
Dobutamine treatment	5 (3.7%)	5 (6.2%)	0	0.08
Epinephrine treatment	28 (20.6%)	13 (16%)	15 (27.3%)	0.11
Norepinephrine treatment	97 (71.3%)	60 (74.1%)	37 (67.3%)	0.39
<b>RT</b>				
Cold ischemia duration (h)	17.1 ± 8.1	16.3 ± 8.0	18.2 ± 8.3	0.19
Induction therapy *				0.01
depleting antibodies	54 (39.7%)	25 (30.9%)	29 (52.7%)	
non-depleting antibodies	82 (60.3%)	56 (69.1%)	26 (47.3%)	
Nb HLA-A, -B, -DR mismatches	3.1 ± 1.4	3.1 ± 1.3	3.3 ± 1.6	0.46
Use of a perfusion machine	18 (13.2%)	5 (6.2%)	13 (23.6%)	0.003

Figure 1

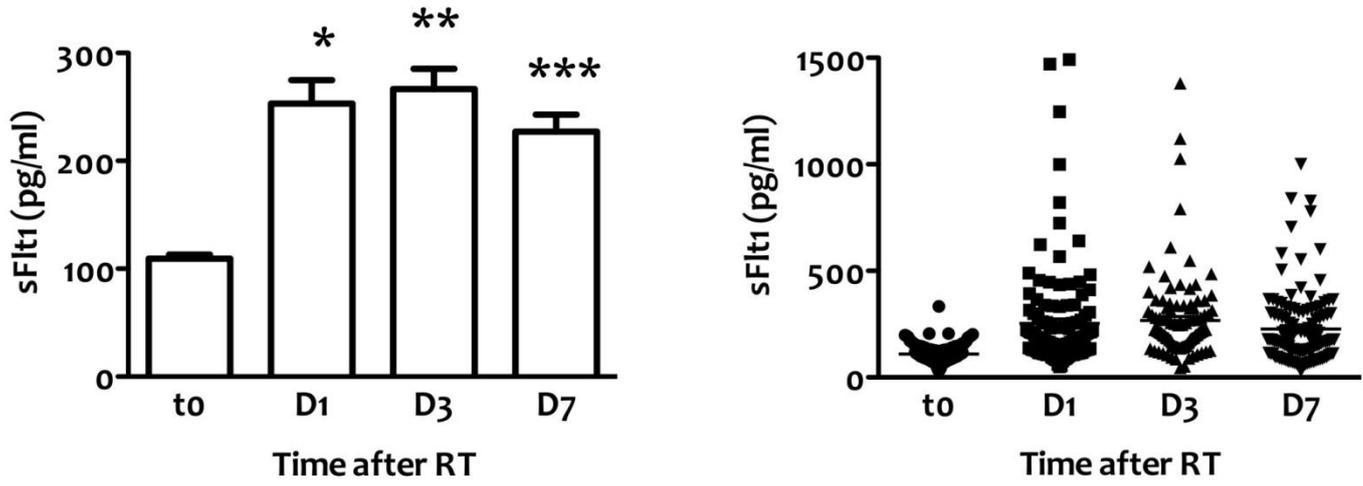


Figure 2

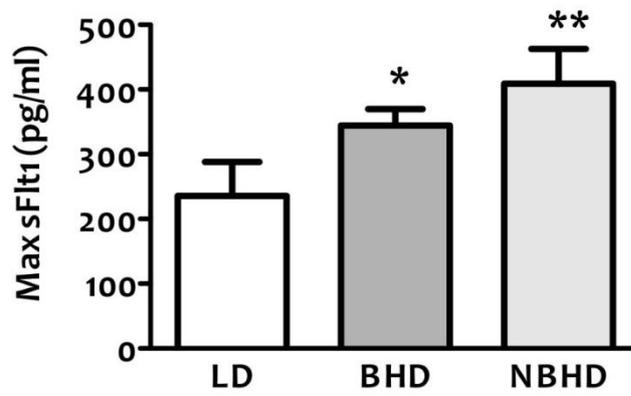


Figure 3

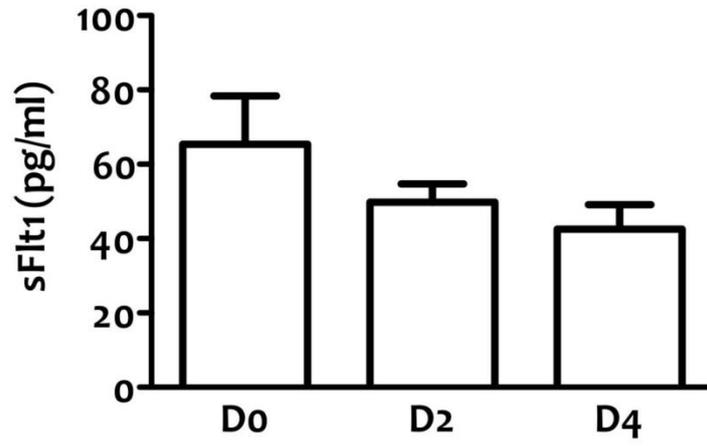


Figure 4

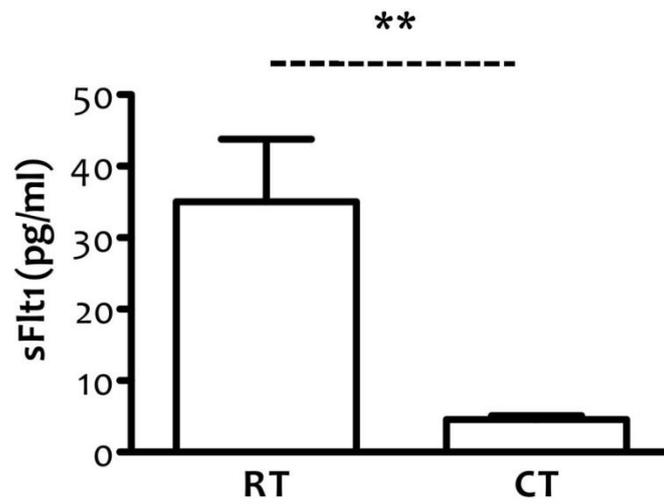


Figure 5

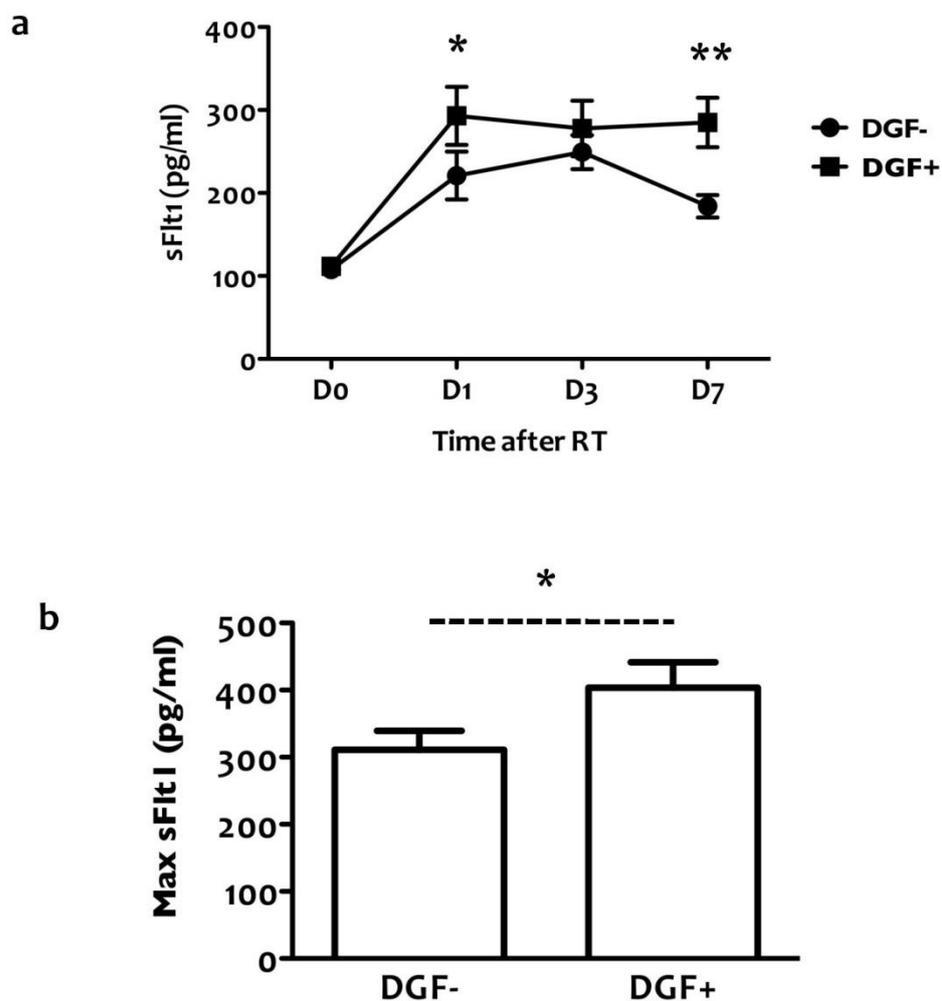
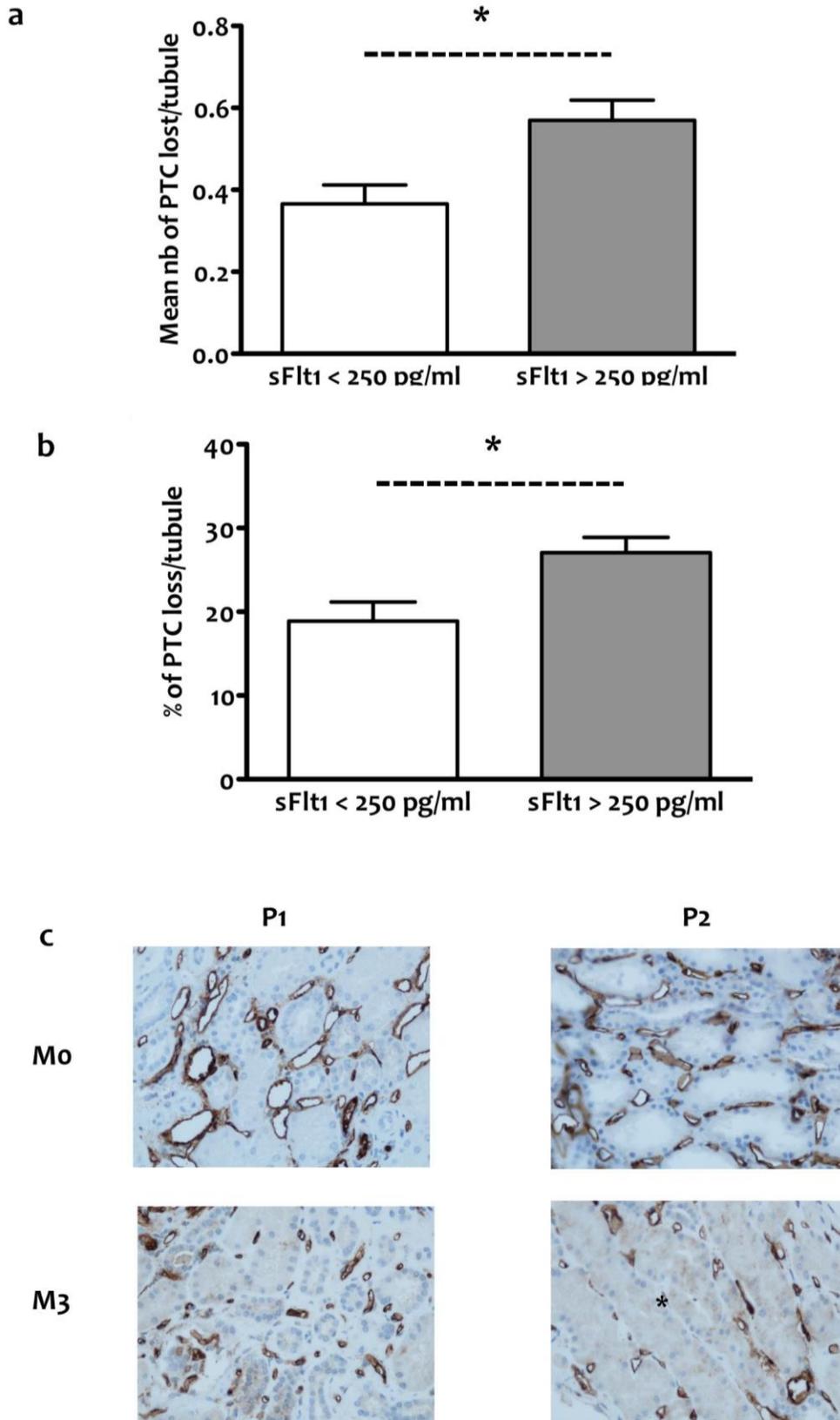


Table 2

	OR	CI 95%	p value
<b>Peak sFlt1 D 1-7</b>			
< 250 pg/ml	1.00		
≥ 250 pg/ml	2.46	[1.5-6.09]	0.04
<b>Dialysis use prior to RT</b>			
No	1.00		
PD	90.01	[8.63-2977.27]	0.0012
HD	54.40	[8.44-1456.53]	0.001
<b>DCD</b>			
No	1.00		
Yes	19.62	[2.8 -458.8]	0.0144

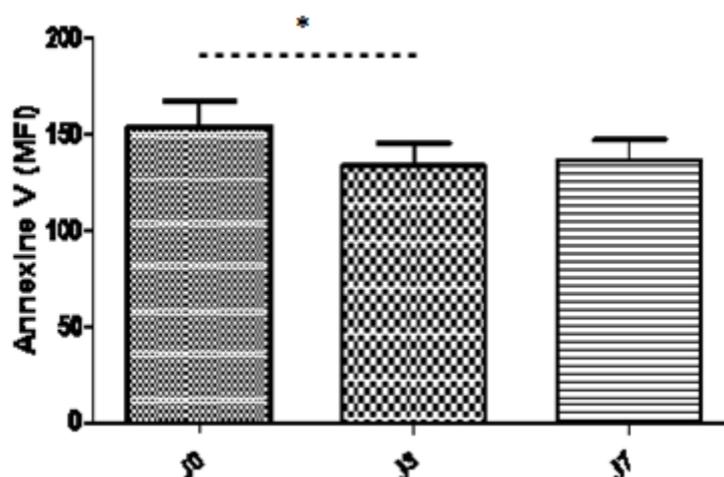
Figure 6



## 2.2. sFlt1 et greffe rénale : un contexte anti-angiogénique ?

Suite à ces travaux, nous avons souhaité déterminer l'impact des sérums de patients greffés sur la survie et la prolifération des HUVECs en culture, comme nous l'avons fait pour les patients de dialysés, afin de déterminer si l'augmentation de sFlt1 observée dans ce cadre, quoique moins élevée, induisait des effets similaires *in vitro* sur la survie et la prolifération endothéliale.

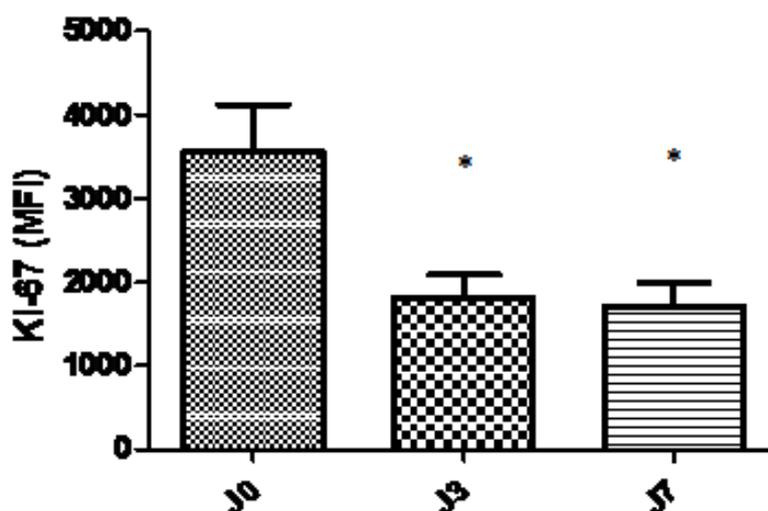
Dans cet objectif, nous avons utilisé des sérums prélevés avant greffe (J0) puis à trois jours (J3) et sept jours (J7) de greffe, en cohérence avec l'augmentation de sFlt1 observée *in vivo* (le pic de sFlt1 sérique des patients étant atteint à J3 et J7).



**Figure 31 : Effet des sérums de patients greffés sur l'apoptose des HUVECs en culture**  
 Comparaison entre J0, J3 et J7 à l'aide d'un test de Friedman ( $p=0.3298$ ) ;  
 comparaison entre J0 et J3 (\* :  $p=0.0426$ ), entre J0 et J7 ( $p=0.1726$ ) et entre J3 et J7 ( $p=0.9032$ ) à l'aide de tests de Wilcoxon ( $n=9$ ).

Contrairement à nos attentes et aux résultats observés chez les dialysés, l'apoptose est réduite par les sérums à J3 (MFI de 133,6), dont le taux de sFlt1 est élevé. En revanche, il n'y a pas de différence significative entre les cellules traitées avec les sérums prélevés à J0 (MFI de 154,1) et les sérums prélevés à J7 (MFI de 136,4) (Figure 31).

Nous avons par ailleurs mesuré la prolifération des cellules en culture après incubation avec les mêmes sérums, toujours à l'aide de la technique du Ki-67 (pour un patient donné, le même sérum a été testé pour l'apoptose et la prolifération).



**Figure 32 : Effet des sérums de patients greffés sur la prolifération des HUVECs en culture**

Comparaison entre J0, J3 et J7 à l'aide d'un test de Friedman ( $p=0.0029$ ) ; comparaison entre J0 et J3 ( $p=0.0078$ ), entre J0 et J7 ( $p=0.0039$ ) et entre J3 et J7 ( $p=0.6523$ ) à l'aide de tests de Wilcoxon ( $n=9$ )

Les sérums de patients prélevés à J3 (MFI de 1801,7) et J7 (MFI de 1716,2) induisent une diminution de la prolifération des HUVECs de près de 50% par rapport à J0 (MFI de 3558,3) (Figure 32).

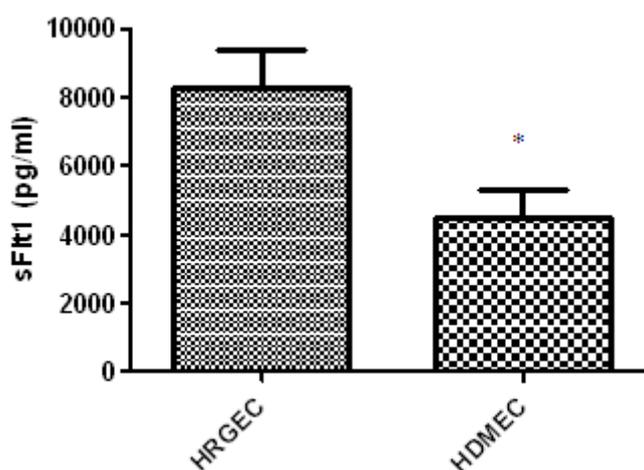
Pour déterminer si le sFlt1 est responsable de cette réduction, nous avons pré-stimulé les cellules avec 50ng/ml de VEGF165 avant de les incuber avec les sérums. Aucune différence significative n'a été observée entre les cellules traitées au VEGF et les non traitées, pour les sérums J3 comme pour les sérums J7 ( $p=0.4258$  et  $p=0.4065$  respectivement, données non présentées).

L'analyse *in vivo* des taux de sFlt1 chez les patients greffés a démontré son implication dans la DGF et la baisse des capillaires péri-tubulaires. Cette étude donne des informations supplémentaires sur l'impact anti-angiogénique des sérums de patients greffés : ces derniers diminuent significativement la prolifération des CE en culture, mais pas leur survie. Par ailleurs, nos résultats ne nous permettent pas de statuer sur le rôle du sFlt1 en particulier dans ce phénomène, puisque la prolifération n'est pas rétablie par l'ajout de VEGF.

### 3. CE : résultats préliminaires

L'objectif de cette étude est d'expliquer les atteintes rénales particulièrement importantes observées dans des maladies systémiques. Il repose sur l'hypothèse d'une moins bonne protection ou d'une moins bonne réparation des cellules rénales en conditions pathologiques. Nous avons souhaité décrire le système du VEGF et du sFlt1, ainsi que l'expression de protecteurs contre le complément, dans la CE, et nous avons comparé les CE glomérulaires rénales (HRGEC) à des CE microvasculaires dermiques (HDMEC), a priori moins fréquemment atteintes. Dans un premier temps, cette comparaison porte sur des cultures primaires de cellules à l'état basal.

La sécrétion de sFlt1 a été mesurée dans le surnageant de deux types de CE en culture, à confluence : les HRGEC et les HDMEC. Les HRGEC sécrètent significativement plus de sFlt1 (8262.5pg/ml) que les HDMEC (4494.5pg/ml) ( $p=0.0285$ ) (Figure 33).

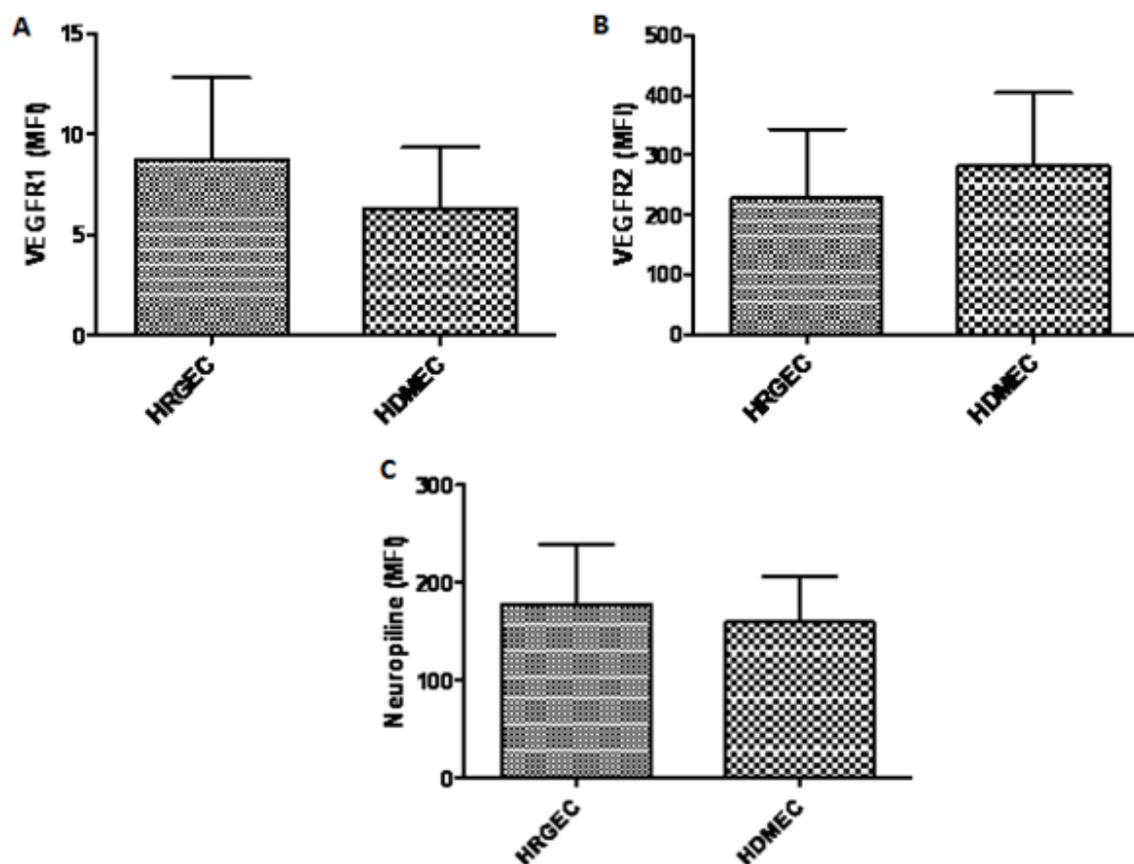


**Figure 33 : Sécrétion de sFlt1 par les HRGEC et les HDMEC**  
Quantification par ELISA du sFlt1 dans le surnageant des CE à confluence ( $p=0.0285$ ).  
( $n=4$ )

Le VEGF a également été dosé dans le surnageant, mais reste sous le seuil de détection du test ELISA (15pg/ml) pour les deux types de cellules testées (données non présentées).

Cette différence ayant été démontrée, nous avons étudié les autres acteurs du système du VEGF afin de déterminer si leur expression était variable selon le type cellulaire. En effet, que le sFlt1 libéré par les HRGEC soit produit par épissage alternatif ou par clivage, on peut

s'attendre à ce que l'expression du VEGFR1 à la membrane soit modifiée. Nous avons donc quantifié l'expression du VEGFR1 ainsi que celle du VEGFR2 et de la neuropiline par cytométrie dans les CE à confluence.



**Figure 34 : Expression des récepteurs et co-récepteur au VEGF dans les HRGEC et les HDMEC**

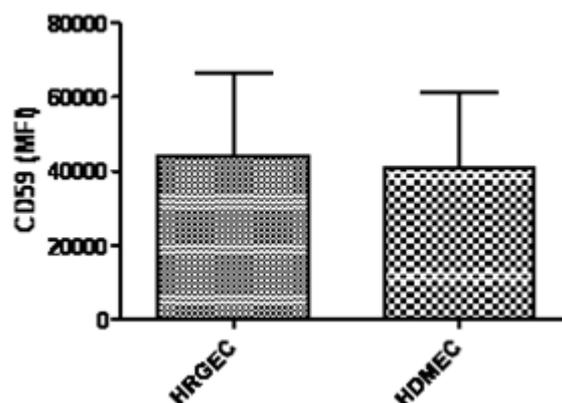
Les expressions du VEGFR1 (A), du VEGFR2 (B) et de la neuropiline 1 (C), mesurées par cytométrie en flux et exprimées en intensité de fluorescence médiane, ne diffèrent pas de façon significative entre les HRGEC et les HDMEC.  $p > 0.05$ , test de Wilcoxon ( $n=3$ )

Les deux types de CE, rénales et dermiques, expriment de façon constitutive le VEGFR1, le VEGFR2 et la neuropiline *in vitro*. Cependant, que ce soit pour les récepteurs ou pour le co-récepteur au VEGF, nous n'avons pas constaté de différence significative entre les deux types de cellules HRGEC et HDMEC (Figure 34)

Dans la mesure où le système du complément est activé de façon prolongé dans certaines maladies rénales (notamment les Vascularites à ANCA), nous avons alors vérifié l'expression du CD59, afin de mettre en évidence une éventuelle différence de vulnérabilité

au complément entre les CE rénales et dermiques. Cette protéine inhibe la formation du complexe d'attaque membranaire C5b-9, le produit final de la cascade du complément.

Là encore, l'expression du CD59 par les HRGEC est similaire à celle des HDMEC (Figure 35).



**Figure 35 : Expression du CD59 par les HRGEC et les HDMEC**  
*Expressions du CD59 mesurée par cytométrie en flux et exprimée en intensité de fluorescence médiane.  $p > 0.05$ , test de Wilcoxon ( $n=3$ )*

À ce stade des travaux, seule la sécrétion plus importante de sFlt1 par les HRGEC permet d'envisager une différence entre les CE rénales et dermiques qui pourrait expliquer des lésions supérieures au niveau du rein : les cellules rénales subiraient un contexte anti-angiogénique plus marqué que les cellules dermiques, qui pourrait s'avérer délétère en conditions pathologiques.

# DISCUSSION ET PERSPECTIVES

---

## 1. sFlt1 et dialyse

Dans la continuité des travaux menés sur les ANCAs, nous avons souhaité mettre en lumière le rôle du sFlt1 dans différents types de maladies rénales.

Chez les patients dialysés, nous avons mis en évidence une augmentation très significative du sFlt1 au cours de la dialyse (30 fois le taux basal). Pour en comprendre l'origine, nous avons mesuré le taux de sFlt1 chez des patients soumis à différentes conditions de dialyse. Nous avons dans un premier temps écarté l'hypothèse d'un impact lié au type de membrane utilisée en comparant l'impact de deux membranes différentes (membranes PEPA-FDX et NEPHRAL 500).

- L'hémodialyse (HD) permet de séparer les molécules de taille réduite par transport diffusif. Le circuit est rincé avec une solution d'héparine non fractionnée (UH), et le patient reçoit une injection d'héparine de bas poids moléculaire (LMWH) dans la première minute de la séance de dialyse
- L'hémodiafiltration (HDF) associe à la diffusion un processus de convection, ce qui permet la filtration de molécules de taille moyenne. Le circuit est pré-rempli par de l'eau ultrapure, et le patient reçoit une injection d'héparine de bas poids moléculaire (LMWH) dans la première minute de la séance de dialyse.
- Utilisation d'une membrane greffée à l'héparine (EVODIAL®) et de dialysat à base de citrate (Citrasate®)

L'étude de ces différentes modalités de dialyse nous a permis de déterminer les facteurs impliqués dans la sécrétion du sFlt1 : la comparaison de plusieurs stratégies d'anti-coagulation a démontré un effet de l'injection systémique d'héparine, alors que l'héparine liée à la membrane de dialyse n'induit pas cette augmentation.

Bien que le lien entre héparine et sFlt1 ait été fait dans des études antérieures, nos résultats constituent un appui à la mise en place de techniques de dialyse réduisant au

maximum la libération de sFlt1, et ainsi, potentiellement, les risques cardiovasculaires qui y sont associés selon les travaux de Di Marco et al. (Di Marco et al., 2009). C'est notamment ce qui a été réalisé au CHU de Nantes, où le rinçage du circuit par l'héparine a été abandonné.

Plusieurs points restent cependant à élucider, notamment concernant les mécanismes responsables de la sécrétion de sFlt1, et son rôle dans l'induction d'un état anti-angiogénique.

## **1.1. Quels mécanismes pour la sécrétion de sFlt1 ?**

### **1.1.1. Le rôle de l'héparine**

Nous avons démontré que l'héparine était responsable de l'induction de la sécrétion de sFlt1 *in vivo* lors de la dialyse. Ces résultats sont en accord avec plusieurs données de la littérature. En effet, Searle et al. ont constaté, suite à une injection d'héparine non fractionnée de 5000 à 10000 Unités, une augmentation de plus de cinquante fois du taux de sFlt1 des patients soumis à une angiographie coronaire (une dose d'héparine administrée) ou à une intervention coronaire percutanée (deux doses d'héparine administrées). La concentration de sFlt1 atteinte est de l'ordre de 13ng/ml (Searle et al., 2011). Une autre étude met en évidence une augmentation du taux de sFlt1 de dix à trente fois dans les trente minutes qui suivent l'injection d'héparine au cours d'une intervention coronarienne percutanée (étude menée sur 8 patients), accompagnée d'une baisse du taux de VEGF. (Kapur et al., 2012) Lorsque l'héparine est administrée à des souris, la sécrétion de sFlt1 intervient dans les dix minutes qui suivent l'injection ; cette cinétique est relativement similaire à celle que nous avons observée, et suggère des mécanismes semblables. Enfin, *in vitro*, l'héparine et l'héparinase, laquelle clive l'héparane sulfate à la surface de la cellule, stimulent la sécrétion de sFlt1 par des HUVECs après dix minutes et trente minutes respectivement (Searle et al., 2011). Dans une autre étude, Sela et al. ont démontré que le sFlt1 peut être stocké dans les cellules musculaires lisses entourant les vaisseaux et dans le placenta. *In vivo*, l'héparinase induit une libération du sFlt1. *In vitro*, l'ajout d'héparine dans le milieu induit une libération de sFlt1 par des cellules de placenta (Drewlo et al., 2011 ; Sela et al., 2011). Ce mécanisme de libération pourrait être la cause de l'augmentation rapide du taux de sFlt1 au cours de la dialyse.

Nous ne sommes pas parvenus à reproduire ce résultat *in vitro* lors de l'incubation de monocytes avec l'héparine. Ceci suggère soit que l'hypothèse de l'implication des monocytes est erronée, soit que les cellules nécessitent un autre stimulus *in vivo*, bien que des expériences aient été menées aussi sur des monocytes de patients prélevés en cours de séance de dialyse.

Aucune étude n'a évalué l'hypothèse d'un stockage intra-monocytaire de sFlt1, et de l'impact de l'héparine sur ce stock. Mais, dans nos propres expériences, si les monocytes étaient à l'origine du pic de sFlt1 observé, nous pouvions nous attendre à une libération de sFlt1 par les monocytes isolés de patients dialysés et stimulés par l'héparine. Or l'héparine n'a eu aucun effet sur les monocytes prélevés avant et pendant la dialyse. Il serait intéressant dans une future étude de tester l'effet de l'héparinase sur ces monocytes, pour confirmer ou infirmer la séquestration du sFlt1 par l'héparane sulfate en surface des monocytes. D'autres types cellulaires peuvent également être impliqués. Parmi eux, la CE semble constituer une meilleure candidate que le monocyte en tant que source du sFlt1 induit par l'héparine, comme le suggèrent les travaux de Searle et al. décrits plus haut (Searle et al., 2011).

### 1.1.2. Microparticules

L'augmentation de la concentration de sFlt1 dès la première minute de dialyse, trop rapide pour correspondre à une synthèse *de novo*, peut-elle être imputée à une réaction des cellules au contact de la membrane ? Nous avons émis l'hypothèse que les cellules, activées par leur contact avec les matériaux de dialyse, libèrent des microparticules (MP), lesquelles peuvent constituer une « source » de sFlt1 détectable par ELISA.

Cependant, nous n'avons pas réussi à démontrer une augmentation de la quantité de MP produites au cours de la dialyse. Mais ces tests ont été réalisés sur des patients pour qui les modalités de dialyses ont été modifiées afin de limiter le pic de sFlt1 (qui est effectivement fortement réduit, puisque les patients testés présentent un taux moyen de l'ordre de 700pg/ml seulement après 15 minutes de dialyse). Il n'est donc pas surprenant que les résultats obtenus ne traduisent pas l'augmentation du nombre de MP au cours de la dialyse relevée dans les études antérieures ; on notera par ailleurs la très faible proportion de MP issues des CE par rapport à celle constatée dans la littérature (Daniel et al., 2006 ; Merino et al., 2010). Ceci suggère une activation modérée des CE par les modalités de dialyse pratiquées sur ces

patients. Ces expériences seraient donc à réitérer sur des patients en hémodialyse « classique » pour confirmer ou invalider cette piste, dans la mesure où plusieurs études renforcent l'hypothèse d'un lien entre dialyse, MP et sFlt1.

Tout d'abord, dans la pré-éclampsie, les plaquettes et le placenta libèrent des MP qui présentent à leur surface le VEGFR1 associé aux marqueurs de leur type cellulaire d'origine (Lok et al., 2008). D'autre part, Daniel et al ont montré que les patients sous dialyse et en phase aiguë de vascularite présentaient une forte concentration sanguine de MP issues des plaquettes et des neutrophiles : à l'issue de la séance d'hémodialyse, le nombre de MP d'origine plaquettaire est multiplié par 3,5 par rapport au nombre mesuré au début de la séance, et celui des MP issues des neutrophiles est multiplié par deux. Les causes de cette augmentation ne sont pas entièrement élucidées, bien qu'une pré-activation par le TNF- $\alpha$  stimule la libération des MP par les neutrophiles *in vitro* ; cet effet n'est cependant pas reproduit *ex vivo* avec des neutrophiles de patients (Daniel et al., 2006).

D'un autre côté, des études ont démontré la libération de MP provenant des CE chez des patients en insuffisance rénale au stade terminal ; ces MP d'origine endothéliale sont directement liées à la dysfonction endothéliale (Amabile et al., 2005 ; Merino et al., 2010 ; Ramirez et al., 2007). On notera également que le taux de MP induit par l'hémodialyse est supérieur à celui induit par la dialyse péritonéale, mais il est également supérieur dans la dialyse péritonéale par rapport aux témoins non dialysés (Merino et al., 2010). Bien que nous ayons démontré l'absence d'activation des CE au cours de la dialyse elle-même par l'absence des marqueurs solubles VCAM et E-sélectine, il n'est pas exclu que l'injection systémique de l'héparine ou tout autre facteur lié à la dialyse induise la production de MP par ces CE.

### 1.1.3. Monocytes CD14+/CD16+

La quantité de cellules CD14+/CD16+ observée (23% en moyenne à T0, 24% après 1h et 29% après 2h pour trois patients) est cohérente avec celle décrite par Merino et al., qui situe le pourcentage de CD14+/CD16+ à 18.9% pour les patients hémodialysés, alors que les témoins sains sont à 3.9%. L'étude a été menée sur 15 patients sous hémodialyse, avec des prélèvements effectués avant la séance de dialyse.

Les travaux de Merino et al. ne décrivent cependant pas le comportement de ces monocytes au cours de la séance de dialyse, comme le font ceux de Sester et al. : ces derniers

montrent une forte baisse de la proportion de monocytes CD14+/CD16+ dès les dix premières minutes, avec un minimum atteint à 30 minutes, puis un retour à la normale à la fin de la séance de dialyse. Cette diminution est attribuée à une séquestration par la membrane de dialyse. Le fait que nous n'ayons pas observé la diminution prédite exclut l'hypothèse d'une capture par la membrane qui induirait en elle-même une forte augmentation de la sécrétion de sFlt1. En revanche, il est envisageable que ces monocytes aient tout de même une capacité supérieure à être activés par le circuit de dialyse et à libérer du sFlt1. Cette hypothèse serait à confirmer en mesurant la concentration de sFlt1 dans le surnageant des monocytes CD14+/CD16+ isolés et mis en culture.

Dans l'étude menée par Merino et al., l'hémodialyse a été comparée à la dialyse péritonéale : or cette dernière ne produit pas d'augmentation de la proportion de CD14+/CD16+. Ceci est un argument supplémentaire pour pointer l'impact de l'hémodialyse sur la santé du patient par rapport à d'autres techniques, et en l'occurrence sur l'inflammation chronique qu'elle produit.

Cette étude relie également les monocytes CD14+/CD16+ aux dommages subis par l'endothélium : la proportion de ces monocytes est corrélée à la libération de MP par les CE. Une augmentation du pourcentage des CD14+/CD16+ au cours de la dialyse serait donc cohérente avec la hausse de la libération de MP observée par Daniel et al. Le fait que nous n'ayons observé ni l'un ni l'autre reste encore à expliquer.

L'analyse de ces facteurs, que ce soit le taux de MP libérées par les CE, ou le pourcentage de monocytes CD14+/CD16+, pourrait, en expliquant les mécanismes à l'origine de la sécrétion de sFlt1 en réponse à l'héparine, apporter des arguments supplémentaires pour l'utilisation du citrate ou des membranes EVODIAL en lieu et place de l'hémodialyse et de l'héparine systémique (Merino et al., 2010 ; Sester et al., 2001).

## **1.2. Induction d'un état anti-angiogénique ?**

Nous avons démontré que les sérums de dialysés prélevés après 30 minutes de dialyse pouvaient induire un état anti-angiogénique *in vitro*, mesuré par leur induction de l'apoptose dans des HUVECS. Cependant, l'implication du sFlt1 dans cet effet anti-angiogénique n'a pu être démontrée, puisque les sérums de patients sous dialyse sans héparine induisent également

un effet anti-angiogénique, alors qu'ils ne contiennent pas de taux élevés de sFlt1 à 30 minutes.

Des travaux antérieurs ont montré l'impact d'une exposition prolongée à un taux excessif de sFlt1 sur la dysfonction endothéliale (Di Marco et al., 2009). Cependant, nous n'avons pas observé d'effet anti-angiogénique pour les sérums prélevés au début de la dialyse. En effet, il n'y a pas de différence significative entre l'apoptose induite par des sérums de témoins sains et celle induite par les sérums d'hémodialysés avant dialyse ( $p=0.2775$ , données non présentées). Ceci suggère donc un environnement anti-angiogénique réduit sur le long terme en dehors des séances de dialyse. Néanmoins, le caractère fréquent de ces dernières incite à repenser les méthodes de dialyse afin d'éviter autant que possible l'augmentation systématique du taux de sFlt1 sérique pour les patients. Ces résultats s'ajoutent à ceux des études citées précédemment, qui démontrent que l'insuffisance rénale au stade terminal et l'hémodialyse s'accompagnent d'une micro-inflammation chronique et de dysfonctions endothéliales (Amabile et al., 2005 ; Merino et al., 2010).

Cependant, la comparaison de l'impact des sérums de patients en HD, HDF et dialyse sans héparine sur l'apoptose des CE en culture ne permet pas de tirer des conclusions quant à l'implication du sFlt1, puisque le sérum de patient sans héparine, bien qu'il ne présente pas de taux élevé de sFlt1 à 30 minutes, provoque tout de même une augmentation de l'apoptose.

Dans un deuxième temps, nous avons tenté de contrer l'effet anti-angiogénique du sFlt1 par l'ajout de VEGF165 *in vitro*. L'absence d'effet du VEGF à des doses conséquentes, sans écarter catégoriquement le rôle du sFlt1, peut également suggérer la présence d'autres facteurs solubles tels que l'endogline soluble, un corécepteur du TGF- $\beta$  aux propriétés anti-angiogéniques. Elle est surexprimée notamment dans la pré-éclampsie, et ses effets s'ajoutent à ceux du sFlt1 (vasodilatation, apoptose en réponse à l'hypoxie). Néanmoins, des études montrent que l'endogline soluble n'est pas surexprimée dans l'insuffisance rénale chronique, et son éventuelle sécrétion pendant la dialyse n'est pas documentée (Charytan et al., 2011 ; Venkatesha et al., 2006).

Ces résultats permettent donc de mettre en évidence un état anti-angiogénique induit par l'hémodialyse par rapport à l'hémodiafiltration, mais pas d'en établir les facteurs responsables. Pour obtenir un éclairage supplémentaire, cette expérience est à répéter pour les

patients dialysés avec la membrane coatée à l'héparine. Ceci nous permettra de déterminer les influences respectives de la présence/absence d'héparine et du taux de sFlt1.

D'autre part, seuls deux paramètres permettant d'évaluer un état anti-angiogénique ont été testés, la survie et la prolifération des CE. La quantification de l'impact des sérums sur la migration, par un modèle de Matrigel par exemple, affinerait notre compréhension des mécanismes.

Enfin, différentes études parviennent à des résultats contradictoires concernant une éventuelle variation du taux de VEGF chez les patients dialysés par rapport aux sujets sains : là où certaines démontrent une augmentation de la sécrétion de VEGF chez les patients hémodialysés, d'autres observent un taux similaire (Eleftheriadis et al., 2012; Yuan et al., 2013). Aucune de ces études ne quantifie cependant la libération de VEGF au cours de la dialyse elle-même : un tel dosage, mis en parallèle avec la sécrétion de sFlt1, permettrait de mieux évaluer la balance angiogénique.

## 2. sFlt1 et greffe rénale

### 2.1. Quels mécanismes pour la sécrétion de sFlt1 ?

Nos travaux montrent une augmentation de sFlt1 induite par l'ischémie reperfusion après greffe rénale, et apportent la preuve de la corrélation entre le taux de sFlt1 et le retard de reprise de fonction du greffon. La comparaison des monocytes des patients greffés avec ceux de témoins sains confirme que les monocytes sont à l'origine de tout ou partie du sFlt1 sécrété. Les mécanismes impliqués dans cette sécrétion sont encore à préciser, et l'hypothèse principale est que cette sécrétion est stimulée par les facteurs induits par l'hypoxie.

En effet, un modèle porcin de transplantation rénale a mis en évidence l'impact de l'ischémie-reperfusion sur la synthèse de HIF-1 $\alpha$  : cette dernière est augmentée à J5 et bien qu'une cinétique plus précoce n'ait pas été réalisée, il est possible que cette augmentation soit parallèle à celle de sFlt1. En outre, ces travaux témoignent d'une diminution du VEGF à J5. On notera que cette diminution est similaire pour les donneurs à cœur arrêté et pour les donneurs à cœur battant, tout comme l'augmentation de HIF-1 $\alpha$  (Lario et al., 2003). L'effet anti-angiogénique de cette baisse paradoxale et précoce du VEGF est très probablement amplifié par l'augmentation en parallèle du sFlt1. Au vu de ces données, HIF-1 $\alpha$  pourrait être impliqué dans la libération de sFlt1 par les monocytes, même si de notre côté nous avons observé que la sécrétion de sFlt1 induite par les donneurs à cœur battant est inférieure à celle des donneurs à cœur arrêtés, alors que la sécrétion de HIF-1 $\alpha$  est inchangée. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse, par exemple par l'analyse de l'effet de l'inhibition de HIF dans les monocytes prélevés chez les patients après la greffe.

### 2.2. Induction d'un état anti-angiogénique ?

Nous avons observé un impact des sérums de patients greffés sur l'angiogenèse *in vitro*, notamment en termes de prolifération des CE.

Comme dans nos travaux sur la dialyse, nous n'avons étudié l'impact des sérums de patients que sur l'apoptose et la prolifération des CE, ce qui ne nous donne qu'une évaluation partielle de leur effet anti-angiogénique. Là encore, il serait intéressant d'observer leur impact

sur le développement de structures endothéliales grâce à des outils de type Matrigel. Par ailleurs, le fait que les sérums de dialysés influent sur l'apoptose, alors que ceux de greffés diminuent la prolifération des CE *in vitro* suggère que le sFlt1 présent dans les deux types de sérum n'est pas le seul responsable de ces effets. Cette hypothèse est renforcée par l'incapacité du VEGF à contrer ces effets anti-angiogéniques. Les mécanismes à l'œuvre restent donc encore à élucider.

### 3. sFlt1 et CE

L'objectif de cette étude était d'expliquer les dommages observés au niveau du rein dans les troubles systémiques. Il est avéré que la sécrétion de sFlt1 est plus élevée dans certains organes que dans d'autres, en particulier dans le placenta. Le taux de sFlt1 relevé dans les CE glomérulaires est près de deux fois supérieur à celui des cellules dermiques (8262.5pg/ml vs 4494.5pg/ml), ce qui est intéressant, et peut amener une piste pour répondre à notre question initiale. En effet, en contrant les effets pro-angiogéniques du VEGF au niveau du rein, le sFlt1 réduit la capacité de l'endothélium à se maintenir et à se régénérer.

Nous avons tenté d'étendre la comparaison aux CE microvasculaires pulmonaires, mais nous avons alors constaté une extrême variabilité dans les taux de sFlt1 sécrété (données non présentées). Ceci pourrait s'expliquer par une sensibilité plus marquée que dans les autres types cellulaires aux variations de la tension en oxygène inhérentes aux conditions de culture. Un contrôle de ce paramètre permettrait de confirmer cette hypothèse, mais également de comparer l'impact de l'hypoxie sur les CE rénales et dermiques.

Nous avons également montré que les CE rénales et dermiques exprimaient les récepteurs membranaires au VEGF de façon similaire. Ceci ne permet toutefois pas d'exclure l'hypothèse d'un clivage plus actif du VEGFR1 membranaire dans les CE rénales pour expliquer la plus importante libération de sFlt1.

La part respective des métalloprotéases et de l'épissage alternatif dans la synthèse et la libération de sFlt1 n'a jamais été étudiée, et aucune piste n'a encore été proposée dans la littérature pour identifier les métalloprotéases impliquées spécifiquement dans le clivage de ce récepteur, et plusieurs d'entre elles pourraient constituer de bonnes candidates. Or une description fine de ces processus nous permettra de comprendre de quels mécanismes résulte la sécrétion du sFlt1 dans les CE.

Au cours de nos travaux sur les ANCA, nous avons montré dans les monocytes une inhibition de la libération de sFlt1 de près de 50% par le GM6001. Cet inhibiteur est validé pour les MMP-1, -2, -3, -8 et -9, mais a également été employé pour inhiber les ADAM-10 et -17, et touche probablement un certain nombre d'autres métalloprotéases. Il est possible que les métalloprotéases impliquées dans le clivage du VEGFR1 à la surface des monocytes soient également responsables de son clivage dans les CE. D'autre part, ADAM-10 est déjà connue

pour cliver la neuropiline, tandis qu'ADAM-17 intervient dans la libération du VEGFR2 soluble, mais aussi de TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  et ICAM-1soluble (Swendeman et al., 2008). Son activité est par ailleurs stimulée par le VEGF. Une autre étude menée dans l'équipe suggère qu'ADAM10 serait moins exprimée dans les cellules rénales que dans les dermiques, mais cela ne présage rien de son activité, qui serait à quantifier notamment par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques. D'autres métalloprotéases, MMP-14 et MMP-15, sont surexprimées dans la pré-éclampsie. Il a été démontré que MMP14 clive l'endogline pour produire l'endogline soluble, mais ce n'est pas le cas de MMP15 (Kaitu'u-Lino et al., 2012).

En utilisant des inhibiteurs spécifiques des différentes métalloprotéases, nous pourrions déterminer lesquelles sont responsables du clivage du VEGFR1.

L'analyse de l'ARN des récepteurs membranaires et solubles permettra de déterminer la part de l'épissage alternatif. Il sera également intéressant de quantifier les facteurs responsables de la régulation de l'épissage alternatif, tels que le Jmjd6. En précisant ainsi les modes de synthèse du sFlt1, et en les comparant dans les CE rénales et dermiques, nous souhaitons expliquer par quels mécanismes les premières libèrent plus de sFlt1 que les secondes.

Ces premiers résultats visent à établir une image de l'état basal des CE. Dans un deuxième temps, les mêmes paramètres sont à mesurer au cours de leur activation par des facteurs pro- et anti-inflammatoires et pro- et anti-angiogéniques. Parmi eux, le VEGF lui-même, le TNF $\alpha$ , très présent dans la pré-éclampsie, le TGF- $\beta$ , up-régulé dans les jours qui suivent la greffe, l'IL-6 ou encore le C5a. Ainsi, nous pourrions comparer le système du sFlt1 des CE rénales à celui des CE dermiques en conditions pathologiques, et de ce fait déterminer si les rénales offrent une résistance moindre à l'inflammation ou un état anti-angiogénique exacerbé une fois activées.

D'autre part, les particularités des CE rénales concernant le système du sFlt1 ne sauraient être étudiées sans prendre en compte leur environnement cellulaire. Le fait que les podocytes sécrètent une plus grande quantité de VEGF suggère un cross-talk entre ces deux types cellulaires. Cette hypothèse est renforcée par plusieurs études, certaines montrant que les podocytes n'expriment que peu le VEGFR2, d'autres indiquant que les podocytes différenciés l'expriment en quantités beaucoup plus importantes que les podocytes immatures

(Guan et al., 2006 ; Sison et al., 2010). Sison et al. démontrent que la perte du VEGFR2 sur les podocytes n'affecte pas la mise en place du glomérule, suggérant une action paracrine du VEGF qu'ils produisent (Sison et al., 2010). La sensibilité des podocytes au sFlt1, et notamment la perte de leur structure sous son influence, constitue également un indice expliquant les atteintes rénales dans les pathologies systémiques.

## 4. Intérêt thérapeutique

L'ensemble de ces résultats démontre l'implication du sFlt1 dans plusieurs types de maladies rénales. On constate cependant que les circonstances de sa sécrétion, que ce soit du point de vue de la cinétique, de la quantité libérée ou des cellules sources, sont très variables d'une maladie à une autre. De nombreux tests sont encore à effectuer pour parvenir à déterminer les mécanismes en jeu dans la sécrétion du sFlt1, et ainsi envisager de les contrer. Que ce soit dans le cadre de la greffe rénale, où il est associé à la DGF, ou dans le cadre de l'insuffisance rénale, où il contribue à un état anti-angiogénique propre à favoriser les accidents cardio-vasculaires, le sFlt1 constitue un marqueur prédictif et une cible thérapeutique.

Dans un premier temps, nos travaux sur l'hémodialyse ont permis de déterminer des procédures présentant potentiellement un moindre impact anti-angiogénique : ainsi, en supprimant le rinçage du circuit avec de l'héparine avant le début de la séance de dialyse, on réduit fortement la sécrétion de sFlt1 : cette modification a été adoptée en routine au CHU de Nantes.

D'autres stratégies peuvent permettre de limiter le taux de sFlt1 circulant ou atténuer son effet anti-angiogénique. Ainsi, des traitements utilisant du VEGF recombinant et des techniques de thérapie génique ont permis de rétablir le développement des vaisseaux après des ischémies myocardiques ou des maladies artérielles périphériques par exemple (Henry et al., 2003 ; Kim et al., 2004). Néanmoins, l'excès de VEGF peut lui aussi être néfaste : rappelons qu'il joue notamment un rôle dans le rejet de greffe (Reinders et al., 2003). D'autre part, une élimination du sFlt1 est possible via sa capture par des colonnes d'adsorption : cette technique a permis de réduire le taux de sFlt1 dans le sérum de patientes présentant de la pré-éclampsie (Thadhani et al., 2011). Ces résultats ouvrent la voie à une possible réduction de l'état anti-angiogénique observé suite à la greffe rénale, et donc à une limitation des risques de retard à la reprise de fonction du greffon.

D'autres pistes pourraient être envisageables, comme l'inhibition de la libération du sFlt1 elle-même. Les MMP, responsables du clivage du VEGFR1, représentent des cibles thérapeutiques dans un contexte tumoral : elles détruisent la matrice extracellulaire entourant la tumeur et favorisent ainsi sa progression. De nombreux inhibiteurs des MMP mais aussi des ADAM ont donc été développés et ont fait l'objet d'essais cliniques. Le problème central

demeure cependant de déterminer quelles sont les métalloprotéases responsables de la libération de sFlt1, afin de mettre en place des traitements spécifiques. (Coussens et al., 2002).

À l'inverse, des stratégies visant à contrer les effets VEGF sont employées dans le traitement de cancer, l'angiogenèse étant un paramètre important du développement des tumeurs, ou des rétinopathies (Ferrara, 2004 ; Schmitz et al., 2005 ; Verrax et al., 2011). Paradoxalement, c'est un peptide anti-Flt1, dirigé spécifiquement contre le VEGFR1, qui est étudié pour traiter la néovascularisation cornéale en bloquant la fixation des facteurs pro-angiogéniques (PlGF, VEGF, VEGF-B) au VEGFR1, inhibant ainsi la migration cellulaire (Bae et al., 2005). L'interaction de ce peptide avec la version soluble du récepteur n'a pas encore été étudiée, mais constitue une piste intéressante pour le traitement des maladies rénales.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Ahmad, S., Hewett, P.W., Al-Ani, B., Sissaoui, S., Fujisawa, T., Cudmore, M.J., and Ahmed, A. (2011). Autocrine activity of soluble Flt-1 controls endothelial cell function and angiogenesis. *Vasc. Cell* 3, 15.
- Albuquerque, R.J.C., Hayashi, T., Cho, W.G., Kleinman, M.E., Dridi, S., Takeda, A., Baffi, J.Z., Yamada, K., Kaneko, H., Green, M.G., et al. (2009). Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat. Med.* 15, 1023–1030.
- Allen, A.R., McHale, J., Smith, J., Cook, H.T., Karkar, A., Haskard, D.O., Lobb, R.R., and Pusey, C.D. (1999). Endothelial expression of VCAM-1 in experimental crescentic nephritis and effect of antibodies to very late antigen-4 or VCAM-1 on glomerular injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 162, 5519–5527.
- Amabile, N., Guérin, A.P., Leroyer, A., Mallat, Z., Nguyen, C., Boddaert, J., London, G.M., Tedgui, A., and Boulanger, C.M. (2005). Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 16, 3381–3388.
- Ambati, B.K., Patterson, E., Jani, P., Jenkins, C., Higgins, E., Singh, N., Suthar, T., Vira, N., Smith, K., and Caldwell, R. (2007). Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 contributes to the corneal antiangiogenic barrier. *Br. J. Ophthalmol.* 91, 505–508.
- Armulik, A., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (2005). Endothelial/Pericyte Interactions. *Circ. Res.* 97, 512–523.
- Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., Kroll, J., Plaisance, S., De Mol, M., Bono, F., et al. (2003). Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* 9, 936–943.
- Bae, D.-G., Kim, T.-D., Li, G., Yoon, W.-H., and Chae, C.-B. (2005). Anti-Flt1 Peptide, a Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1-Specific Hexapeptide, Inhibits Tumor Growth and Metastasis. *Clin. Cancer Res.* 11, 2651–2661.
- Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H.A., Mantovani, A., and Marmé, D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood* 87, 3336–3343.
- Barleon, B., Siemeister, G., Martiny-Baron, G., Weindel, K., Herzog, C., and Marmé, D. (1997). Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res.* 57, 5421–5425.

- Barleon, B., Reusch, P., Totzke, F., Herzog, C., Keck, C., Martiny-Baron, G., and Marmé, D. (2001). Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis* 4, 143–154.
- Berse, B., Brown, L.F., Water, L.V. de, Dvorak, H.F., and Senger, D.R. (1992). Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol. Biol. Cell* 3, 211–220.
- Biselli-Chicote, P.M., Oliveira, A.R.C.P., Pavarino, E.C., and Goloni-Bertollo, E.M. (2011). VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138, 363–370.
- Boeckel, J.-N., Guarani, V., Koyanagi, M., Roexe, T., Lengeling, A., Schermuly, R.T., Gellert, P., Braun, T., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2011). Jumonji domain-containing protein 6 (Jmjd6) is required for angiogenic sprouting and regulates splicing of VEGF-receptor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 3276–3281.
- Bonventre, J.V., Vaidya, V.S., Schmouder, R., Feig, P., and Dieterle, F. (2010). Next-generation biomarkers for detecting kidney toxicity. *Nat. Biotechnol.* 28, 436–440.
- Brock, T.A., Dvorak, H.F., and Senger, D.R. (1991). Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca<sup>2+</sup> and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 138, 213–221.
- Brogi, E., Wu, T., Namiki, A., and Isner, J.M. (1994). Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 90, 649–652.
- Bruegmann, E., Gruemmer, R., Neulen, J., and Motejlek, K. (2009). Regulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 secretion from human endothelial cells by tissue inhibitor of metalloproteinase 1. *Mol. Hum. Reprod.* 15, 749–756.
- Bussolino, F., Breviario, F., Tetta, C., Aglietta, M., Mantovani, A., and Dejana, E. (1986). Interleukin 1 stimulates platelet-activating factor production in cultured human endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 77, 2027–2033.
- Cai, J., Wu, L., Qi, X., Shaw, L., Li Calzi, S., Caballero, S., Jiang, W.G., Viores, S.A., Antonetti, D., Ahmed, A., et al. (2011). Placenta growth factor-1 exerts time-dependent stabilization of adherens junctions following VEGF-induced vascular permeability. *PLoS One* 6, e18076.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenshtein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435–439.
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., et al. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* 7, 575–583.

- Cébe Suarez, S., Pieren, M., Cariolato, L., Arn, S., Hoffmann, U., Bogucki, A., Manlius, C., Wood, J., and Ballmer-Hofer, K. (2006). A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 63, 2067–2077.
- Chapal, M., Néel, M., Le Borgne, F., Meffray, E., Carceles, O., Hourmant, M., Giral, M., Foucher, Y., Moreau, A., and Fakhouri, F. (2013). Increased Soluble Flt-1 Correlates With Delayed Graft Function and Early Loss of Peritubular Capillaries in the Kidney Graft. *Transplantation*.
- Charytan, D.M., Helfand, A.M., MacDonald, B.A., Cinelli, A., Kalluri, R., and Zeisberg, E.M. (2011). Circulating endoglin concentration is not elevated in chronic kidney disease. *PLoS One* 6, e23718.
- Chen, J., Braet, F., Brodsky, S., Weinstein, T., Romanov, V., Noiri, E., and Goligorsky, M.S. (2002). VEGF-induced mobilization of caveolae and increase in permeability of endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 282, C1053–C1063.
- Cindrova-Davies, T., Sanders, D.A., Burton, G.J., and Charnock-Jones, D.S. (2011). Soluble FLT1 sensitizes endothelial cells to inflammatory cytokines by antagonizing VEGF receptor-mediated signalling. *Cardiovasc. Res.* 89, 671.
- Cohen, T., Gitay-Goren, H., Sharon, R., Shibuya, M., Halaban, R., Levi, B.Z., and Neufeld, G. (1995). VEGF121, a vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform lacking heparin binding ability, requires cell-surface heparan sulfates for efficient binding to the VEGF receptors of human melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 270, 11322–11326.
- Coussens, L.M., Fingleton, B., and Matrisian, L.M. (2002). Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer—Trials and Tribulations. *Science* 295, 2387–2392.
- Curry, F.E. (1992). Modulation of venular microvessel permeability by calcium influx into endothelial cells. *FASEB J.* 6, 2456–2466.
- Daniel, L., Fakhouri, F., Joly, D., Mouthon, L., Nusbaum, P., Grunfeld, J.-P., Schifferli, J., Guillemin, L., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2006). Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis. *Kidney Int.* 69, 1416–1423.
- Dayanir, V., Meyer, R.D., Lashkari, K., and Rahimi, N. (2001). Identification of Tyrosine Residues in Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2/FLK-1 Involved in Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase and Cell Proliferation. *J. Biol. Chem.* 276, 17686–17692.
- Deepesh, V. (2008). Relationship Of Microalbuminuria With Ischaemic Heart Disease In Non-Diabetic Subjects. Thesis.
- Defilippi, P., Truffa, G., Stefanuto, G., Altruda, F., Silengo, L., and Tarone, G. (1991). Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma modulate the expression of the vitronectin receptor (integrin beta 3) in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 266, 7638–7645.

- Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., and Weinstein, B.M. (2009). The Control of Vascular Integrity by Endothelial Cell Junctions: Molecular Basis and Pathological Implications. *Dev. Cell* 16, 209–221.
- Dougher, M., and Terman, B.L. (1999). Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Publ. Online* 23 Febr. 1999 Doi101038sjonc1202478 18.
- Drewlo, S., Levytska, K., Sobel, M., Baczyk, D., Lye, S.J., and Kingdom, J.C.P. (2011). Heparin Promotes Soluble VEGF Receptor Expression in Human Placental Villi to Impair Endothelial VEGF Signaling. *J. Thromb. Haemost. JTH*.
- Dvorak, A.M., and Feng, D. (2001). The Vesiculo–Vacuolar Organelle (VVO): A New Endothelial Cell Permeability Organelle. *J. Histochem. Cytochem.* 49, 419–431.
- Ebos, J.M.L., Bocci, G., Man, S., Thorpe, P.E., Hicklin, D.J., Zhou, D., Jia, X., and Kerbel, R.S. (2004). A Naturally Occurring Soluble Form of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Detected in Mouse and Human Plasma. Ontario Graduate Scholarship in Science and Technology (J.M.L. Ebos); Sunnybrook Trust for Medical Research (G. Bocci); and NIH grant CA41223, Canadian Institutes for Health Research, and National Cancer Institute of Canada (R.S. Kerbel). *Mol. Cancer Res.* 2, 315–326.
- Edelbauer, M., Datta, D., Vos, I.H.C., Basu, A., Stack, M.P., Reinders, M.E.J., Sho, M., Calzadilla, K., Ganz, P., and Briscoe, D.M. (2010). Effect of vascular endothelial growth factor and its receptor KDR on the transendothelial migration and local trafficking of human T cells in vitro and in vivo. *Blood* 116, 1980–1989.
- Eklund, L., Pihola, J., Komulainen, J., Sormunen, R., Ongvarrasopone, C., Fässler, R., Muona, A., Ilves, M., Ruskoaho, H., Takala, T.E., et al. (2001). Lack of type XV collagen causes a skeletal myopathy and cardiovascular defects in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 1194–1199.
- Eleftheriadis, T., Antoniadi, G., Liakopoulos, V., Pissas, G., Stefanidis, I., and Galaktidou, G. (2012). Plasma angiogenin and vascular endothelial growth factor among hemodialysis patients. *Iran. J. Kidney Dis.* 6, 209–215.
- Eremina, V., Jefferson, J.A., Kowalewska, J., Hochster, H., Haas, M., Weisstuch, J., Richardson, C., Kopp, J.B., Kabir, M.G., Backx, P.H., et al. (2008). VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N. Engl. J. Med.* 358, 1129–1136.
- Esch, F., Baird, A., Ling, N., Ueno, N., Hill, F., Denoroy, L., Klepper, R., Gospodarowicz, D., Böhlen, P., and Guillemin, R. (1985). Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 6507–6511.
- Eubank, T.D., Roda, J.M., Liu, H., O’Neil, T., and Marsh, C.B. (2011). Opposing roles for HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in the regulation of angiogenesis by mononuclear phagocytes. *Blood* 117, 323–332.
- Ewan, L.C., Jopling, H.M., Jia, H., Mittar, S., Bagherzadeh, A., Howell, G.J., Walker, J.H., Zachary, I.C., and Ponnambalam, S. (2006). Intrinsic tyrosine kinase activity is

- required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells. *Traffic Cph. Den.* 7, 1270–1282.
- De Falco, S. (2012). The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp. Mol. Med.* 44, 1.
- Felcht, M., Luck, R., Schering, A., Seidel, P., Srivastava, K., Hu, J., Bartol, A., Kienast, Y., Vettel, C., Loos, E.K., et al. (2012). Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J. Clin. Invest.* 122, 1991–2005.
- Felmeden, D.C., Blann, A.D., and Lip, G.Y.H. (2003). Angiogenesis: basic pathophysiology and implications for disease. *Eur. Heart J.* 24, 586–603.
- Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25, 581–611.
- Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 161, 851–858.
- Fitz, L.J., Morris, J.C., Towler, P., Long, A., Burgess, P., Greco, R., Wang, J., Gassaway, R., Nickbarg, E., Kovacic, S., et al. (1997). Characterization of murine Flt4 ligand/VEGF-C. *Oncogene* 15, 613–618.
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., and Williams, G. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 133, 275–288.
- Fong, G.-H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66–70.
- Fons, P., Herault, J.-P., Delesque, N., Tuyaret, J., Bono, F., and Herbert, J.-M. (2004). VEGF-R2 and neuropilin-1 are involved in VEGF-A-induced differentiation of human bone marrow progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 200, 351–359.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4604–4613.
- Freeman, M.R., Schneck, F.X., Gagnon, M.L., Corless, C., Soker, S., Niknejad, K., Peoples, G.E., and Klagsbrun, M. (1995). Peripheral Blood T Lymphocytes and Lymphocytes Infiltrating Human Cancers Express Vascular Endothelial Growth Factor: A Potential Role for T Cells in Angiogenesis. *Cancer Res.* 55, 4140–4145.
- Fuh, G., Garcia, K.C., and de Vos, A.M. (2000). The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J. Biol. Chem.* 275, 26690–26695.
- Gagnon, M.L., Bielenberg, D.R., Gechtman, Z., Miao, H.Q., Takashima, S., Soker, S., and Klagsbrun, M. (2000). Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2573–2578.

- Gampel, A., Moss, L., Jones, M.C., Brunton, V., Norman, J.C., and Mellor, H. (2006). VEGF regulates the mobilization of VEGFR2/KDR from an intracellular endothelial storage compartment. *Blood* 108, 2624–2631.
- Gao, N., Ding, M., Zheng, J.Z., Zhang, Z., Leonard, S.S., Liu, K.J., Shi, X., and Jiang, B.-H. (2002). Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 277, 31963–31971.
- Gerber, H.-P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., and Ferrara, N. (1999). VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat. Med.* 5, 623–628.
- Girardi, G., Yarilin, D., Thurman, J.M., Holers, V.M., and Salmon, J.E. (2006). Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J. Exp. Med.* 203, 2165–2175.
- Giraud, E., Primo, L., Audero, E., Gerber, H.P., Koolwijk, P., Soker, S., Klagsbrun, M., Ferrara, N., and Bussolino, F. (1998). Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 22128–22135.
- Gitay-Goren, H., Soker, S., Vlodavsky, I., and Neufeld, G. (1992). The binding of vascular endothelial growth factor to its receptors is dependent on cell surface-associated heparin-like molecules. *J. Biol. Chem.* 267, 6093–6098.
- Goel, H.L., Bae, D., Pursell, B., Gouvin, L.M., Lu, S., and Mercurio, A.M. (2011). Neuropilin-2 promotes branching morphogenesis in the mouse mammary gland. *Dev. Camb. Engl.* 138, 2969–2976.
- Gospodarowicz, D. (1976). Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing, and neoplastic growth. *Prog. Clin. Biol. Res.* 9, 1–19.
- Gratton, J.P., Morales-Ruiz, M., Kureishi, Y., Fulton, D., Walsh, K., and Sessa, W.C. (2001). Akt down-regulation of p38 signaling provides a novel mechanism of vascular endothelial growth factor-mediated cytoprotection in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 30359–30365.
- Greenblatt, M., and Shubi, P. (1968). Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 111–124.
- Guan, F., Villegas, G., Teichman, J., Mundel, P., and Tufro, A. (2006). Autocrine VEGF-A system in podocytes regulates podocin and its interaction with CD2AP. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291, F422–428.
- Guilpain, P., Servettaz, A., Goulvestre, C., Barrieu, S., Borderie, D., Chéreau, C., Kavian, N., Pagnoux, C., Guillevin, L., Weill, B., et al. (2007). Pathogenic effects of antimyeloperoxidase antibodies in patients with microscopic polyangiitis. *Arthritis Rheum.* 56, 2455–2463.

- Gupta, K., Kshirsagar, S., Li, W., Gui, L., Ramakrishnan, S., Gupta, P., Law, P.Y., and Hebbel, R.P. (1999). VEGF Prevents Apoptosis of Human Microvascular Endothelial Cells via Opposing Effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK Signaling. *Exp. Cell Res.* 247, 495–504.
- Harmey, J.H., Dimitriadis, E., Kay, E., Redmond, H.P., and Bouchier-Hayes, D. (1998). Regulation of macrophage production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hypoxia and transforming growth factor beta-1. *Ann. Surg. Oncol.* 5, 271–278.
- Henry, T.D., Annex, B.H., McKendall, G.R., Azrin, M.A., Lopez, J.J., Giordano, F.J., Shah, P.K., Willerson, J.T., Benza, R.L., Berman, D.S., et al. (2003). The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 107, 1359–1365.
- Herzog, B., Pellet-Many, C., Britton, G., Hartzoulakis, B., and Zachary, I.C. (2011). VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* 22, 2766–2776.
- Heydariyan, M., McCaffrey, T., Florea, L., Yang, Z., Ross, M.M., Zhou, W., and Maynard, S.E. (2009). Novel Splice Variants of sFlt1 are Upregulated in Preeclampsia. *Placenta* 30, 250–255.
- Holmes, D.I., and Zachary, I.C. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease.
- Hornig, C., Behn, T., Bartsch, W., Yayon, A., and Weich, H.A. (1999). Detection and quantification of complexed and free soluble human vascular endothelial growth factor receptor-1 (sVEGFR-1) by ELISA. *J. Immunol. Methods* 226, 169–177.
- Hornig, C., Barleon, B., Ahmad, S., Vuorela, P., Ahmed, A., and Weich, H.A. (2000). Release and Complex Formation of Soluble VEGFR-1 from Endothelial Cells and Biological Fluids. *Lab. Invest.* 80, 443–454.
- Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 5, 1806–1814.
- Houck, K.A., Leung, D.W., Rowland, A.M., Winer, J., and Ferrara, N. (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J. Biol. Chem.* 267, 26031–26037.
- Huang, K., Andersson, C., Roomans, G.M., Ito, N., and Claesson-Welsh, L. (2001). Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 315–324.
- Huckle, W.R., and Roche, R.I. (2004). Post-transcriptional control of expression of sFlt-1, an endogenous inhibitor of vascular endothelial growth factor. *J. Cell. Biochem.* 93, 120–132.

- Ikeda, T., Sun, L., Tsuruoka, N., Ishigaki, Y., Yoshitomi, Y., Yoshitake, Y., and Yonekura, H. (2011). Hypoxia down-regulates sFlt-1 (sVEGFR-1) expression in human microvascular endothelial cells by a mechanism involving mRNA alternative processing. *Biochem J* 436, 399–407.
- Ito, T.-K., Ishii, G., Saito, S., Yano, K., Hoshino, A., Suzuki, T., and Ochiai, A. (2009). Degradation of soluble VEGF receptor-1 by MMP-7 allows VEGF access to endothelial cells. *Blood* 113, 2363–2369.
- Jebbink, J., Keijser, R., Veenboer, G., van der Post, J., Ris-Stalpers, C., and Afink, G. (2011). Expression of Placental FLT1 Transcript Variants Relates to Both Gestational Hypertensive Disease and Fetal Growth. *Hypertension*.
- Jih, Y.J., Lien, W.H., Tsai, W.C., Yang, G.W., Li, C., and Wu, L.W. (2001). Distinct regulation of genes by bFGF and VEGF-A in endothelial cells. *Angiogenesis* 4, 313–321.
- Jin, J., Sison, K., Li, C., Tian, R., Wnuk, M., Sung, H.-K., Jeansson, M., Zhang, C., Tucholska, M., Jones, N., et al. (2012). Soluble FLT1 Binds Lipid Microdomains in Podocytes to Control Cell Morphology and Glomerular Barrier Function. *Cell* 151, 384–399.
- Jin, Z.-G., Ueba, H., Tanimoto, T., Lungu, A.O., Frame, M.D., and Berk, B.C. (2003). Ligand-independent activation of vascular endothelial growth factor receptor 2 by fluid shear stress regulates activation of endothelial nitric oxide synthase. *Circ. Res.* 93, 354–363.
- Jones, M.C., Caswell, P.T., Moran-Jones, K., Roberts, M., Barry, S.T., Gampel, A., Mellor, H., and Norman, J.C. (2009). VEGFR1 (Flt1) Regulates Rab4 Recycling to Control Fibronectin Polymerization and Endothelial Vessel Branching. *Traffic* 10, 754–766.
- Jones, T.R., Kao, K.J., Pizzo, S.V., and Bigner, D.D. (1981). Endothelial cell surface expression and binding of factor VIII/von Willebrand factor. *Am. J. Pathol.* 103, 304–308.
- Joukov, V., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Pajusola, K., Olofsson, B., Kumar, V., Eriksson, U., and Alitalo, K. (1997). Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J. Cell. Physiol.* 173, 211–215.
- Jung, J.-J., Tiwari, A., Inamdar, S.M., Thomas, C.P., Goel, A., and Choudhury, A. (2012). Secretion of Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 (sVEGFR1/sFlt1) Requires Arf1, Arf6, and Rab11 GTPases. *PLoS ONE* 7, e44572.
- Kaitu'u-Lino, T.J., Palmer, K., Tuohey, L., Ye, L., and Tong, S. (2012). MMP-15 Is Upregulated in Preeclampsia, but Does Not Cleave Endoglin to Produce Soluble Endoglin. *PLoS ONE* 7, e39864.
- Kalluri, R. (2003). Angiogenesis: Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 422–433.
- Kang, D.H., Joly, A.H., Oh, S.W., Hugo, C., Kerjaschki, D., Gordon, K.L., Mazzali, M., Jefferson, J.A., Hughes, J., Madsen, K.M., et al. (2001). Impaired angiogenesis in the

- remnant kidney model: I. Potential role of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 12, 1434–1447.
- Kappas, N.C., Zeng, G., Chappell, J.C., Kearney, J.B., Hazarika, S., Kallianos, K.G., Patterson, C., Annex, B.H., and Bautch, V.L. (2008). The VEGF receptor Flt-1 spatially modulates Flk-1 signaling and blood vessel branching. *J. Cell Biol.* 181, 847–858.
- Kapur, N.K., Shenoy, C., Yunis, A.A., Mohammad, N.N., Wilson, S., Paruchuri, V., Mackey, E.E., Qiao, X., Shah, A., Esposito, M.L., et al. (2012). Distinct effects of unfractionated heparin versus bivalirudin on circulating angiogenic peptides. *PloS One* 7, e34344.
- Karmann, K., Hughes, C.C., Schechner, J., Fanslow, W.C., and Pober, J.S. (1995). CD40 on human endothelial cells: inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 4342–4346.
- Karnovsky, M.J. (1968). The ultrastructural basis of transcapillary exchanges. *J. Gen. Physiol.* 52, 64–95.
- Kataru, R.P., Jung, K., Jang, C., Yang, H., Schwendener, R.A., Baik, J.E., Han, S.H., Alitalo, K., and Koh, G.Y. (2009). Critical role of CD11b+ macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution. *Blood* 113, 5650–5659.
- Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D.T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309–1312.
- Kendall, R.L., and Thomas, K.A. (1993). Inhibition of vascular endothelial cell growth factor activity by an endogenously encoded soluble receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 10705–10709.
- Kendall, R.L., Wang, G., and Thomas, K.A. (1996). Identification of a Natural Soluble Form of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, FLT-1, and Its Heterodimerization with KDR. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 324–328.
- Keyt, B.A., Nguyen, H.V., Berleau, L.T., Duarte, C.M., Park, J., Chen, H., and Ferrara, N. (1996). Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 271, 5638–5646.
- Kim, H.-J., Jang, S.Y., Park, J.-I., Byun, J., Kim, D.-I., Do, Y.-S., Kim, J.-M., Kim, S., Kim, B.-M., Kim, W.-B., et al. (2004). Vascular endothelial growth factor-induced angiogenic gene therapy in patients with peripheral artery disease. *Exp. Mol. Med.* 36, 336–344.
- Kim, I., Moon, S.-O., Hoon Kim, S., Jin Kim, H., Soon Koh, Y., and Young Koh, G. (2001). Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* 276, 7614–7620.

- Kim, M.P., Park, S.I., Kopetz, S., and Gallick, G.E. (2009). Src family kinases as mediators of endothelial permeability: effects on inflammation and metastasis. *Cell Tissue Res.* 335, 249–259.
- Kräling, B.M., Wiederschain, D.G., Boehm, T., Rehn, M., Mulliken, J.B., and Moses, M.A. (1999). The role of matrix metalloproteinase activity in the maturation of human capillary endothelial cells in vitro. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 10), 1599–1609.
- Ladomery, M.R., Harper, S.J., and Bates, D.O. (2007). Alternative splicing in angiogenesis: The vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett.* 249, 133–142.
- Langer, H.F., Chung, K.-J., Orlova, V.V., Choi, E.Y., Kaul, S., Kruhlak, M.J., Alatsatianos, M., DeAngelis, R.A., Roche, P.A., Magotti, P., et al. (2010). Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis. *Blood* 116, 4395–4403.
- Lario, S., Mendes, D., Bescós, M., Iñigo, P., Campos, B., Alvarez, R., Alcaraz, A., Rivera-Fillat, F., and Campistol, J.M. (2003). Expression of transforming growth factor-beta1 and hypoxia-inducible factor-1alpha in an experimental model of kidney transplantation. *Transplantation* 75, 1647–1654.
- Lehoux, S., and Tedgui, A. (2004). Bases cellulaires de la mécanotransduction dans la cellule endothéliale. *MS Médecine Sci.* 20, 551–556.
- Leibovich, S.J., Polverini, P.J., Shepard, H.M., Wiseman, D.M., Shively, V., and Nuseir, N. (1987). Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. *Nature* 329, 630–632.
- Lennarz, W.J., and Lane, M.D. (2013). *Encyclopedia of Biological Chemistry*, e-only (Academic Press).
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306–1309.
- Levine, R.J., Lam, C., Qian, C., Yu, K.F., Maynard, S.E., Sachs, B.P., Sibai, B.M., Epstein, F.H., Romero, R., Thadhani, R., et al. (2006). Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N. Engl. J. Med.* 355, 992–1005.
- Lindemann, S., Tolley, N.D., Dixon, D.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., and Weyrich, A.S. (2001). Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J. Cell Biol.* 154, 485–490.
- Lok, C.A.R., Böing, A.N., Sargent, I.L., Sooranna, S.R., van der Post, J.A.M., Nieuwland, R., and Sturk, A. (2008). Circulating platelet-derived and placenta-derived microparticles expose Flt-1 in preeclampsia. *Reprod Sci* 1002–1010.
- Mac Gabhann, F., and Popel, A.S. (2007). Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: A computational study. *Biophys. Chem.* 128, 125–139.
- Mackenzie, F., and Ruhrberg, C. (2012). Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development* 139, 1371–1380.

- Maharaj, A.S.R., Saint-Geniez, M., Maldonado, A.E., and D'Amore, P.A. (2006). Vascular Endothelial Growth Factor Localization in the Adult. *Am. J. Pathol.* *168*, 639–648.
- Mamluk, R., Gechtman, Z., Kutcher, M.E., Gasiunas, N., Gallagher, J., and Klagsbrun, M. (2002). Neuropilin-1 Binds Vascular Endothelial Growth Factor 165, Placenta Growth Factor-2, and Heparin via Its b1b2 Domain. *J. Biol. Chem.* *277*, 24818–24825.
- Mandriota, S.J., Seghezzi, G., Vassalli, J.-D., Ferrara, N., Wasi, S., Mazziere, R., Mignatti, P., and Pepper, M.S. (1995). Vascular Endothelial Growth Factor Increases Urokinase Receptor Expression in Vascular Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.* *270*, 9709–9716.
- Mantovani, A., Bussolino, F., and Dejana, E. (1992). Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *6*, 2591–2599.
- Di Marco, G.S., Reuter, S., Hillebrand, U., Amler, S., König, M., Larger, E., Oberleithner, H., Brand, E., Pavenstädt, H., and Brand, M. (2009). The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *20*, 2235–2245.
- Mason, J.C., Lidington, E.A., Yarwood, H., Lublin, D.M., and Haskard, D.O. (2001). Induction of endothelial cell decay-accelerating factor by vascular endothelial growth factor: A mechanism for cytoprotection against complement-mediated injury during inflammatory angiogenesis. *Arthritis Rheum.* *44*, 138–150.
- Mason, J.C., Lidington, E.A., Ahmad, S.R., and Haskard, D.O. (2002). bFGF and VEGF synergistically enhance endothelial cytoprotection via decay-accelerating factor induction. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *282*, C578–C587.
- Maynard, S.E., Min, J.-Y., Merchan, J., Lim, K.-H., Li, J., Mondal, S., Libermann, T.A., Morgan, J.P., Sellke, F.W., Stillman, I.E., et al. (2003). Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J. Clin. Invest.* *111*, 649–658.
- Maynard, S.E., Venkatesha, S., Thadhani, R., and Karumanchi, S.A. (2005). Soluble Fms-like Tyrosine Kinase 1 and Endothelial Dysfunction in the Pathogenesis of Preeclampsia. *Pediatr. Res.* *57*, 1R–7R.
- Mazanet, M.M., Neote, K., and Hughes, C.C. (2000). Expression of IFN-inducible T cell alpha chemoattractant by human endothelial cells is cyclosporin A-resistant and promotes T cell adhesion: implications for cyclosporin A-resistant immune inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *164*, 5383–5388.
- Melter, M., Reinders, M.E., Sho, M., Pal, S., Geehan, C., Denton, M.D., Mukhopadhyay, D., and Briscoe, D.M. (2000). Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood* *96*, 3801–3808.
- Mercier, E., Branger, B., Vecina, F., Al-Sabadani, B., Berlan, J., Dauzat, M., Fourcade, J., and Gris, J.C. (2001). Tissue factor coagulation pathway and blood cells activation state in renal insufficiency. *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc. EHA* *2*, 18–25.

- Merino, A., Portoles, J., Selgas, R., Ojeda, R., Buendia, P., Ocana, J., Bajo, M.A., del Peso, G., Carracedo, J., Ramirez, R., et al. (2010). Effect of Different Dialysis Modalities on Microinflammatory Status and Endothelial Damage. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 5, 227–234.
- Milkiewicz, M., Doyle, J.L., Fudalewski, T., Ispanovic, E., Aghasi, M., and Haas, T.L. (2007). HIF-1 and HIF-2 play a central role in stretch-induced but not shear-stress-induced angiogenesis in rat skeletal muscle. *J. Physiol.* 583, 753–766.
- Mittar, S., Ulyatt, C., Howell, G.J., Bruns, A.F., Zachary, I., Walker, J.H., and Ponnambalam, S. (2009). VEGFR1 receptor tyrosine kinase localization to the Golgi apparatus is calcium-dependent. *Exp. Cell Res.* 315, 877–889.
- Möhle, R., Green, D., Moore, M.A., Nachman, R.L., and Rafii, S. (1997). Constitutive production and thrombin-induced release of vascular endothelial growth factor by human megakaryocytes and platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 663–668.
- Moncada, S., and Vane, J.R. (1978). Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A<sub>2</sub>, and prostacyclin. *Pharmacol. Rev.* 30, 293–331.
- Mor, F., Quintana, F.J., and Cohen, I.R. (2004). Angiogenesis-inflammation cross-talk: vascular endothelial growth factor is secreted by activated T cells and induces Th1 polarization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 172, 4618–4623.
- Murakami, M., Iwai, S., Hiratsuka, S., Yamauchi, M., Nakamura, K., Iwakura, Y., and Shibuya, M. (2006). Signaling of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine kinase promotes rheumatoid arthritis through activation of monocytes/macrophages. *Blood* 108, 1849–1856.
- Murphy, S.R., LaMarca, B.B.D., Parrish, M., Cockrell, K., and Granger, J.P. (2013). Control of soluble fms-like tyrosine-1 (sFlt-1) production response to placental ischemia/hypoxia: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 304, R130–135.
- Nessa, A., Latif, S.A., Siddiqui, N.I., Hussain, M.A., Bhuiyan, M.R., Hossain, M.A., Akther, A., and Rahman, M. (2009). Angiogenesis-a novel therapeutic approach for ischemic heart disease. *Mymensingh Med. J. MMJ* 18, 264–272.
- Neufeld, G., Kessler, O., and Herzog, Y. (2002). The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 81–90.
- Nguyen, T.Q.H. (2009). Insuffisance rénale chronique:épidémiologie de l’insuffisance rénale chronique chez l’enfant à l’Hôpital National Pédiatrique de Hanoi et analyse histologique de l’expression du récepteur B1 de la bradykinine sur des biopsies de transplants rénaux. Université de Toulouse.
- Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R.F., Alitalo, K., and Eriksson, U. (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2576–2581.

- Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling — in control of vascular function. *Nat. Rev.* 7, 359–371.
- Onoue, K., Uemura, S., Takeda, Y., Somekawa, S., Iwama, H., Imagawa, K., Nishida, T., Morikawa, Y., Takemoto, Y., Asai, O., et al. (2009). Reduction of circulating soluble fms-like tyrosine kinase-1 plays a significant role in renal dysfunction-associated aggravation of atherosclerosis. *Circulation* 120, 2470–2477.
- Ortega, N., Hutchings, H., and Plouët, J. (1999). Signal relays in the VEGF system. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 4, D141–152.
- Page, C., Rose, M., Yacoub, M., and Pigott, R. (1992). Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* 141, 673–683.
- Paleolog, E.M. (2002). Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.* 4, S81–S90.
- Pan, Q., Chathery, Y., Wu, Y., Rathore, N., Tong, R.K., Peale, F., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Koch, A.W., and Watts, R.J. (2007). Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J. Biol. Chem.* 282, 24049–24056.
- Park, J.K., Jeong, J.W., Kang, M.Y., Baek, J.C., Shin, J.K., Lee, S.A., Choi, W.S., Lee, J.H., and Paik, W.Y. (2010). Inhibition of the PI3K-Akt pathway suppresses sFlt1 expression in human placental hypoxia models in vitro. *Placenta* 31, 621–629.
- Peichev, M., Naiyer, A.J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W.J., Williams, M., Oz, M.C., Hicklin, D.J., Witte, L., Moore, M.A., et al. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95, 952–958.
- Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 824–831.
- Pober, J.S. (1999). Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol. Res.* 19, 225–232.
- Pollard, P.J., Loenarz, C., Mole, D.R., McDonough, M.A., Gleadle, J.M., Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2008). Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha. *Biochem. J.* 416, 387–394.
- Poltorak, Z., Cohen, T., Sivan, R., Kandelis, Y., Spira, G., Vlodaysky, I., Keshet, E., and Neufeld, G. (1997). VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix. *J. Biol. Chem.* 272, 7151–7158.
- Pötgens, A.J., Lubsen, N.H., van Altena, M.C., Vermeulen, R., Bakker, A., Schoenmakers, J.G., Ruiters, D.J., and de Waal, R.M. (1994). Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations. *J. Biol. Chem.* 269, 32879–32885.
- Qiu, Y., Ferguson, J., Oltean, S., Neal, C.R., Kaura, A., Bevan, H., Wood, E., Sage, L.M., Lanati, S., Nowak, D.G., et al. (2010). Overexpression of VEGF165b in podocytes reduces glomerular permeability. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 21, 1498–1509.

- Quinn, T.P., Peters, K.G., De Vries, C., Ferrara, N., and Williams, L.T. (1993). Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 7533–7537.
- Rafii, S., Meeus, S., Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Shmelkov, S., Rafii, D., and Lyden, D. (2002). Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.* *13*, 61–67.
- Rahimi, N., Golde, T.E., and Meyer, R.D. (2009). Identification of Ligand-Induced Proteolytic Cleavage and Ectodomain Shedding of VEGFR-1/FLT1 in Leukemic Cancer Cells. *Cancer Res.* *69*, 2607–2614.
- Ramirez, R., Carracedo, J., Merino, A., Nogueras, S., Alvarez-Lara, M.A., Rodríguez, M., Martin-Malo, A., Tetta, C., and Aljama, P. (2007). Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney Int.* *72*, 108–113.
- Razakandrainibe, R., Combes, V., Grau, G.E., and Jambou, R. (2013). Crossing the wall: the opening of endothelial cell junctions during infectious diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *45*, 1165–1173.
- Redman, C.W.G., and Sargent, I.L. (2000). Placental Debris, Oxidative Stress and Pre-eclampsia. *Placenta* *21*, 597–602.
- Reinders, M.E.J., Sho, M., Izawa, A., Wang, P., Mukhopadhyay, D., Koss, K.E., Geehan, C.S., Luster, A.D., Sayegh, M.H., and Briscoe, D.M. (2003). Proinflammatory functions of vascular endothelial growth factor in alloimmunity. *J. Clin. Invest.* *112*, 1655–1665.
- Ribatti, D., Nico, B., and Crivellato, E. (2011). The role of pericytes in angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* *55*, 261–268.
- Robert, B., Zhao, X., and Abrahamson, D.R. (2000). Coexpression of neuropilin-1, Flk1, and VEGF(164) in developing and mature mouse kidney glomeruli. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *279*, F275–282.
- Roberts, W.G., and Palade, G.E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J. Cell Sci.* *108*, 2369–2379.
- Le Roux, S., Pepper, R.J., Dufay, A., Néel, M., Meffray, E., Lamandé, N., Rimbart, M., Josien, R., Hamidou, M., Hourmant, M., et al. (2012). Elevated soluble Flt1 inhibits endothelial repair in PR3-ANCA-associated vasculitis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *23*, 155–164.
- Saunders, W.B., Bohnsack, B.L., Faske, J.B., Anthis, N.J., Bayless, K.J., Hirschi, K.K., and Davis, G.E. (2006). Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *J. Cell Biol.* *175*, 179–191.
- Sawano, A., Iwai, S., Sakurai, Y., Ito, M., Shitara, K., Nakahata, T., and Shibuya, M. (2001). Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood* *97*, 785–791.

- Schmitz, V., Kornek, M., Hilbert, T., Dzienisowicz, C., Raskopf, E., Rabe, C., Sauerbruch, T., Qian, C., and Caselmann, W.-H. (2005). Treatment of metastatic colorectal carcinomas by systemic inhibition of vascular endothelial growth factor signaling in mice. *World J. Gastroenterol. WJG* *11*, 4332–4336.
- Schnaper, H.W., Barnathan, E.S., Mazar, A., Maheshwari, S., Ellis, S., Cortez, S.L., Baricos, W.H., and Kleinman, H.K. (1995). Plasminogen activators augment endothelial cell organization in vitro by two distinct pathways. *J. Cell. Physiol.* *165*, 107–118.
- Schreiber, A., Xiao, H., Jennette, J.C., Schneider, W., Luft, F.C., and Kettritz, R. (2009). C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *20*, 289–298.
- Searle, J., Mockel, M., Gwosc, S., Datwyler, S.A., Qadri, F., Albert, G.I., Holert, F., Isbruch, A., Klug, L., Muller, D.N., et al. (2011). Heparin Strongly Induces Soluble Fms-Like Tyrosine Kinase 1 Release In Vivo and In Vitro—Brief Report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 2972–2974.
- Sela, S., Itin, A., Natanson-Yaron, S., Greenfield, C., Goldman-Wohl, D., Yagel, S., and Keshet, E. (2008). A novel human-specific soluble vascular endothelial growth factor receptor 1: cell-type-specific splicing and implications to vascular endothelial growth factor homeostasis and preeclampsia. *Circ. Res.* *102*, 1566–1574.
- Sela, S., Natanson-Yaron, S., Zcharia, E., Vlodaysky, I., Yagel, S., and Keshet, E. (2011). Local Retention Versus Systemic Release of Soluble VEGF Receptor-1 Are Mediated by Heparin-Binding and Regulated by Heparanase Novelty and Significance. *Circ. Res.* *108*, 1063–1070.
- Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., and Dvorak, H.F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* *219*, 983–985.
- Sester, U., Sester, M., Heine, G., Kaul, H., Girndt, M., and Köhler, H. (2001). Strong depletion of CD14(+)CD16(+) monocytes during haemodialysis treatment. *Nephrol. Dial. Transplant. Off. Publ. Eur. Dial. Transpl. Assoc. - Eur. Ren. Assoc.* *16*, 1402–1408.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* *376*, 62–66.
- Shi, Q., Rafii, S., Wu, M.H.-D., Wijelath, E.S., Yu, C., Ishida, A., Fujita, Y., Kothari, S., Mohle, R., Sauvage, L.R., et al. (1998). Evidence for Circulating Bone Marrow-Derived Endothelial Cells. *Blood* *92*, 362–367.
- Shibuya, M. (2001). Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *33*, 409–420.
- Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* *359*, 843–845.

- Sison, K., Eremina, V., Baelde, H., Min, W., Hirashima, M., Fantus, I.G., and Quaggin, S.E. (2010). Glomerular Structure and Function Require Paracrine, Not Autocrine, VEGF-VEGFR-2 Signaling. *J. Am. Soc. Nephrol.* *21*, 1691–1701.
- Slavin, J. (1995). Fibroblast growth factors: at the heart of angiogenesis. *Cell Biol. Int.* *19*, 431–444.
- Sneddon, J.M., and Vane, J.R. (1988). Endothelium-derived relaxing factor reduces platelet adhesion to bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *85*, 2800–2804.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* *92*, 735–745.
- Soker, S., Miao, H.-Q., Nomi, M., Takashima, S., and Klagsbrun, M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J. Cell. Biochem.* *85*, 357–368.
- Sörensson, J., Fierlbeck, W., Heider, T., Schwarz, K., Park, D.S., Mundel, P., Lisanti, M., and Ballermann, B.J. (2002). Glomerular endothelial fenestrae in vivo are not formed from caveolae. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *13*, 2639–2647.
- Stan, R.V. (2007). Endothelial stomatal and fenestral diaphragms in normal vessels and angiogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* *11*, 621–643.
- Stern, D., Brett, J., Harris, K., and Nawroth, P. (1986). Participation of endothelial cells in the protein C-protein S anticoagulant pathway: the synthesis and release of protein S. *J. Cell Biol.* *102*, 1971–1978.
- Stern, D.M., Esposito, C., Gerlach, H., Gerlach, M., Ryan, J., Handley, D., and Nawroth, P. (1991). Endothelium and Regulation of Coagulation. *Dia Care* *14*, 160–166.
- Stratman, A.N., Malotte, K.M., Mahan, R.D., Davis, M.J., and Davis, G.E. (2009). Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood* *114*, 5091–5101.
- Sugimoto, H., Hamano, Y., Charytan, D., Cosgrove, D., Kieran, M., Sudhakar, A., and Kalluri, R. (2003). Neutralization of Circulating Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by Anti-VEGF Antibodies and Soluble VEGF Receptor 1 (sFlt-1) Induces Proteinuria. *J. Biol. Chem.* *278*, 12605–12608.
- Sun, Z., Li, X., Massena, S., Kutschera, S., Padhan, N., Gualandi, L., Sundvold-Gjerstad, V., Gustafsson, K., Choy, W.W., Zang, G., et al. (2012). VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSA. *J. Exp. Med.* *209*, 1363–1377.
- Swendeman, S., Mendelson, K., Weskamp, G., Horiuchi, K., Deutsch, U., Scherle, P., Hooper, A., Rafii, S., and Blobel, C.P. (2008). VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Circ. Res.* *103*, 916–918.

- Tarone, G., Stefanuto, G., Mascarello, P., Defilippi, P., Altruda, F., and Silengo, L. (1990). Expression of receptors for extracellular matrix proteins in human endothelial cells. *J. Lipid Mediat. 2 Suppl*, S45–53.
- Tessler, S., Rockwell, P., Hicklin, D., Cohen, T., Levi, B.Z., Witte, L., Lemischka, I.R., and Neufeld, G. (1994). Heparin modulates the interaction of VEGF165 with soluble and cell associated flk-1 receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 12456–12461.
- Thadhani, R., Kisner, T., Hagmann, H., Bossung, V., Noack, S., Schaarschmidt, W., Jank, A., Kribs, A., Cornely, O.A., Kreyssig, C., et al. (2011). Pilot study of extracorporeal removal of soluble fms-like tyrosine kinase 1 in preeclampsia. *Circulation* 124, 940–950.
- Thomas, C.P., Andrews, J.I., and Liu, K.Z. (2007). Intronic polyadenylation signal sequences and alternate splicing generate human soluble Flt1 variants and regulate the abundance of soluble Flt1 in the placenta. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 3885–3895.
- Thomas, C.P., Andrews, J.I., Raikwar, N.S., Kelley, E.A., Herse, F., Dechend, R., Golos, T.G., and Liu, K.Z. (2009). A recently evolved novel trophoblast-enriched secreted form of fms-like tyrosine kinase-1 variant is up-regulated in hypoxia and preeclampsia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 2524–2530.
- Thomas, C.P., Raikwar, N.S., Kelley, E.A., and Liu, K.Z. (2010). Alternate processing of Flt1 transcripts is directed by conserved cis-elements within an intronic region of FLT1 that reciprocally regulates splicing and polyadenylation. *Nucleic Acids Res.* 38, 5130–5140.
- Van Timmeren, M.M., Chen, M., and Heeringa, P. (2009). Review article: Pathogenic role of complement activation in anti-neutrophil cytoplasmic auto-antibody-associated vasculitis. *Nephrology* 14, 16–25.
- Tirand, L. (2007). Ciblage de neuropiline-1, co-récepteur du VEGF, pour potentialiser l'effet anti-vasculaire de la Thérapie Photodynamique Une étude de stabilité de la molécule conjuguée a été réalisée in vitro et in vivo. Si le peptide est relativement stable jusqu'à 4h après injection intraveineuse in vivo, l'utilisation de pseudo-peptides plus résistants aux peptidases permettrait une efficacité encore supérieure. Université Henri Poincaré - Nancy I.
- Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J.C., and Abraham, J.A. (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J. Biol. Chem.* 266, 11947–11954.
- Tsao, P.-N., Chan, F.-T., Wei, S.-C., Hsieh, W.-S., Chou, H.-C., Su, Y.-N., Chen, C.-Y., Hsu, W.-M., Hsieh, F.-J., and Hsu, S.-M. (2007). Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 protects mice in sepsis. *Crit. Care Med.* 35, 1955–1960.
- Unemori, E.N., Ferrara, N., Bauer, E.A., and Amento, E.P. (1992). Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 153, 557–562.

- Venkatesha, S., Toporsian, M., Lam, C., Hanai, J., Mammoto, T., Kim, Y.M., Bdolah, Y., Lim, K.-H., Yuan, H.-T., Libermann, T.A., et al. (2006). Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat. Med.* *12*, 642–649.
- Veron, D., Reidy, K.J., Bertuccio, C., Teichman, J., Villegas, G., Jimenez, J., Shen, W., Kopp, J.B., Thomas, D.B., and Tufro, A. (2010). Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice causes glomerular disease. *Kidney Int.* *77*, 989–999.
- Verrax, J., Defresne, F., Lair, F., Vandermeulen, G., Rath, G., Dessy, C., Pr at, V., and Feron, O. (2011). Delivery of soluble VEGF receptor 1 (sFlt1) by gene electrotransfer as a new antiangiogenic cancer therapy. *Mol. Pharm.* *8*, 701–708.
- Villegas, G., Lange-Sperandio, B., and Tufro, A. (2005). Autocrine and paracrine functions of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells. *Kidney Int.* *67*, 449–457.
- Walshe, T.E., Dole, V.S., Maharaj, A.S.R., Patten, I.S., Wagner, D.D., and D'Amore, P.A. (2009). Inhibition of VEGF or TGF- $\beta$  signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 1185–1192.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., and Heldin, C.H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* *269*, 26988–26995.
- Waltenberger, J., Mayr, U., Pentz, S., and Hombach, V. (1996). Functional Upregulation of the Vascular Endothelial Growth Factor Receptor KDR by Hypoxia. *Circulation* *94*, 1647–1654.
- Wang, D., Donner, D.B., and Warren, R.S. (2000). Homeostatic modulation of cell surface KDR and Flt1 expression and expression of the vascular endothelial cell growth factor (VEGF) receptor mRNAs by VEGF. *J. Biol. Chem.* *275*, 15905–15911.
- Wang, W., Irani, R.A., Zhang, Y., Ramin, S.M., Blackwell, S.C., Tao, L., Kellems, R.E., and Xia, Y. (2012). Autoantibody-Mediated Complement C3a Receptor Activation Contributes to the Pathogenesis of Preeclampsia. *Hypertension* *60*, 712–721.
- Werther, K., Christensen, I.J., and Nielsen, H.J. (2002). Determination of vascular endothelial growth factor (VEGF) in circulating blood: significance of VEGF in various leucocytes and platelets. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* *62*, 343–350.
- Woolard, J., Wang, W.-Y., Bevan, H.S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R.O., Cui, T.-G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., et al. (2004). VEGF165b, an Inhibitory Vascular Endothelial Growth Factor Splice Variant Mechanism of Action, In vivo Effect On Angiogenesis and Endogenous Protein Expression. *Cancer Res.* *64*, 7822–7835.
- Woywodt, A., Streiber, F., Degroot, K., Regelsberger, H., Haller, H., and Haubitz, M. (2003). Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *The Lancet* *361*, 206–210.
- Wu, L.-W., Mayo, L.D., Dunbar, J.D., Kessler, K.M., Baerwald, M.R., Jaffe, E.A., Wang, D., Warren, R.S., and Donner, D.B. (2000). Utilization of Distinct Signaling Pathways by

- Receptors for Vascular Endothelial Cell Growth Factor and Other Mitogens in the Induction of Endothelial Cell Proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 5096–5103.
- Xiao, H., Heeringa, P., Hu, P., Liu, Z., Zhao, M., Aratani, Y., Maeda, N., Falk, R.J., and Jennette, J.C. (2002). Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J. Clin. Invest.* 110, 955–963.
- Xiong, Y., Hu, Z., Han, X., Jiang, B., Zhang, R., Zhang, X., Lu, Y., Geng, C., Li, W., He, Y., et al. (2013). Hypertensive stretch regulates endothelial exocytosis of Weibel-Palade bodies through VEGF receptor 2 signaling pathways. *Cell Res.*
- Xu, Y., Yuan, L., Mak, J., Pardanaud, L., Caunt, M., Kasman, I., Larrivé, B., Del Toro, R., Suchting, S., Medvinsky, A., et al. (2010). Neuropilin-2 mediates VEGF-C-induced lymphatic sprouting together with VEGFR3. *J. Cell Biol.* 188, 115–130.
- Yan, X., Cai, S., Xiong, X., Sun, W., Dai, X., Chen, S., Ye, Q., Song, Z., Jiang, Q., and Xu, Z. (2012). Chemokine receptor CXCR7 mediates human endothelial progenitor cells survival, angiogenesis, but not proliferation. *J. Cell. Biochem.* 113, 1437–1446.
- Yang, W., Ahn, H., Hinrichs, M., Torry, R.J., and Torry, D.S. (2003). Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J. Reprod. Immunol.* 60, 53–60.
- Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., and Kuwano, M. (1997). Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4015.
- Yuan, J., Guo, Q., Qureshi, A.R., Anderstam, B., Eriksson, M., Heimbürger, O., Bárány, P., Stenvinkel, P., and Lindholm, B. (2013). Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptor 1 (sVEGFR-1) are associated with inflammation and mortality in incident dialysis patients. *Nephrol. Dial. Transplant.* 28, 2356–2363.
- Zhang, Z., Neiva, K.G., Lingen, M.W., Ellis, L.M., and Nör, J.E. (2010). VEGF-dependent tumor angiogenesis requires inverse and reciprocal regulation of VEGFR1 and VEGFR2. *Cell Death Differ.* 17, 499–512.
- Zhu, C., Xiong, Z., Chen, X., Lu, Z., Zhou, G., Wang, D., Bao, J., and Hu, X. (2011). Soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 inhibits migration of human monocytic THP-1 cells in response to VEGF. *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc.* 60, 769–774.

# ANNEXE

---

## **Elevated soluble Flt1 inhibits endothelial repair in PR3-ANCA-associated vasculitis.**

*Le Roux, S., Pepper, R.J., Dufay, A., Néel, M., Meffray, E., Lamandé, N., Rimbert, M., Josien, R., Hamidou, M., Hourmant, M., Cook, H.T., Charreau, B., Larger, E. Salama, A.D., Fakhouri, F.*

**J. Am. Soc. Nephrol. (2012). 23, 155–164**

## Elevated Soluble Flt1 Inhibits Endothelial Repair in PR3-ANCA-Associated Vasculitis

Sandrine Le Roux,<sup>\*†‡</sup> Ruth J. Pepper,<sup>§</sup> Alexandre Dufay,<sup>†</sup> Mélanie Néel,<sup>\*†‡</sup> Emmanuelle Meffray,<sup>\*†‡</sup> Noël Lamandé,<sup>||</sup> Marie Rimbart,<sup>\*¶</sup> Régis Josien,<sup>\*¶||</sup> Mohamed Hamidou,<sup>‡\*\*</sup> Maryvonne Hourmant,<sup>\*†‡</sup> H. Terence Cook,<sup>††</sup> Béatrice Charreau,<sup>\*†‡</sup> Etienne Larger,<sup>||</sup> Alan D. Salama,<sup>§</sup> and Fadi Fakhouri<sup>\*†‡</sup>

<sup>\*</sup>INSERM UMR 643, Nantes, France; <sup>†</sup>Institute of Transplantation Urology Nephrology, Nephrology Department, CHU Nantes, Nantes, France; <sup>‡</sup>Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France; <sup>§</sup>Centre for Nephrology, University College London, Royal Free Hospital, London, United Kingdom; <sup>||</sup>INSERM 833, Collège de France, Paris, France; <sup>¶</sup>Immunology Laboratory, CHU de Nantes, Nantes, France; <sup>\*\*</sup>Internal Medicine Department, CHU de Nantes, Nantes, France; and <sup>††</sup>Centre for Complement and Inflammation Research, Imperial College, London, United Kingdom

### ABSTRACT

Antineutrophil cytoplasmic antibody (ANCA)-associated vasculitis exhibits endothelial damage, but the capacity for vessel repair in this disorder is not well understood. Here, we observed a marked increase in serum levels of soluble Flt1 (sFlt1), a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor, in patients with active ANCA-associated vasculitis compared with patients during remission and other controls. Serum levels of sFlt1 correlated with C5a, an anaphylatoxin released after complement activation. Serum from patients with acute ANCA-associated vasculitis disrupted blood flow in the chicken chorioallantoic membrane assay, suggesting an antiangiogenic effect. Preincubation with excess human vascular endothelial growth factor prevented this effect. Anti-proteinase-3 (PR3) mAb and serum containing PR3-ANCA from patients with active vasculitis both induced a significant and sustained release of sFlt1 from monocytes, whereas anti-myeloperoxidase (MPO) mAb or polyclonal antibodies did not. However, the serum containing polyclonal PR3-ANCA did not induce release of sFlt1 from cultured human umbilical vein endothelial cells. In summary, these data suggest that anti-PR3 antibodies, and to a much lesser extent anti-MPO antibodies, increase sFlt1 during acute ANCA-associated vasculitis, leading to an antiangiogenic state that hinders endothelial repair.

*J Am Soc Nephrol* 23: 155–164, 2012. doi: 10.1681/ASN.2010080858

Antineutrophil cytoplasm antibody (ANCA)-associated vasculitides (AAVs) are a group of necrotizing small vessel vasculitides that include Wegener's granulomatosis, microscopic polyangiitis, and Churg-Strauss syndrome. Frequent manifestations of ANCA-associated vasculitis include crescentic GN and alveolar hemorrhage, both of which are due to necrotizing capillaritis. ANCA-associated vasculitis is characterized by the presence of autoantibodies directed against neutrophil antigens, specifically myeloperoxidase (MPO) and proteinase-3 (PR3) (termed MPO-ANCA and PR3-ANCA, respectively). In addition, a potential novel ANCA autoantigen, lysosomal membrane associated protein-2, was recently described.<sup>1,2</sup> Accumulating data demonstrate the

pathogenic roles of ANCA *in vivo* and *in vitro* in priming neutrophils and initiating endothelial damage. ANCA activate neutrophils<sup>3</sup> and monocytes

Received August 19, 2010. Accepted August 28, 2011.

S.L.R. and R.J.P. contributed equally to this work.

A.D.S. and F.F. are senior co-authors.

Published online ahead of print. Publication date available at [www.jasn.org](http://www.jasn.org).

**Correspondence:** Dr. Fadi Fakhouri, ITUN, U643, Department of Nephrology and Immunology, CHU de Nantes, 44000 Nantes, France. Email: [fadi.fakhouri@univ-nantes.fr](mailto:fadi.fakhouri@univ-nantes.fr)

Copyright © 2012 by the American Society of Nephrology

*in vitro*,<sup>4</sup> promoting their degranulation and respiratory burst<sup>5</sup> as well as stimulating upregulation of adhesion molecules that lead to their augmented endothelial rolling, adhesion, and cell transmigration.<sup>6,7</sup> Immunization of MPO-deficient mice with murine MPO *in vivo* leads to the development of MPO-ANCA, which are sufficient to passively transfer disease to naïve recipients, with the development of necrotizing renal and pulmonary vasculitis.<sup>8</sup> In a distinct autoimmune animal model, susceptible rats immunized with human MPO develop vasculitis, pulmonary capillaritis, and focal necrotizing GN in association with MPO-ANCA.<sup>9</sup> Similarly, a new model of disease induced by anti-PR3 antibodies was recently reported.<sup>10</sup> Finally, the results of a single case report demonstrated the pathogenicity of MPO-ANCA in human patients after the transplacental transfer of anti-MPO antibodies to a newborn.<sup>11</sup>

ANCA ultimately cause endothelial damage by activating circulating leukocytes and releasing various proteases, and the number of detached apoptotic endothelial cells in the circulation seems to correlate with disease activity in patients with AAV.<sup>12</sup> Moreover, the number of circulating CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells and, to a lesser extent, endothelial progenitor cells, which may contribute to the repair of damaged microvasculature, tend to increase during the remission phases of AAV.<sup>13,14</sup> Despite increased understanding of angiogenesis and the critical role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in mediating vessel repair, little is known regarding the regulation of endothelial cell survival and vessel regeneration in patients with AAV.

VEGF is the most potent growth factor for endothelial cells, and it promotes endothelial cell proliferation and neovasculogenesis and prevents endothelial cell apoptosis. There are various VEGF isoforms that result from alternative splicing, with VEGF 121 and 167 being the most important isoforms in humans.<sup>15,16</sup> Similarly, several types of VEGF receptors were identified, with VEGF-R1 and VEGF-R2 being the two main receptors. Soluble Flt1 (sFlt1), a circulating form of VEGF-R1 that lacks the transmembrane domain of the intact protein, results from an alternative splicing of VEGF-R1 and also likely results from the cleavage of membrane-bound Flt1 ectodomain by the disintegrin and metalloproteinase/TNF- $\alpha$ -converting enzyme (ADAM/TACE) family of metalloproteases.<sup>17</sup> sFlt1 is mainly secreted by monocytes,<sup>18,19</sup> endothelial cells, and placental cytotrophoblasts<sup>20</sup> and displays potent inhibitory effects on VEGF. Elevated levels of sFlt1 lead to functional VEGF deficiency and promote an effective antiangiogenic state, which may be of significant clinical importance, as demonstrated by the association of elevated serum sFlt1 levels with placental vascular dysfunction and preeclampsia.<sup>21,22</sup> Moreover, there is a close association between sFlt1 production and inflammation, which was demonstrated in a murine model of repeated fetal loss in which sFlt1 release was promoted through complement activation, specifically the anaphylatoxin C5a.<sup>23</sup> A study using a murine model of retinopathy of prematurity underscored the link between C5a and angiogenesis through the augmented secretion of sFlt1 by monocytes.<sup>24</sup>

In this study, we assessed the role of sFlt1 in patients with AAV, diseases characterized by monocyte activation and in which alternative complement components have been implicated in their pathophysiology. We measured sFlt1 serum levels in patients with AAV at different disease points and investigated whether increased sFlt1 leads to an effective antiangiogenic state in these individuals.

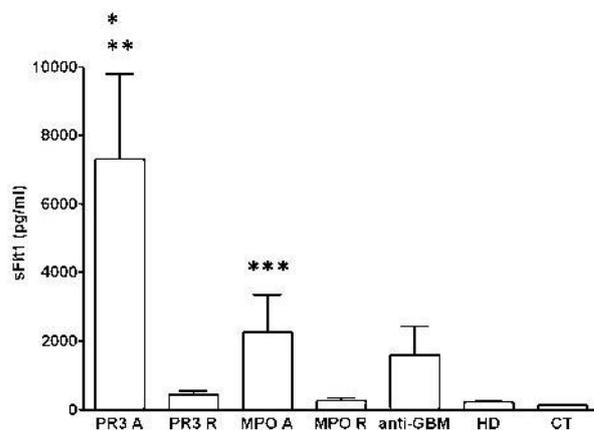
## RESULTS

### Circulating sFlt1 Levels

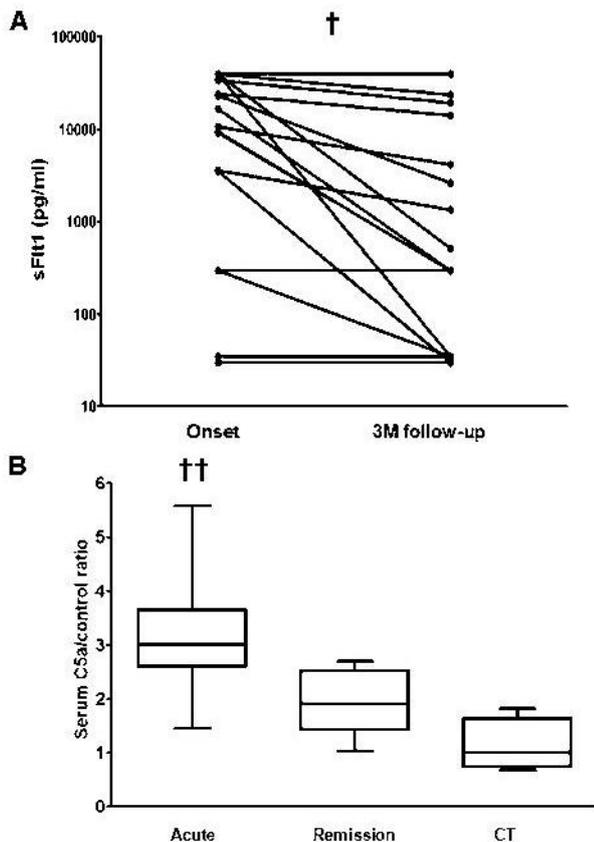
Circulating sFlt1 levels were significantly increased during acute ANCA-associated vasculitis in patients with PR3-ANCA (mean, 7304 pg/ml; range, 321–47,355 pg/ml) and MPO-ANCA (2242 pg/ml; range, 31–16,851 pg/ml) compared with controls (120 pg/ml; range, 82–168 pg/ml) (PR3-ANCA versus controls,  $P < 0.0001$ ; MPO-ANCA versus controls,  $P < 0.001$ ) and with hemodialysis patients (214 pg/ml; range, 66–282 pg/ml) (PR3-ANCA versus hemodialysis controls,  $P < 0.001$ ) (Figure 1). sFlt1 levels in patients with anti-GBM disease were increased but did not significantly differ from controls (1584 pg/ml; range, 82–7642 pg/ml;  $P = 0.054$  versus controls). sFlt1 levels decreased significantly during disease remission in patients with PR3-ANCA (429 pg/ml; range, 46–2467 pg/ml) and MPO-ANCA (263 pg/ml; range, 77–696 pg/ml) and were not significantly different from healthy controls.

In 18 patients with paired sFlt1 measurements, there was a significant decrease in sFlt1 between the acute disease and remission samples taken 3 months after disease onset (Figure 2A) ( $P = 0.0026$ , paired  $t$  test).

Serum sFlt1 correlated with the degree of proteinuria ( $r^2 = 0.35$ ;  $P < 0.01$ ) but did not correlate with the percentage of crescents in



**Figure 1.** Serum sFlt1 levels in patients with PR3- and MPO-associated vasculitis during acute disease or during disease remission. A, acute disease; CT, healthy controls; GBM, patients with anti-GBM disease; HD, hemodialysis patients; R, remission. \* $P < 0.0001$  for PR3 A versus CT, and \*\* $P < 0.001$  for PR3 A versus PR3 R, MPO R, and HD. \*\*\* $P < 0.001$  for MPO A versus CT.



**Figure 2.** Serum sFlt1 levels are increased during acute PR3-associated vasculitis. (A) Serum sFlt1 levels (log scale) in 18 patients with PR3-associated vasculitis at the disease onset and at 3-month follow-up.  $^{\dagger}P=0.0026$ , paired t test. (B) Serum C5a levels in acute and remission ANCA-associated vasculitis samples and from healthy controls demonstrating significantly elevated levels in acute disease compared with disease remission and those found in healthy controls. CT, healthy controls.  $^{\dagger\dagger}P=0.001$  for ANCA-associated vasculitis acute versus remission and controls.

kidney biopsies performed in 12 patients with ANCA-associated vasculitis for whom serum samples and renal tissue were synchronously available.

### Serum C5a Levels

Serum C5a levels were significantly elevated in acute PR3-ANCA samples (290% of normal) and MPO-ANCA (180% of normal) samples compared with healthy controls and the paired remission PR3-ANCA and MPO-ANCA samples ( $P=0.001$ , one-way ANOVA) (Figure 2B). C5a levels correlated with sFlt1 levels ( $r^2=0.337$ ,  $P=0.026$ , one-tailed Spearman rank test).

### Chorioallantoic Membrane Assay

We used the chorioallantoic membrane (CAM) assay, a well established model of angiogenesis, to determine whether the increase in sFlt1 serum levels in AAV patients leads to an antiangiogenic state.

Serum from patients with acute PR3-ANCA-associated vasculitis ( $n=5$ ) displayed a clear effect in the CAM assay, with early disruption of blood flow (Figure 3, A and B). The effect was detected as early as 1 hour after serum was laid upon the CAM and was maximal at 3 hours (Figure 3I). PBS and serum from healthy controls ( $n=5$ ) had no effect in the CAM assay (Figure 3, C and D).

Serum from one patient with acute PR3 vasculitis was filtered using a semipermeable membrane with a cut-off of 10 kD. The filtrate, containing molecules with molecular mass  $<10$  kD, did not display any effect in the CAM assay, whereas the concentrate containing molecules with a molecular mass  $>10$  kD (which would include sFlt1) had the same effect as unseparated serum on CAM microvasculature (Figure 3, E and F). Serum from patients with acute PR3-ANCA-associated vasculitis ( $n=2$ ) was tested in the CAM model with and without prior incubation (2 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ ) with an excess of recombinant human VEGF. Preincubation of patients' serum with VEGF reversed the effect of the serum in the CAM assay (Figure 3, G and H).

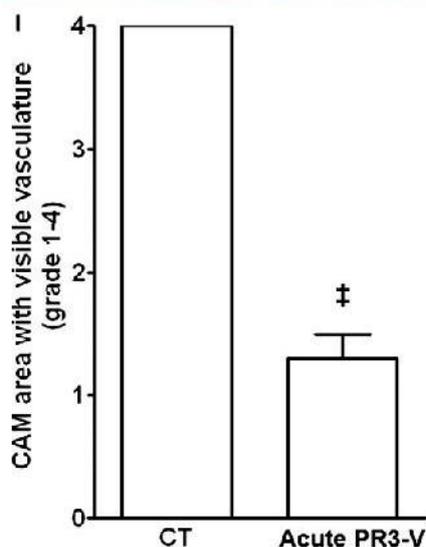
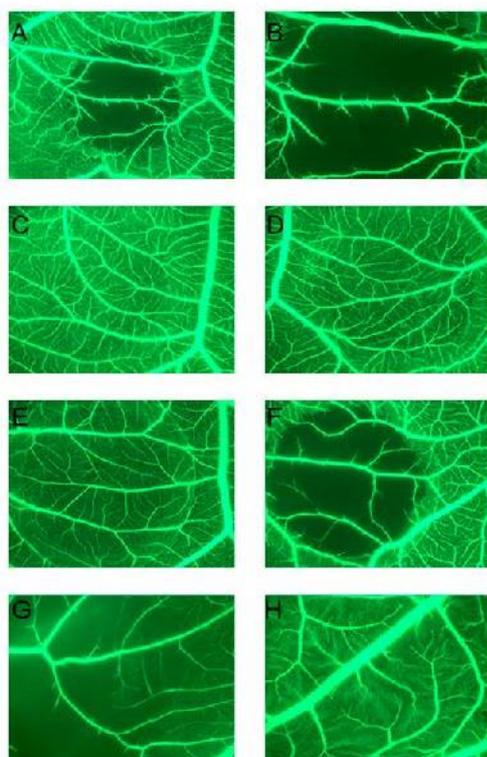
### Effect of C5a and Anti-PR3 mAb on sFlt1 Secretion by Monocytes *In Vitro*

We aimed to assess whether sFlt1 secretion by monocytes was stimulated by the complement anaphylatoxin, C5a, or by anti-PR3 or anti-MPO antibodies. Human monocytes were stimulated with  $\text{TNF-}\alpha$  (1000 U/ml) for 45 minutes and incubated for 2, 4, 8, and 16 hours with one of the following: (1) anti-PR3 mAb with or without further addition of C5a (10 nM) for 2 hours; (2) anti-MPO mAb with or without further addition of C5a (10 nM) for 2 hours; (3) polyclonal anti-MPO IgG purified from 3 patients with MPO-ANCA-associated vasculitis with or without further addition of C5a (10 nM) for 2 hours; or (4) human recombinant C5a at increasing concentrations of 10, 25, 50, and 100 nM.

$\text{TNF-}\alpha$  *per se* did not induce any sFlt1 secretion by monocytes. Similarly, C5a failed to induce a significant sFlt1 release by monocytes at any concentration or time point, despite detection of the C5a receptor on the surface of human monocytes by flow cytometry (data not shown).

Anti-PR3 mAb induced sFlt1 release by monocytes as early as 4 hours after incubation. sFlt1 levels peaked at 8 hours and remained significantly increased at 16 hours of incubation (Figure 4A). Anti-MPO mAb induced a lesser and more delayed (detectable only at 16 hours) increase in sFlt1 release from monocytes compared with anti-PR3 antibody (Figure 4B). A very mild increase in sFlt1 levels was detected after incubation of monocytes with polyclonal anti-MPO IgG (Figure 4C).

We then tested whether sFlt1 release by monocytes upon stimulation with anti-PR3 antibodies arises at least in part from the cleavage of membrane-bound Flt1 ectodomain caused by the ADAM/TACE family of metalloproteases. Preincubation of monocytes with a metalloproteases inhibitor, GM6001, partially blunted sFlt1 release by monocytes stimulated with anti-PR3 mAb (Figure 5).



**Figure 3.** Serum from acute PR3-associated vasculitis disrupts blood flow in the CAM microvasculature. Representative pictures of distinct CAM areas treated with the following: (1) serum from a patient with acute PR3-associated vasculitis (A, original magnification,  $\times 31.25$  and B, original magnification,  $\times 34$ ); (2) PBS (C, original magnification,  $\times 31.25$ ); (3) healthy control serum (D, original magnification,  $\times 31.25$ ); (4) low molecular (10 kD) (E, original magnification,  $\times 31.25$ ) or high molecular (0.010 kD) (F, original magnification,  $\times 31.25$ ) mass fraction of the serum from a patient with acute PR3-associated vasculitis; and (5) serum from a patient with acute PR3-ANCA-associated vasculitis without (G, original magnification,  $\times 34$ ) or with preincubation (H, original magnification,  $\times 34$ ) with human recombinant VEGF. (I) Semi-quantification of the effect of acute anti-PR3-associated vasculitis

### Effect of Serum on sFlt1 Secretion by Human Monocytes *In Vitro*

On the basis of previous results with ANCA *in vitro*, we aimed to assess the effect of patients' sera on sFlt1 release by monocytes. After 16 hours of incubation with serum from patients with acute PR3-ANCA-associated vasculitis ( $n=12$ ), human monocytes increased sFlt1 secretion compared with serum obtained during disease remission or from healthy controls (Figure 6) ( $P<0.001$ ). Serum obtained during PR3-AAV remission did not significantly increase sFlt1 secretion by monocytes compared with control serum ( $P>0.05$ ).

Serum from patients with acute MPO-associated vasculitis ( $n=6$ ) did not induce any significant sFlt1 release by monocytes after 16 hours of incubation.

### Study of sFlt1 Isoforms Released by Monocytes *In Vitro*

Four distinct sFlt1 isoforms were previously reported in several organs, including the placenta. Using real-time quantitative PCR, we tested for the presence of the four various isoforms' transcripts in monocytes at baseline and after incubation for 2 hours with anti-PR3 antibodies. Isoforms 1 and 2 were predominant, whereas transcripts of isoforms 3 and 4 were barely detectable (Figure 7).

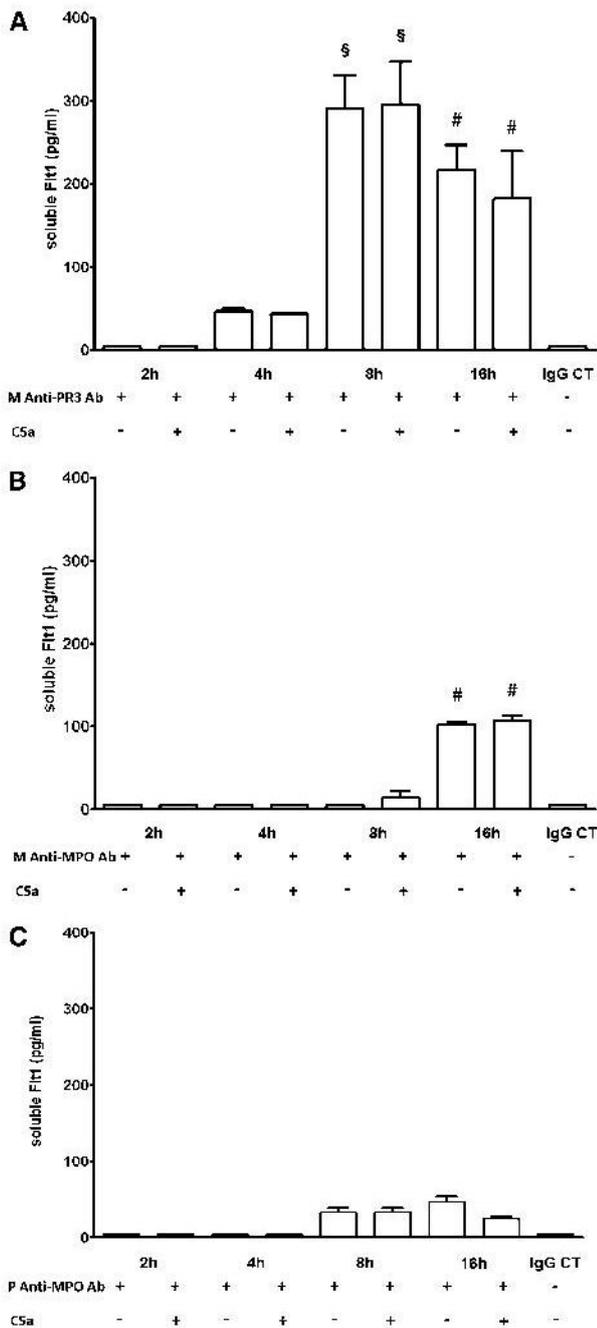
### Effect of Serum on sFlt1 Secretion by Human Umbilical Vein Endothelial Cells *In Vitro*

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) constitutively secrete sFlt1 *in vitro* (Figure 8). Incubation for 2, 8, and 16 hours of HUVECs with anti-PR3 mAb, C5a, or serum from patients with acute PR3-ANCA-associated vasculitis did not significantly increase sFlt1 secretion by HUVECs *in vitro* compared with control serum ( $P>0.05$ ) (Figure 8).

## DISCUSSION

The pathologic hallmark of AAV is an intense necrotizing capillaritis. Treatment of patients with AAV is aimed at suppressing cellular- and humoral-mediated damage by using corticosteroids and immunosuppressive drugs, as well as additional plasma exchange in more severe cases.<sup>25–28</sup> However, despite intense treatment, the initial endothelial insult often progresses to chronic vascular damage that translates into irreversible organ damage, primarily CKD. Currently, we do not specifically target endothelial damage or promote vascular repair. In a recent study, one of four patients with ANCA-associated vasculitis and renal involvement reached

or control (CT) sera on the microvasculature of the treated CAM area. The effect was graded from 1 to 4 depending on the area of the treated CAM in which microvasculature was still visible 3 hours after the deposition of serum: grade 1 (0%–25% of total treated area), grade 2 (26%–50%), grade 3 (51%–75%), and grade 4 (76%–100%). <sup>†</sup> $P<0.0002$ , paired t test.



**Figure 4.** Monoclonal anti-PR3 antibody induces sFlt1 release from monocytes. (A) An anti-PR3 mAb ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) induced sFlt1 release by human monocytes as early as 4 hours of incubation. sFlt1 release peaked at 8 hours and remained significantly increased at 16 hours. Further addition of C5a ( $10 \text{ nM}$ ) for 2 hours did not alter sFlt1 release. Data are from five independent experiments. CT, isotype-matched control.  $^{\S}P < 0.001$  versus 2-hour, 4-hour, and IgG isotype-matched control (CT) groups.  $^{\#}P < 0.01$  versus 2-hour, 4-hour, and IgG CT groups. (B) An anti-MPO mAb ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) induced a mild sFlt1 release by human monocytes only after 16 hours of incubation. Further addition of C5a ( $10 \text{ nM}$ ) for 2 hours did not alter sFlt1 release. Data are from three to four independent experiments.  $^{\#}P < 0.01$  versus 2-hour, 4-hour, and IgG

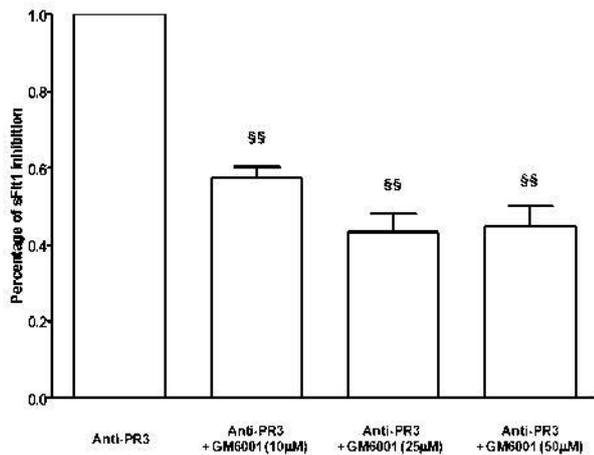
ESRD; in almost half of the patients, this was because of the progression of chronic renal scars without active vasculitis.<sup>29</sup> These findings suggest that endothelial cell survival and neo-vasculogenesis during the acute phase of ANCA-associated vasculitis are likely crucial to avoiding long-term organ failure.

To our knowledge, this is the first study to address the issue of antiangiogenic factors in AAV, and our results clearly demonstrate that an increase in serum antiangiogenic factors occurs during the acute phase of ANCA-associated vasculitis. Circulating levels of sFlt1, a potent VEGF inhibitor, were significantly increased during acute ANCA-associated vasculitis and this increase was most marked in patients with PR3-ANCA. The more chronic lesions seen in MPO-ANCA-associated disease, which frequently manifests with more scarring at presentation,<sup>30</sup> may suggest that the peak effect in MPO-ANCA-associated disease may have preceded the clinical presentation. sFlt1 serum levels were also increased in anti-GBM disease, which is another form of antibody-mediated renal capillaritis, even though the difference compared with controls did not reach statistical significance, which is most likely because of the limited number of patients with anti-GBM disease included in this study. However, this finding suggests that an increase in sFlt1 release, and hence a possible antiangiogenic state, may occur in various disorders that primarily target the vasculature and are mediated through monocyte/macrophage effectors.

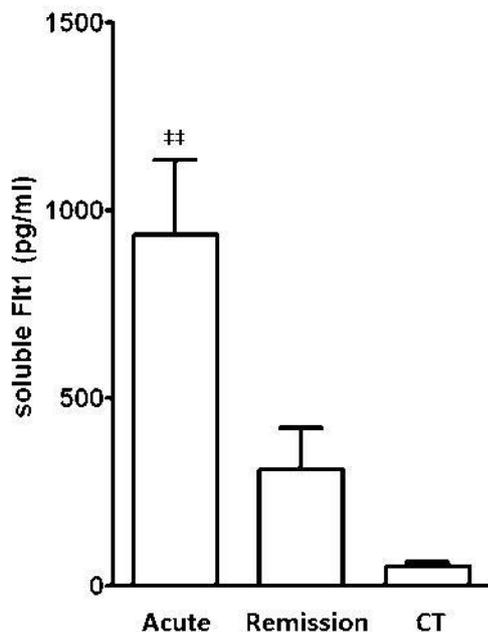
Serum from patients with acute PR3-ANCA-associated vasculitis displayed a rapid (as early as 1 hour) and very significant effect in the CAM assay, a well-established model of angiogenesis. Deposition of serum from patients with acute PR3-ANCA-associated vasculitis led to the near complete disruption of the microvasculature in the treated area of the CAM. This effect was dependent on proteins with high molecular mass ( $>10 \text{ kD}$ ) and was completely reversed by adding excess human VEGF. CAM microvasculature integrity is highly dependent on VEGF, as underscored by previous studies with a VEGF-receptor tyrosine kinase inhibitor or with avastin, an anti-VEGF antibody.<sup>31,32</sup>

sFlt1 is primarily secreted by monocytes, endothelial cells, and placenta cells. Endothelial cells and monocytes are critical players in the genesis of ANCA vasculitis. In kidney biopsies from patients with acute ANCA-associated GN, monocytes (and not neutrophils) constitute the dominant glomerular-infiltrating cells and their number correlates with the degree of glomerular necrosis, crescents, and renal function at the time of renal biopsy.<sup>33</sup> Monocytes express both ANCA autoantigens,

CT groups. (C) Polyclonal anti-MPO antibody ( $10 \mu\text{g/L}$ ) purified from 3 patients with anti-MPO vasculitis induced a very mild increase in sFlt1 release by human monocytes after 8 and 16 hours of incubation. Further addition of C5a ( $10 \text{ nM}$ ) for 2 hours did not alter sFlt1 release. Polyclonal anti-MPO IgG from each patient were tested in three independent experiments.

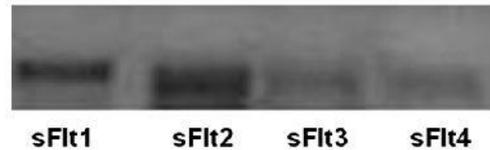


**Figure 5.** An antimetalloprotease inhibitor partially blunted sFlt1 release by monocytes stimulated with anti-PR3 mAb (10 µg/L). Monocytes were pretreated with a metalloprotease inhibitor GM6001 (10, 25, or 50 µM for 1 hour at 37°C) before incubation with anti-PR3 mAb for 16 hours. §§*P*<0.001 versus anti-PR3.

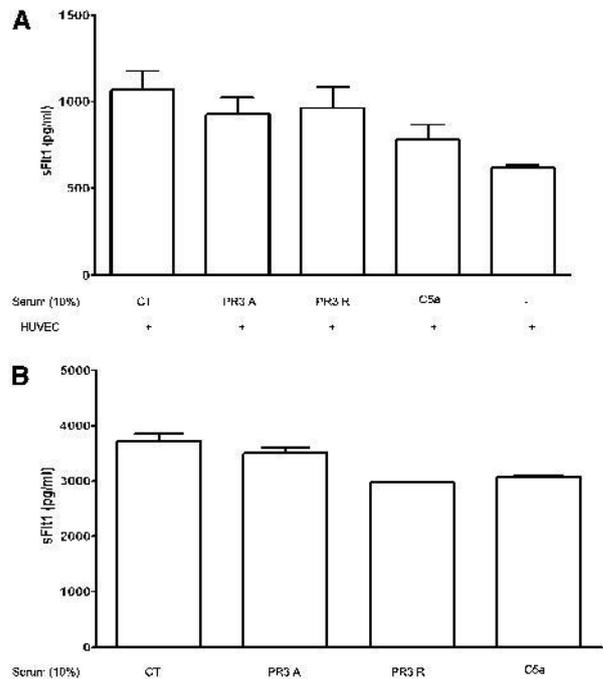


**Figure 6.** Serum (10%) from 12 patients with PR3-ANCA during acute ANCA-associated vasculitis induced significantly more sFlt1 release by monocytes after 16 hours of incubation, compared with serum from the same patients during disease remission or control serum. CT, control. ##*P*<0.001 versus all other groups.

MPO and PR3, and the expression of the latter is increased in patients with ANCA-associated vasculitis.<sup>34–36</sup> As such, monocytes are a target for ANCA. Priming of monocytes by anti-PR3 antibodies has been well documented in previous studies.<sup>37</sup> Anti-PR3 antibodies usually have a variable direct effect on the secretion by monocytes of various cytokines,



**Figure 7.** sFlt1 isoforms 1 and 2 were predominant in monocytes at baseline and after stimulation (1 hour) with anti-PR3 antibodies, whereas isoform 3 and 4 transcripts were barely detectable. A representative result of sFlt1 isoforms RT-PCR is shown (among three independent experiments).



**Figure 8.** Serum drawn from patients with acute PR3-associated vasculitis does not alter sFlt1 release from HUVECs. Serum (10%) from patients with acute (PR3A) or remission (PR3R) PR3-ANCA-associated vasculitis did not induce an increase in sFlt1 secretion by HUVECS *in vitro* after 2 (A), 8, or 16 hours (B) of incubation compared with controls (CT). Similar results were obtained using purified C5a or an anti-PR3 mAb (data not shown). Data are from four to five independent experiments.

such as IL-6, IL-8, and TNF-α. However, ANCA can amplify cytokine production by monocytes after stimulation with various agents, such as bacterial LPS. This indirect effect of ANCA is mediated through its induction of several receptors to bacterial peptides on monocyte surfaces, including CD14 and Toll-like receptors.<sup>4,38</sup>

Our findings suggest that monocytes (and not endothelial cells) are the primary source of sFlt1 in patients with AAV. Serum from patients with acute PR3-ANCA-associated vasculitis induced the release of sFlt1 by human monocytes *in vitro* but had no effect on the secretion of the latter by HUVECs. In addition, HUVECs did not express C5aR constitutively (which

was also documented previously) or after stimulation with anti-PR3 mAb, which may account for the absence of sFlt1 secretion by HUVECs upon stimulation with AAV sera or exogenous C5a (current study). However, differences exist between HUVECs and microvascular endothelial cells in the kidney and lung. Similarly, endothelial cells do not constitutively express MPO or PR3 but may bind both antigens *in vivo* during ANCA-associated vasculitis. Thus, we cannot exclude the possibility that microvascular endothelial cells *in vivo* express C5aR and/or bind PR3 or MPO and therefore may contribute to the increased sFlt1 levels found in patients with AAV.

Recent studies suggested that C5a, a central component of complement system, is a major driver of sFlt1 release by monocytes. Complement, a major player of the innate immune response, is a complex proteic cascade that can be activated through three distinct pathways: the classic, the lectin, and the alternative pathways. The three pathways differ with regard to their triggering factors, but converge at the generation of C3 and C5 convertases.<sup>39</sup> The latter cleaves C5 and generates C5a, a proinflammatory anaphylatoxin, and C5b that mediates the formation of the C5b-C9 terminal membrane attack complex (MAC), which induces lytic lesions in targeted cell membranes. In addition, recent experimental data underscored the importance of the complement alternative pathway in the genesis of ANCA-associated vasculitis. In a murine passive transfer model using anti-MPO antibodies, C5<sup>-/-</sup>, C5a receptor<sup>-/-</sup>, and Factor B<sup>-/-</sup> mice (but not C4<sup>-/-</sup> mice) were protected from the induction of ANCA-associated vasculitis.<sup>40</sup> ANCA-primed neutrophils released an as-yet-undefined factor(s) that activated complement and released C3a and C5a.<sup>41</sup> C5a, in turn, primed neutrophils for ANCA-mediated oxidative burst.

In this study, C5a serum levels were indeed increased during the acute phase of ANCA-associated vasculitis, in keeping with complement activation. Moreover, C5a levels correlated with serum sFlt1 levels. However, in contrast to a previous report,<sup>23</sup> C5a at concentrations  $\leq 100$  nM failed to induce sFlt1 release by monocytes in this study. This discrepancy may be related to different techniques used for monocyte purification, and thus different purity levels of monocytes and different techniques for C5a receptor blockade. Moreover, our results show that anti-PR3 antibodies, and to a much lesser extent anti-MPO antibodies, induced sFlt1 release by monocytes, independently of C5a. To our knowledge, this is the first demonstration of a direct effect of autoantibodies on sFlt1 release by monocytes. This effect is an additional illustration of monocyte activation by ANCA, and anti-PR3 antibodies in particular; however, why anti-PR3 antibodies display a more significant effect on sFlt1 release by monocytes compared with anti-MPO antibodies remains unknown.

Our data also suggest that sFlt1 release by monocytes upon stimulation by anti-PR3 antibodies arises at least in part from the cleavage by ADAM/TACE metalloproteases of membrane-bound Flt1 ectodomain and the subsequent release of sFlt1. However, the precise mechanisms of ectodomain cleavage and

its relative importance compared with the alternative splicing of Flt1 transcripts to generate sFlt1 in monocytes remain to be elucidated.

Thus, in addition to their role in the recruitment and activation of neutrophils, monocytes and the genesis of endothelial inflammatory lesions during AAV, anti-PR3 antibodies induce an increase in the antiangiogenic factor, sFlt1, which hinders endothelial cell repair in this setting. The occurrence of such an antiangiogenic state in patients with PR3-associated vasculitis is corroborated by our data in the CAM model (Figure 3).

To our knowledge, this study provides the first evidence of an increase in a potent antiangiogenic factor, sFlt1, and the occurrence of an antiangiogenic state in the setting of acute vasculitis affecting the renal microvasculature. Our data also indicate that sFlt1 may be a helpful marker of PR3-associated vasculitis activity and, most importantly, that anti-sFlt1-targeted therapies may be beneficial in treating acute disorders affecting the renal microvasculature. Reversing an antiangiogenic state or promoting a more proangiogenic state may help to enhance endothelial cell survival and repair and thus reduce renal vascular scars and ultimately the risk of progression toward ESRD.

## CONCISE METHODS

### Patients and Serum Analysis

Serum samples were available for 40 patients with PR3-ANCA-associated vasculitis during active disease ( $n=20$ ) or during remission ( $n=20$ ), as well as for 23 patients with MPO-ANCA-associated vasculitis during active disease ( $n=10$ ) or during remission ( $n=13$ ). Eighteen additional patients with PR3-ANCA had paired serum samples drawn at disease onset and at 3 months of follow-up, when remission had been achieved.

Seventy-nine percent of patients had renal involvement, defined by microscopic hematuria and proteinuria and/or elevated levels of serum creatinine and/or a kidney biopsy demonstrating focal necrotizing GN, which are typical features of ANCA-associated vasculitis. The remaining patients had predominantly pulmonary or ear/nose/throat involvement.

Our control group included 18 healthy controls, 11 patients with acute anti-GBM disease, and 10 patients with ESRD who were undergoing hemodialysis. Patients were venesected as soon as the diagnosis of ANCA-associated vasculitis or anti-GBM disease was confirmed and before the start of treatment when possible.

Wegener's granulomatosis and microscopic polyangiitis were diagnosed according to the Chapel Hill Consensus conference criteria.<sup>42</sup> Anti-GBM disease was defined by the presence of rapidly progressive crescentic GN documented by renal biopsy and/or alveolar hemorrhage and the presence of circulating anti-GBM antibodies by ELISA. GFR was estimated using the Modification of Diet in Renal Disease simplified formula.<sup>43</sup> Circulating Flt1 and C5a levels were assayed using commercial ELISA kits according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN).

### Chick CAM Assay

Patient sera containing PR3-ANCA taken at the time of acute disease ( $n=5$ ) or healthy control sera ( $n=5$ ) were assessed using the CAM assay, as previously described.<sup>18</sup> CAM tests were also performed using the same PR3-ANCA-containing serum that was preincubated with excess human recombinant VEGF (0.5 ng VEGF/ml of serum) (Clonetics; Lonza, Basel, Switzerland) for 30 minutes ( $n=2$ ). In further experiments, sera from the same PR3-ANCA-associated vasculitis patients were filtered through a semipermeable membrane with a filtration cut-off of 10 kD (Biomax-10; Millipore, Billerica, MA). Both the concentrate and the filtrate were tested in the CAM assay.

All experiments were performed in three to six eggs, at 9 days after incubation, and replicated at least twice on separate occasions. Each egg received patient serum and PBS on two separate zones of the CAM.

The effect of serum on the microvasculature was measured in a semi-quantified manner, based on the area of the CAM treated with serum in which microvasculature was still visible 3 hours after the treatment of the CAM area with serum: grade 1 (0%–25% of total area), grade 2 (26%–50%), grade 3 (51%–75%), and grade 4 (76%–100%).

### Human Monocytes and HUVEC Culture

PBMC were extracted from blood using Ficoll (Eurobio, Les Ulis, France) and were directly frozen in trizol at  $-80^{\circ}\text{C}$  (DTC platform; CHU de Nantes, Nantes, France). Monocytes were isolated using elutriation and were resuspended in RPMI (Gibco, Grand Island, NY) and supplemented with 1% FCS. We added 500  $\mu\text{l}$  to each well of 24-well tissue-culture plates at a final concentration of  $10^6$  cells/ml and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$ -humidified atmosphere. HUVECs (Lonza, Cologne, Germany) were cultured using the Bsal medium and supplement kit (Promocell, Heideberg, Germany). Cells were used between the third and fifth passage.

After stimulation for 30 minutes with  $\text{TNF-}\alpha$  (2 ng/ml), monocytes or HUVECs were incubated with one of the following: (1) a murine anti-human PR3 mAb (clone 12.8) (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (Research Diagnostics, Acton, MA), a murine anti-human MPO antibody (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (Abcam, Paris, France), polyclonal anti-MPO purified from patients with MPO-associated vasculitis (10  $\mu\text{g/ml}$ ), or with equal amounts of isotype-matched murine IgG for 2, 4, 8, and 16 hours; (2) serum (10%) obtained from 12 patients with PR3-ANCA-associated vasculitis during the acute disease phase and during remission ( $n=12$ ), from six patients with acute MPO-associated vasculitis or healthy donors ( $n=7$ ) for 16 hours; or (3) purified C5a (R&D Systems) at concentrations of 10, 25, 50, and 100 nM for 2, 8, and 16 hours.

Some of these experiments were conducted with or without pretreatment of monocytes and HUVECs with an anti-C5a human receptor (C5aR) mAb (10  $\mu\text{g/ml}$ ) (R&D Systems) for 30 minutes. In additional experiments, monocytes were pretreated with a metalloproteases inhibitor GM6001 (Calbiochem, Beeston Nottingham, UK) at concentrations of 10, 25, or 50  $\mu\text{M}$  for 1 hour at  $37^{\circ}\text{C}$  before incubation with anti-PR3 mAb.

The blocking effect of anti-C5a receptor antibody has been tested by the manufacturer (R&D Systems) on the basis of its inhibition of

*N*-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase release by U937 cells upon stimulation by C5a. Using flux cytometry, we also tested the capacity of this blocking antibody to inhibit C5a fixation on monocytes (Supplemental Material).

Cell supernatants were harvested, cell debris was removed by centrifugation, and samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further processing. To take into account the sFlt1 already present in the patients' sera, sFlt1 levels were measured in the diluted patients' sera (10%) used in this set of experiments, after 2-hour incubation at  $37^{\circ}\text{C}$  in a 5%  $\text{CO}_2$ -humidified atmosphere, in the absence of monocytes or HUVECs.

### Analysis of C5aR Expression on Monocytes and HUVECs

C5aR expression on monocytes and HUVECs was assessed by flow cytometry using a mouse anti-human C5aR (R&D Systems) and a fluorescein isothiocyanate-conjugated donkey anti-mouse IgG antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA).

### Real-time Quantitative PCR for the Detection of sFlt1 Isoforms

Real-time quantitative PCR for the detection of the four sFlt1 isoforms was performed as previously described.<sup>44</sup>

### Statistical Analyses

Data were analyzed using one-way ANOVA, paired *t* test, and Spearman rank correlation using Prism software (version 4; GraphPad, La Jolla, CA).

### ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by a grant from Région Pays de Loire, France.

### DISCLOSURES

None.

### REFERENCES

- Salama AD, Pusey CD: Shining a LAMP on pauci-immune focal segmental glomerulonephritis. *Kidney Int* 76: 15–17, 2009
- Kain R, Exner M, Brandes R, Ziehermayr R, Cunningham D, Alderson CA, Davidovits A, Raab I, Jahn R, Ashour O, Spitzauer S, Sunder-Plassmann G, Fukuda M, Klemm P, Rees AJ, Kerjaschki D: Molecular mimicry in pauci-immune focal necrotizing glomerulonephritis. *Nat Med* 14: 1088–1096, 2008
- van Rossum AP, Rarok AA, Huitema MG, Fassina G, Limburg PC, Kallenberg CG: Constitutive membrane expression of proteinase 3 (PR3) and neutrophil activation by anti-PR3 antibodies. *J Leukoc Biol* 76: 1162–1170, 2004
- Nowack R, Schwalbe K, Flores-Suárez LF, Yard B, van der Woude FJ: Upregulation of CD14 and CD18 on monocytes in vitro by anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *J Am Soc Nephrol* 11: 1639–1646, 2000

5. Radford DJ, Lord JM, Savage CO: The activation of the neutrophil respiratory burst by anti-neutrophil cytoplasm autoantibody (ANCA) from patients with systemic vasculitis requires tyrosine kinases and protein kinase C activation. *Clin Exp Immunol* 118: 171–179, 1999
6. Little MA, Smyth CL, Yadav R, Ambrose L, Cook HT, Nourshargh S, Pusey CD: Antineutrophil cytoplasm antibodies directed against myeloperoxidase augment leukocyte-microvascular interactions in vivo. *Blood* 106: 2050–2058, 2005
7. Pankhurst T, Savage CO, Little MA: Leukocyte-endothelial dysregulation in systemic small vessel vasculitis. *Nephrology (Carlton)* 14: 3–10, 2009
8. Xiao H, Heeringa P, Hu P, Liu Z, Zhao M, Aratani Y, Maeda N, Falk RJ, Jennette JC: Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies specific for myeloperoxidase cause glomerulonephritis and vasculitis in mice. *J Clin Invest* 110: 955–963, 2002
9. Little MA, Smyth L, Salama AD, Mukherjee S, Smith J, Haskard D, Nourshargh S, Cook HT, Pusey CD: Experimental autoimmune vasculitis: an animal model of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis. *Am J Pathol* 174: 1212–1220, 2009
10. Primo VC, Marusic S, Franklin CC, Goldmann WH, Achaval CG, Smith RN, Arnaout MA, Nikolic B: Anti-PR3 immune responses induce segmental and necrotizing glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol* 159: 327–337, 2010
11. Schlieben DJ, Korbet SM, Kimura RE, Schwartz MM, Lewis EJ: Pulmonary-renal syndrome in a newborn with placental transmission of ANCA. *Am J Kidney Dis* 45: 758–761, 2005
12. Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M: Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet* 361: 206–210, 2003
13. de Groot K, Goldberg C, Bahlmann FH, Woywodt A, Haller H, Fliser D, Haubitz M: Vascular endothelial damage and repair in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 56: 3847–3853, 2007
14. Závada J, Kiderová L, Pytlík R, Hrusková Z, Tesar V: Reduced number of endothelial progenitor cells is predictive of early relapse in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Rheumatology (Oxford)* 48: 1197–1201, 2009
15. Ferrara N, Gerber HP, Lecouter J: The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9: 669–676, 2003
16. Paleolog EM: Angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 4 [Suppl 3]: S81–S90, 2002
17. Rahimi N, Golde TE, Meyer RD: Identification of ligand-induced proteolytic cleavage and ectodomain shedding of VEGFR-1/FLT1 in leukemic cancer cells. *Cancer Res* 69: 2607–2614, 2009
18. Di Marco GS, Reuter S, Hillebrand U, Amler S, König M, Larger E, Oberleithner H, Brand E, Pavenstädt H, Brand M: The soluble VEGF receptor sFlt1 contributes to endothelial dysfunction in CKD. *J Am Soc Nephrol* 20: 2235–2245, 2009
19. Kishuku M, Nishioka Y, Abe S, Kishi J, Ogino H, Aono Y, Azuma M, Kinoshita K, Batmunkh R, Makino H, Ranjan P, Minakuchi K, Sone S: Expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in human monocyte-derived mature dendritic cells contributes to their antiangiogenic property. *J Immunol* 183: 8176–8185, 2009
20. Gu Y, Lewis DF, Wang Y: Placental productions and expressions of soluble endoglin, soluble fms-like tyrosine kinase receptor-1, and placental growth factor in normal and preeclamptic pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 260–266, 2008
21. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, Sibai BM, Epstein FH, Romero R, Thadhani R, Karumanchi SA CPEP Study Group: Soluble endoglin and other circulating antiangiogenic factors in preeclampsia. *N Engl J Med* 355: 992–1005, 2006
22. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdoelah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA: Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 12: 642–649, 2006
23. Girardi G, Yarin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE: Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med* 203: 2165–2175, 2006
24. Langer HF, Chung KJ, Orlova VV, Choi EY, Kaul S, Kruhlak MJ, Alatsianos M, Deangelis RA, Roche PA, Magotti P, Li X, Economopoulou M, Rafail S, Lambris JD, Chavakis T: Complement-mediated inhibition of neovascularization reveals a point of convergence between innate immunity and angiogenesis. *Blood* 116: 4395–4403, 2010
25. Hamour S, Salama AD, Pusey CD: Management of ANCA-associated vasculitis: Current trends and future prospects. *Ther Clin Risk Manag* 6: 253–264, 2010
26. Jayne DR, Gaskin G, Rasmussen N, Abramowicz D, Ferrario F, Guillevin L, Mirapeix E, Savage CO, Sinico RA, Stegeman CA, Westman KW, van der Woude FJ, de Lind van Wijngaarden RA, Pusey CD European Vasculitis Study Group: Randomized trial of plasma exchange or high-dosage methylprednisolone as adjunctive therapy for severe renal vasculitis. *J Am Soc Nephrol* 18: 2180–2188, 2007
27. Jones RB, Tervaert JW, Hauser T, Luqmani R, Morgan MD, Peh CA, Savage CO, Segelmark M, Tesar V, van Paassen P, Walsh D, Walsh M, Westman K, Jayne DR European Vasculitis Study Group: Rituximab versus cyclophosphamide in ANCA-associated renal vasculitis. *N Engl J Med* 363: 211–220, 2010
28. José RJ, Chrysochou C, Shurrah AE, New D, Wood GN: Rituximab for rescue and maintenance therapy in rapidly progressive life-threatening antineutrophil cytoplasmic autoantibody-associated systemic vasculitis. *Scand J Urol Nephrol* 44: 459–462, 2010
29. Kamali S, Erer B, Artim-Esen B, Gul A, Ocal L, Konice M, Aral O, Inanc M: Predictors of damage and survival in patients with Wegener's granulomatosis: Analysis of 50 patients. *J Rheumatol* 37: 374–378, 2010
30. Hauer HA, Bajema IM, van Houwelingen HC, Ferrario F, Noël LH, Waldherr R, Jayne DR, Rasmussen N, Bruijn JA, Hagen EC European Vasculitis Study Group (EUVAS): Renal histology in ANCA-associated vasculitis: Differences between diagnostic and serologic subgroups. *Kidney Int* 61: 80–89, 2002
31. Di Marco GS, Alam A, Dol F, Corvol P, Gasc JM, Larger E: Angiogenesis and diabetes: different responses to pro-angiogenic factors in the chorioallantoic membrane assay. *Mol Med* 14: 705–714, 2008
32. Ledoux S, Queguiner I, Msika S, Calderari S, Rufat P, Gasc JM, Corvol P, Larger E: Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes* 57: 3247–3257, 2008
33. Weidner S, Carl M, Riess R, Rupprecht HD: Histologic analysis of renal leukocyte infiltration in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis: Importance of monocyte and neutrophil infiltration in tissue damage. *Arthritis Rheum* 50: 3651–3657, 2004
34. Hattar K, van Bürck S, Bickenbach A, Grandel U, Maus U, Lohmeyer J, Csernok E, Hartung T, Seeger W, Grimminger F, Sibelius U: Anti-proteinase 3 antibodies (c-ANCA) prime CD14-dependent leukocyte activation. *J Leukoc Biol* 78: 992–1000, 2005
35. Muller Kobold AC, Kallenberg CG, Tervaert JW: Leucocyte membrane expression of proteinase 3 correlates with disease activity in patients with Wegener's granulomatosis. *Br J Rheumatol* 37: 901–907, 1998
36. Ohlsson S, Hellmark T, Pieters K, Sturfelt G, Wieslander J, Segelmark M: Increased monocyte transcription of the proteinase 3 gene in small vessel vasculitis. *Clin Exp Immunol* 141: 174–182, 2005
37. Weidner S, Neupert W, Goppelt-Strube M, Rupprecht HD: Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies induce human monocytes to produce oxygen radicals in vitro. *Arthritis Rheum* 44: 1698–1706, 2001
38. Uehara A, Iwashiro A, Sato T, Yokota S, Takada H: Antibodies to proteinase 3 prime human monocytes via protease-activated receptor-2 and NF-kappaB for Toll-like receptor- and NOD-dependent activation. *Mol Immunol* 44: 3552–3562, 2007
39. Walport MJ: Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344: 1058–1066, 2001
40. Xiao H, Schreiber A, Heeringa P, Falk RJ, Jennette JC: Alternative complement pathway in the pathogenesis of disease mediated by

- anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies. *Am J Pathol* 170: 52–64, 2007
41. Schreiber A, Xiao H, Jennette JC, Schneider W, Luft FC, Ketzritz R: C5a receptor mediates neutrophil activation and ANCA-induced glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 20: 289–298, 2009
42. Jennette JC, Falk RJ, Andrassy K, Bacon PA, Churg J, Gross WL, Hagen EC, Hoffman GS, Hunder GG, Kallenberg CG, McCluskey RT, Sinico RA, Rees AJ, van Es LA, Waldherr R, Wiik A: Nomenclature of systemic vasculitides. Proposal of an international consensus conference. *Arthritis Rheum* 37: 187–192, 1994
43. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D Modification of Diet in Renal Disease Study Group: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. *Ann Intern Med* 130: 461–470, 1999
44. Heydarian M, McCaffrey T, Florea L, Yang Z, Ross MM, Zhou W, Maynard SE: Novel splice variants of sFlt1 are upregulated in pre-eclampsia. *Placenta* 30: 250–255, 2009

---

See related editorial, "Vasculitis Is an Antiangiogenic State," on pages 8–10.

This article contains supplemental material online at <http://jasn.asnjournals.org/lookup/suppl/doi:10.1681/ASN.2010080858/-/DCSupplemental>.

## Facteurs anti-angiogéniques et maladies rénales

Le sFlt1 est un facteur anti-angiogénique sécrété par les cellules endothéliales, les monocytes et le placenta, qui contre les effets du VEGF sur la survie et la réparation de l'endothélium. Produit de l'épissage alternatif du VEGFR1 d'une part et du clivage de la partie extracellulaire du récepteur par des métalloprotéases d'autre part, il est impliqué dans plusieurs pathologies rénales. Enfin, le sFlt1 est impliqué dans les maladies chroniques : il est responsable de la dysfonction endothéliale chez les patients en insuffisance rénale chronique, et constitue un marqueur des risques cardiovasculaires. Notre groupe a également mis en évidence un lien entre le sFlt1 et la reprise de fonction du greffon rénal d'une part et de l'atteinte vasculaire rénale au cours de la phase aigüe des vascularites à ANCA d'autre part. Dans ce cadre, ces travaux visent à élucider l'impact de la dialyse, traitement à long terme de l'insuffisance rénale chronique, sur la sécrétion de sFlt1, ainsi que les mécanismes responsables de cette sécrétion. Nous avons aussi tenté de préciser les causes des atteintes rénales dans des dysfonctionnements systémiques tels que les vascularites. Nous avons ainsi mis en lumière une forte et rapide augmentation des taux de sFlt1 au cours de la dialyse, et élucidé le rôle des différentes techniques de dialyse et de l'héparine. D'autre part, les études *in vitro* ont permis d'écarter plusieurs hypothèses quant aux processus à l'œuvre dans cette augmentation. Ces travaux posent donc des jalons pour la compréhension des mécanismes de régulation de la balance angiogénique impliqués notamment dans les maladies rénales.

## Anti-angiogenic factors and renal diseases

Soluble Flt1 is an anti-angiogenic factor, secreted by endothelial cells, monocytes and placenta, which impairs the effects of VEGF on endothelium survival and repair. It results from an alternative splicing of VEGFR1 transcript and from cleavage of the membrane-bound form of VEGFR1, and is involved in several renal diseases. Notably, it is involved in chronic diseases: it contributes to endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease, and is a marker of cardiovascular risks. Our team also demonstrated a correlation between sFlt1 and delayed graft function on the one side and renal vascular injuries in acute ANCA-associated vasculitis on the other side. In this context, this study aimed to assess the impact of dialysis, the long-term treatment of end-stage renal disease, on sFlt1 secretion, and on the mechanisms responsible for this secretion. We also intended to clarify the causes of renal injuries in systemic dysfunctions such as vasculitides.

We enlightened a fast and large increase in sFlt1 secretion during dialysis, and we clarified the influence of dialysis methods and heparin use. Then, *in vitro* studies allowed us to dismiss several hypothesis of the processes at work in this increase.

In conclusion, this study gives an insight into the regulatory mechanisms of the angiogenic balance involved in renal diseases.