



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Etude de l'effet des agonistes du récepteur TP dans l'athérosclérose : effet du thromboxane et des isoprostanes sur les cellules musculaires lisses d'artère humaine

Jacques, Diane

*Award date:*  
2010

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Etude de l'effet des agonistes du récepteur TP dans l'athérosclérose :  
Effet du thromboxane et des isoprostanes sur les cellules musculaires lisses  
d'artère humaine**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Diane JACQUES

Janvier 2010

*Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont de près ou de loin contribué à l'élaboration de ce mémoire et qui m'ont soutenue durant cette période.*

*Je tiens tout d'abord à remercier mes promoteurs, pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire. Merci à Jean-Michel Dogné pour son regard critique et la confiance qu'il m'a accordé durant cette période. Merci à Carine Michiels pour son accueil au sein de son équipe de recherche, son encadrement, son disponibilité, son enthousiasme permanent, ses corrections efficaces et plus que rapides, ses nombreux encouragements et surtout pour le temps qu'elle m'a consacré.*

*Je tiens également à remercier Stéphanie Rolin pour son encadrement, son dynamisme, son optimisme contagieux, et ses encouragements lors des moments difficiles.*

*Mes remerciements s'adressent également à tous les membres du département de pharmacie et du laboratoire d'URBC pour leur accueil chaleureux, et plus particulièrement à l'équipe « HIF » qui m'a pris sous son aile. Je tiens à remercier tout spécialement Martine Van steenbrugge pour son ses conseils en tout genre, son aide ; notamment pour le dosage calcium et sa sympathie.*

*Un grand merci aux mémorants d'URBC pour tous les bons moments passés ensemble. Merci à Stéphane pour ses conseils en informatique, à Lulu pour son humeur délirant, à Sabrina pour sa générosité, et à Marie pour son aide, ses encouragements et sa sympathie.*

*Ma reconnaissance va également envers mes parents qui m'ont permis de faire ces études et envers mes frères, mes sœurs et mes amis qui m'ont soutenue durant toutes ces années et qui ont toujours cru en moi.*

## **Etude de l'effet des agonistes du récepteur TP dans l'athérosclérose :**

### **Effet du thromboxane et des isoprostanes sur les cellules musculaires lisses d'artère humaine**

JACQUES Diane

#### Résumé

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des artères de moyen et gros calibres. La lésion débute par une accumulation de cholestérol dans la paroi artérielle déclenchant des processus complexes qui aboutissent au recrutement de cellules inflammatoires et à la migration des cellules musculaires lisses de la média et ainsi à la formation d'une plaque athéromateuse. L'athérosclérose est influencée par un grand nombre de médiateurs, dont les dérivés de l'acide arachidonique, le thromboxane et les isoprostanes. Ces deux médiateurs lipidiques exercent leur rôle en se liant au récepteur TP. Cependant, leurs rôles dans l'athérogenèse ne sont pas clairement définis, et encore moins sur les cellules musculaires lisses.

L'objectif de ce mémoire était donc d'évaluer l'effet de ces deux agonistes du récepteur TP, le U46619, un analogue du thromboxane et l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sur différents paramètres impliqués dans l'athérogenèse sur des cellules musculaires lisses d'artère humaine (HVSMC). Ces études ont été réalisées en conditions basales ainsi qu'en costimulation avec l'IL-1β afin de mimer le contexte inflammatoire qui règne dans la plaque athéromateuse.

Nous avons démontré que les agonistes du récepteur TP augmentent la réponse inflammatoire. En effet, ils sont capables d'augmenter le niveau d'expression de gènes impliqués dans ce processus ainsi que la sécrétion de la protéine chémoattractante MCP-1. De plus, le U46619 induit la prolifération des HVSMC, phénomène clé dans la progression des lésions. Le U46619 induit également l'agrégation plaquettaire, processus déclenché lors de la rupture de la plaque et aboutissant à la formation du thrombus. Comme les agonistes du récepteur TP semblent jouer un rôle important, la modulation de l'activation du récepteur TP est devenue une cible thérapeutique attractive pour prévenir ou retarder le développement de l'athérosclérose. Dans ce mémoire, l'effet de deux antagonistes du récepteur TP a également été étudié. Ceux-ci sont capables d'inhiber les effets des agonistes. Ces résultats apportent une meilleure connaissance de l'implication du récepteur TP dans le développement des lésions athéromateuses.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2010

**Promoteur** : J.-M. Dogné      **Co-Promoteur** : C. Michiels

# TABLE DES MATIERES

<b>I. Introduction</b> .....	1
<b>1. L'athérosclérose</b> .....	1
1.1. Facteurs de risque .....	1
1.2. Les lipoprotéines.....	2
1.3. Physiopathologie de l'athérosclérose.....	5
1.3. L'athérogenèse.....	7
<b>2. Médiateurs issus de l'acide arachidonique impliqués dans l'athérosclérose</b> .....	11
2.1. Le thromboxane A <sub>2</sub> .....	11
2.2. Les isoprostanes.....	13
2.3. Le récepteur TP .....	13
2.4. Rôles du thromboxane et du 8-iso-PGF <sub>2α</sub> dans l'athérosclérose.....	15
2.5. Modulateurs de la voie de l'acide arachidonique et antagonistes du récepteur TP .....	16
<b>3. Objectifs du mémoire</b> .....	17
<b>II. Matériel et méthodes</b> .....	19
<b>1. Culture cellulaire</b> .....	19
1.1. Matériel .....	19
1.2. Méthode.....	19
<b>2. Stimulation des cellules</b> .....	19
2.1. Molécules utilisées .....	19
2.2. Méthode.....	20

<b>3. Mesure de la libération de calcium cytoplasmique au Fura-2 AM..</b>	<b>20</b>
3.1. Matériel .....	20
3.2. Méthode.....	20
<b>4. Test de prolifération : dosage MTT .....</b>	<b>21</b>
4.1. Matériel .....	21
4.2. Méthode.....	21
<b>5. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford.....</b>	<b>21</b>
5.1 Matériel .....	22
5.2. Méthode.....	22
<b>6. Extraction protéique totale pour western blot.....</b>	<b>22</b>
6.1. Matériel .....	22
6.2. Méthode.....	22
<b>7. Western blot.....</b>	<b>23</b>
7.1. Matériel .....	23
7.2. Méthode.....	23
<b>8. Extraction nucléaire.....</b>	<b>24</b>
8.1. Matériel .....	24
8.2. Méthode.....	24
<b>9. Dosage colorimétrique de l'activité de liaison des facteurs de transcription à leurs séquences consensus (Trans-AM).....</b>	<b>25</b>
9.1. Matériel .....	25
9.2. Méthode.....	26
<b>10. ELISA.....</b>	<b>26</b>
10.1. PGE <sub>2</sub> .....	26
10.2. MCP-1.....	27

10.3. Méthode de Folin .....	27
<b>11. Immunofluorescence .....</b>	<b>28</b>
11.1. Matériel .....	28
11.2. Méthode .....	28
<b>12. Mesure de l'expression de gènes par RT-PCR en temps réel .....</b>	<b>29</b>
12.1. Extraction d'ARN total .....	29
12.2. Rétro-transcription .....	30
12.3. PCR en temps réel.....	30
<b>13. Agrégation plaquettaire.....</b>	<b>31</b>
13.1. Matériel.....	31
13.2. Méthode .....	31
<b>III. Résultats .....</b>	<b>32</b>
<b>1. Effets des agonistes du récepteur TP sur la mobilisation de calcium intracellulaire .....</b>	<b>32</b>
<b>2. Effet du U46619 sur le recrutement et l'activation des isoformes de la PKC.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Effets du U46619 et des antagonistes du récepteur TP seuls ou en combinaison avec l'IL1<math>\beta</math> sur la libération de PGE<sub>2</sub>.....</b>	<b>33</b>
<b>4. Effets des agonistes du récepteur TP sur l'activation des voies des MAPK.....</b>	<b>34</b>
<b>5. Effets des agonistes et des antagonistes du récepteur TP sur la prolifération cellulaire.....</b>	<b>34</b>
<b>6. Effets des agonistes du récepteur TP sur la liaison de facteurs de transcription à leur séquence consensus.....</b>	<b>35</b>
<b>7. Effets des agonistes du récepteur TP seuls ou en combinaison avec l'IL1<math>\beta</math> sur l'abondance d'ARNm de gènes pro-inflammatoires.....</b>	<b>36</b>

<b>8. Effets des agonistes seuls ou en combinaison avec l'IL1<math>\beta</math> sur la sécrétion de MCP-1 .....</b>	<b>37</b>
<b>9. Effets du U46619 et du BM520 sur l'agrégation plaquettaire.....</b>	<b>38</b>
<b>IV. Discussion, perspectives et conclusions .....</b>	<b>39</b>
<b>V. Bibliographie.....</b>	<b>46</b>

## Abréviations

8-iso-PGF2 $\alpha$	8-iso-prostaglandine F2 $\alpha$
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AP-1	<i>Activator protein-1</i>
Apo	Apoprotéines
CETP	<i>Cholesterol ester transfert protein</i>
COX	Cyclooxygénase
DAG	Diacylglycérol
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GEF	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>
HETE	acide hydroxyeicosatétraénoïque
HVSMC	<i>Human vascular smooth muscle cell</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesive molecule-1</i>
IDL	<i>Intermediate density lipoproteins</i>
IFN $\gamma$	Interféron $\gamma$
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4,5-triphosphate
JNK	<i>Jun N-terminal Kinase</i>
LCAT	<i>Lecithin-cholesterol acyltransferase</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LO	Lipoxygénase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MCP-1	<i>Monocytes chemotactic protein</i>
MCSF	<i>Macrophages colony stimulating factor</i>
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa binding</i>
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>
PGE <sub>2</sub>	<i>Prostaglandine E<sub>2</sub></i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PLA <sub>2</sub>	<i>Phospholipase A<sub>2</sub></i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PPP	<i>Platelet-rich plasma</i>
PRP	<i>Platelet-poor plasma</i>
ROS	<i>Reactive oxygen specie</i>
SREBP	<i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i>
TNF $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TXA <sub>2</sub>	<i>Thromboxane A<sub>2</sub></i>
TXB <sub>2</sub>	<i>Thromboxane B<sub>2</sub></i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i>

# I. Introduction

## 1. L'athérosclérose

A l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose est de loin la première cause de mortalité au niveau mondial. Très répandue dans les pays industrialisés, elle est en nette progression dans les pays en voie de développement. Cette maladie est définie par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) comme une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibres et consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôts calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media. L'athérosclérose peut être considérée comme une maladie chronique inflammatoire résultant de l'interaction entre des composants plasmatiques athérogènes (des lipoprotéines modifiées), des macrophages dérivés de monocytes, des lymphocytes T et les composants cellulaires de la paroi artérielle, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses [1]. Cette maladie évolue suivant un processus lent et progressif passant par plusieurs stades qui sont de manière général asymptomatiques. La lésion débute par une accumulation de cholestérol dans la paroi artérielle déclenchant des processus complexes qui aboutissent au recrutement de cellules inflammatoires et à la formation d'une plaque athéromateuse. La croissance continue de celle-ci va peu à peu empêcher la circulation correcte du sang et provoquer l'apparition de symptômes. Ces symptômes varient selon l'endroit où la plaque s'est développée, il peut s'agir de simples douleurs dans les membres inférieurs ou de crise d'angor ou encore d'accidents ischémiques transitoires. Non traitée, l'athérosclérose peut être l'origine d'un infarctus du myocarde ou d'autres accidents vasculaires pouvant mener au décès du patient.

### 1.1. Facteurs de risque

De nombreuses études épidémiologiques réalisées depuis plusieurs décennies ont permis d'identifier un grand nombre de facteurs de risque de l'athérosclérose. Ceux-ci sont regroupés en deux catégories : les facteurs d'origine environnementale ou comportementale et les facteurs d'origine génétique.

Le facteur comportemental majeur est une alimentation riche en lipides. En effet, une corrélation entre un apport excessif en cholestérol et triglycérides et le développement de l'athérosclérose a été démontrée au moyen d'expérimentations animales [2]. Le tabagisme est également un facteur de risque important. De nombreux composants du tabac sont toxiques pour les cellules endothéliales et altèrent les fonctions de l'endothélium, notamment la vasomotricité par inactivation du monoxyde d'azote. De plus, le tabagisme dérégule le métabolisme des lipoprotéines en diminuant la production de lipoprotéines à haute densité (HDL) [3] qui sont antiathérogènes. Il a également été démontré que les infections par différents pathogènes favorisaient le développement de maladies vasculaires. Une étude a montré que *Chlamydia pneumonia* pouvait directement induire la différenciation de

monocytes en macrophages et ainsi, favoriser le développement de l'athérosclérose [4]. Finalement, l'inactivité physique et le manque d'exercice jouent aussi un rôle crucial.

Les facteurs génétiques regroupent l'ensemble des dyslipidémies menant à une augmentation du taux de LDL (low density lipoprotein) ou à une réduction de HDL. Un taux d'homocystéine sanguin élevé semble également contribuer au développement de l'athérosclérose. Cet acide aminé agit en endommageant directement les cellules endothéliales, en interférant avec la coagulation et en oxydant les LDL. Un autre facteur génétique important est l'hypertension artérielle. Des études cliniques ont démontré que la normalisation de la tension artérielle se traduisait par une réduction du risque d'une attaque cardiaque [2].

En plus des facteurs environnementaux ou comportementaux et des facteurs génétiques, des facteurs non modifiables tels que le sexe et l'âge influencent également le développement de l'athérosclérose. Les complications cliniques apparaissent le plus souvent vers 50 ans chez l'homme ; alors que chez la femme, elles surviennent plus tardivement en raison de la présence d'hormones, telles l'œstrogène, antiathérogènes.

## 1.2. Les lipoprotéines

L'accumulation de lipoprotéines dans l'espace sous-endothélial qui caractérise l'initiation de l'athérosclérose peut être causée par une augmentation de leur concentration plasmatique qui peut être liée à une anomalie de leur métabolisme.

### 1.2.1. Structure des lipoprotéines

En raison de leur caractère hydrophobe, les lipides tels que le cholestérol, les triglycérides et les phospholipides ne circulent pas sous forme libre dans le plasma, mais sous forme complexée à diverses protéines formant les lipoprotéines (**Figure I.1**). Ces complexes macromoléculaires solubles sont responsables du transport des lipides endogènes et exogènes (alimentaires) dans l'ensemble de l'organisme.

La composante hydrophobe des lipoprotéines est essentiellement constituée de triglycérides et d'esters de cholestérol. En raison de leur hydrophobicité, ces composants vont se rassembler au centre de la particule pour éviter le contact avec le plasma, ainsi ils constituent le cœur des lipoprotéines. En surface, ces particules sont recouvertes d'une couche amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol non estérifié (libre) et de protéines appelées apo(lipo)protéines dont leurs parties polaires sont orientées vers la surface. Les apoprotéines sont à la base du classement des lipoprotéines.

Les lipoprotéines sont classées et nommées en fonction de leur densité. Celle-ci est fonction de leur contenu en apoprotéines. Les lipoprotéines de plus faible densité sont les chylomicrons. Les « *very low density lipoproteins* » (VLDL), les « *low density lipoproteins* » (LDL) et les « *high density lipoproteins* » (low density lipoprotein) sont des lipoprotéines respectivement de plus en plus denses. Plus le complexe est chargé en apoprotéines, plus la densité sera élevée. De plus, la taille des lipoprotéines est inversement proportionnelle à leur

densité. Ainsi, les chylomicrons sont les particules les plus grosses, les plus riches en triglycérides et cholestérol et les plus pauvres en protéines alors que les HDL sont les particules les plus petites et les plus riches en apoprotéines.

Outre leur rôle structurel, les apoprotéines sont responsables du devenir des lipoprotéines par la fonction de ligands pour leur récepteur et par la fonction de cofacteurs pour certaines enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides. Les apoprotéines sont composées de plusieurs polypeptides qui leur confèrent une grande variété.

Les apoprotéines A rassemblent plusieurs sous-groupes dont les plus communs sont les Apo A1 et Apo A2. Leurs lieux de synthèse sont l'intestin et le foie. L'Apo A1, simple chaîne peptidique, est le composant protéique majeur des HDL mais également des chylomicrons en moindre partie. En plus de son rôle structurel majeur, elle active la lécithine-cholestérol-acyl-transférase (LCAT) qui intervient dans la captation des HDL par le foie. L'Apo A2, contrairement à l'Apo A1, se présente sous la forme de deux chaînes peptidiques identiques et se retrouve presque exclusivement dans les HDL. Son rôle principal est de moduler l'activité de la lipase hépatique.

Principalement des protéines de structure, les apoprotéines B se localisent essentiellement dans les LDL mais également dans leurs précurseurs, les VLDL et les chylomicrons. Il en existe deux formes : l'Apo B100, forme majoritaire et l'Apo B48. Le nom de cette dernière vient du fait qu'elle correspond à 48 % de la partie N-terminale de la protéine codée par le gène Apo B100. L'Apo B100 est principalement synthétisée dans le foie où elle est intégrée aux LDL et dans les cellules intestinales où elle est associée aux précurseurs des LDL. Elle est responsable de l'internalisation des LDL par liaison à son récepteur.

Les apoprotéines C sont associées aux VLDL et HDL. Il en existe différents types. Leurs fonctions sont complexes et peu connues. Notamment, l'Apo C2 participe à l'activation de la lipoprotéine lipase et favorise la liaison des lipides aux HDL.

La dernière classe des apoprotéines comprend les apoprotéines E. La fonction principale de celle-ci est la régulation de la captation et du catabolisme des lipoprotéines riches en lipides.

### **1.2.2. Métabolisme des lipoprotéines**

Les chylomicrons sont formés dans les entérocytes par assemblage de triglycérides et de cholestérol d'origine alimentaire et d'apoprotéines. Les chylomicrons excrétés sont dit natifs car ils ne contiennent que l'apoprotéine B48. Dès leur arrivée dans le plasma, une maturation de ceux-ci est mise en place. Ce processus désigne l'adjonction d'autres apoprotéines, l'Apo E et C provenant des HDL circulantes. Le complexe Apo B48-E est responsable de la reconnaissance des chylomicrons par les récepteurs des cellules du foie. L'Apo C, quant à elle, favorise l'activation de la lipoprotéine lipase catalysant l'hydrolyse des triglycérides des chylomicrons. Dans la circulation sanguine, ces particules se dirigent vers des tissus périphériques où, suite à l'action de la lipoprotéine lipase, les triglycérides hydrolysés sont

absorbés. Les acides gras issus de réactions enzymatiques sont gardés par le tissu alors que le glycérol est renvoyé dans la circulation. Les chylomicrons dépourvus de triglycérides sont ensuite appauvris en Apo C, qui est récupérée par les HDL. Les résidus ainsi obtenus sont appelés « *lipoprotein remnants* ». Ces dernières sont enlevées de la circulation par les récepteurs hépatiques reconnaissant le complexe Apo B48-E. Après une entrée par endocytose dans les cellules hépatiques, ces résidus sont hydrolysés libérant les acides aminés des apoprotéines et le cholestérol.

La synthèse des lipoprotéines à très faible densité (VLDL) est réalisée dans le foie. Celle-ci correspond à l'assemblage des apoprotéines B100 et A1 aux triglycérides et au cholestérol estérifié ou non. Comme les chylomicrons, les VLDL reçoivent des HDL les ApoE et C. Dans la circulation, les VLDL vont peu à peu s'appauvrir en triglycérides. Des échanges de matières entre ces particules et les HDL s'opèrent par action de la CETP (*cholesterol ester transfert protein*). Ceux-ci vont récupérer les apoprotéines C et E alors que les VLDL vont s'enrichir en esters de cholestérol. Au cours de ce transfert, les VLDL vont être transformées, dans un premier temps, en lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL) et, dans un deuxième temps, en lipoprotéines de faible densité (LDL). Celles-ci sont reconnues par des récepteurs présents en surface des cellules grâce à l'Apo B100. Les complexes ainsi formés permettent l'endocytose des particules. Les phospholipides, les triglycérides et le cholestérol sont hydrolysés par former des acides gras et d'autres composants nécessaires à la cellule.

Les HDL sont synthétisées dans le foie et dans l'intestin et sont excrétées par exocytose dans la circulation sanguine. Les HDL sont constituées majoritairement d'apoprotéines et de phospholipides, et sont pratiquement dépourvus d'esters de cholestérol. Sous l'action de la LCAT, dont l'activité dépend de l'Apo A1, ces particules vont s'enrichir en esters de cholestérol. La CETP permettra ensuite le transfert du cholestérol aux autres lipoprotéines.

### **1.2.3. Pathologies associées au métabolisme des lipoprotéines**

Les pathologies associées au dysfonctionnement du métabolisme des lipoprotéines peuvent résulter des diverses mutations affectant la synthèse de récepteurs des apoprotéines et la synthèse ou l'inactivation des enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines.

L'absence ou l'inactivation de la lipoprotéine lipase ou l'absence de l'apoprotéine C2 responsable de l'activation de cette enzyme est à l'origine d'une augmentation de triglycérides due à la non consommation des chylomicrons ; elle est appelée hyperlipidémie de type I ou hyperchylomicronémie. L'absence de production de récepteurs aux LDL mène à une augmentation du taux en LDL plasmatiques et est appelée hyperlipidémie de type II ou hypercholestérolémie.

Les différentes maladies affectant le métabolisme des lipoprotéines dont les hyperlipidémies sont à l'origine d'accidents vasculaires liés à une athérosclérose précoce.

## 1.3. Physiopathologie de l'athérosclérose

L'athérosclérose reprend les termes « *athérome* » et « *sclérose* ». L'athérome, signifiant en grec «bouillie», désigne une portion molle, riche en lipides. Par la suite, ce corps lipidique va progressivement se couvrir d'une chape fibreuse, la sclérose. Ces deux composants, lipides et fibres, constituent la plaque athéromateuse. Celle-ci s'épaissit et fait protrusion dans la lumière de l'artère, à l'origine d'une sténose artérielle. La composition de la plaque est un facteur important qui influence l'évolution de la maladie et l'apparition des symptômes.

L'athérosclérose étant une maladie chronique et progressive, passe par différents stades évolutifs : la strie lipidique, la plaque fibro-lipidique et la plaque compliquée. La stabilisation par régression de la plaque est possible par contrôle des facteurs de risque.

### 1.3.1. Structure d'une artère saine

Les artères atteintes sont principalement les artères coronaires, les artères carotidiennes, et les artères principales irrigant les organes abdominaux et les membres inférieurs. Toutes ces artères possèdent une structure commune (**Figure I.2**) constituée de trois tuniques distinctes : l'intima, la média, et l'adventice.

L'intima est la couche la plus interne. Elle est composée d'une monocouche de cellules aplaties et allongées selon la direction du flux sanguin, les cellules endothéliales qui forment l'endothélium. Celui-ci repose sur une fine couche de fibres conjonctives, la couche sous-endothéliale. L'endothélium n'est pas seulement une barrière physique entre le sang et les tissus, mais est un organe dynamique assurant un grand nombre de fonctions. Il est capable de réagir aux modifications chimiques, physiques et humorales par la synthèse et la libération de nombreux facteurs impliqués dans la modulation de la coagulation, l'angiogenèse, l'inflammation, la vasomotricité et la perméabilité vasculaire [5]. Un équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation, inhibition et promotion de la prolifération, prévention et stimulation de l'agrégation plaquettaire est ainsi maintenu. L'endothélium contribue donc à l'homéostasie vasculaire.

La média est principalement constituée de cellules musculaires lisses mais aussi de constituants extracellulaires. Elle est séparée de l'intima et de l'adventice par deux membranes souples, les limitantes élastiques interne et externe, respectivement.

En périphérie de l'artère se trouve l'adventice. Celle-ci est constituée des fibres de collagène et d'élastine, ainsi que d'adipocytes. Dans les artères à paroi épaisse, l'adventice renferme de petits vaisseaux sanguins, les *vasa vasorum*, dont le rôle est d'irriguer la paroi artérielle.

### 1.3.2. Les stries lipidiques

Les stries lipidiques sont des lésions précoces qui apparaissent dès l'enfance et qui restent asymptomatiques. Elles se présentent comme des épaissements focaux de l'intima qui font légèrement saillie dans la lumière artérielle (**Figure I.3**). Elles sont principalement composées de cellules gorgées de gouttelettes lipidiques dérivées de macrophages ou de cellules musculaires lisses, appelés cellules spumeuses. Le nom de ces cellules vient de leur apparence en microscopie. Les stries lipidiques sont considérées comme les précurseurs de la plaque athéromateuse, mais peuvent être réversibles.

### 1.3.3. La plaque athéromateuse fibro-lipidique

La plaque athéromateuse simple ou fibro-lipidique se présente comme une élévation régulière de l'endothélium, correspondant à un épaissement de l'intima. Cet épaissement est constitué d'un centre lipidique, l'athérome, riche en macrophages et en lipides extra- et intracellulaires. Ce corps nécrotique est entouré d'une chape fibreuse composée de cellules musculaires lisses et de matrice extracellulaire responsable de la rigidité de la plaque. Dans les plaques simples, la partie fibreuse est largement prédominante. La croissance de la plaque s'accompagne d'une réduction du calibre de la lumière de l'artère, entraînant un élargissement progressif du diamètre de celle-ci. Cela a pour conséquence un remaniement total de la structure de l'artère. Comme la strie lipidique, la plaque athéromateuse simple peut régresser par contrôle des facteurs de risque, ou évoluer vers une plaque compliquée.

### 1.3.4. La plaque compliquée

Typiquement, la plaque fibro-lipidique simple évolue vers une plaque plus complexe (**Figure I.3**) qui s'étendra longitudinalement puis sur toute la circonférence du vaisseau et qui sera éventuellement responsable de manifestations cliniques. L'apparition d'une néo-vascularisation et d'une calcification, caractéristiques des lésions avancées, affectent la stabilité de la plaque. En effet, la formation de néo-vaisseaux provenant de ramifications des *vasa vasorum* de l'adventice mène à des microhémorragies dans la plaque et constituant une seconde entrée pour les cellules inflammatoires. La rupture de la plaque peut entraîner une simple fissuration ou une ulcération de celle-ci. L'ulcération mène à la formation d'un thrombus qui peut obstruer la lumière de l'artère et provoquer par exemple un infarctus du myocarde ou qui peut se détacher et migrer dans la circulation et conduire à une embolie artérielle, et ainsi mener à un accident vasculaire cérébral. Le thrombus peut également s'incorporer à la paroi et réduire davantage la lumière artérielle (**Figure I.3**).

## 1.3. L'athérogenèse

Depuis quelques années, l'étude des mécanismes participant à l'athérogenèse a bénéficié du progrès de la génétique et du développement de modèles murins permettant d'évaluer les rôles potentiels de protéines spécifiques impliquées dans le développement des lésions athéromateuses.

### 1.3.1. Initiation de la lésion

Les régions de bifurcations et les courbures des artères sont des sites de prédilection pour l'athérosclérose [6]. En effet dans ces zones, le flux sanguin est irrégulier et les forces de cisaillement sont caractérisées par des variations temporelles et spatiales. La morphologie et l'orientation des cellules endothéliales sont donc altérées dans ces régions. Le haut taux de renouvellement cellulaire et la fragilité des jonctions intercellulaire mènent à une augmentation de la perméabilité de l'endothélium aux macromolécules comme les LDL (**Figure I.4**). De plus, ce flux sanguin turbulent entraîne une diminution de la production des médiateurs vasodilatateurs, une activation des facteurs de transcription pro-inflammatoires et une expression de molécules d'adhérence favorisant la rétention de molécules athérogènes comme les LDL.

Une fois passées au travers les jonctions des cellules endothéliales, les LDL sont retenues dans la paroi artérielle. Cette rétention semble impliquer des interactions entre les apolipoprotéines B des LDL et les protéoglycans présents dans la couche sous-endothéliale de l'intima [7]. Contrairement au plasma où les LDL sont protégés de l'oxydation par la présence d'antioxydants, dans la paroi artérielle, celles-ci sont sujettes à ce type de modification (**Figure I.4**). En effet, les protéines et les lipides des LDL subissent des modifications progressives telles que l'oxydation, la lipolyse, la protéolyse et l'agrégation. La modification des LDL via les processus oxydatifs implique d'une part, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par plusieurs types cellulaires incluant les monocytes, les macrophages, les granulocytes, les lymphocytes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, et d'autre part, des enzymes que l'on retrouve dans les lésions athéromateuses comme la myéloperoxydase, la sphingomyélinase, la phospholipase A<sub>2</sub>. Les macrophages résidents de la paroi artérielle expriment en leur surface des récepteurs aux LDL mais aussi des récepteurs reconnaissant des LDL modifiés, les récepteurs « scavenger ». La première modification des LDL est principalement l'oxydation des lipides par les espèces réactives de l'oxygène produites par les composants cellulaires de la paroi. Cette modification va dans un premier temps donner naissance aux « *minimally oxidized LDL* » qui ne sont pas encore reconnues par les récepteurs « scavenger » exprimés par les macrophages mais aussi par les cellules musculaires lisses. Les acides gras polyinsaturés présents dans les LDL sont convertis par des processus oxydatifs en hydroperoxydes qui sont ensuite clivés formant des produits caractérisés par des fonctions aldéhydes réactives. Ceux-ci vont modifier l'apolipoprotéine B100 des LDL en masquant une charge positive rendant les particules reconnaissables par les récepteurs « scavenger ». Ces composants modifiés des LDL vont entraîner l'expression, par les cellules de la paroi artérielle, de médiateurs pro-inflammatoires

tels que des molécules d'adhérence comme VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) [8], des facteurs de croissance et de différenciation tels que MCSF (*macrophage colony-stimulating factor*) médié par l'activation de NF- $\kappa$ B [9] et des protéines chémoattractantes telles que MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*) [10]. Les LDL oxydées ont également un effet direct sur les macrophages et les lymphocytes T en augmentant la chimiotaxie, l'expression des récepteurs « scavenger », l'apoptose et la nécrose, ... Les LDL oxydées constituent donc un stimulus permanent pour l'activation de l'endothélium.

### 1.3.2. Recrutement des leucocytes et inflammation

L'activation de l'endothélium par les LDL modifiées est à l'origine de la surexpression en surface des cellules endothéliales de différentes molécules, dont les molécules d'adhérence. Celles-ci vont être responsables du recrutement des leucocytes circulants et de leur infiltration dans la paroi artérielle (**Figure I.4**) qui sont les premières étapes de formation des stries lipidiques et contribuent tout le long du processus athéromateux à la progression de la plaque. Le processus d'extravasation comporte plusieurs étapes incluant le roulement (« *rolling* ») des leucocytes à la surface des cellules endothéliales assurant leur freinage, l'adhérence proprement dite des leucocytes aux molécules d'adhérence et leur activation, et la migration à travers la paroi.

Plusieurs molécules d'adhérence semblent jouer un rôle dans le recrutement des monocytes. Les sélectines E et P jouent un rôle initiateur dans ce processus. En effet, la délétion des gènes codant pour ces protéines dans des souris apo E-déficientes réduit le développement des lésions athéromateuses de 40 % à 60 % [11]. De plus, dans les lésions athéromateuses humaines, une forte expression de la P-sélectine a été démontrée sur les endothéliums recouvrant des plaques matures [12]. Les sélectines E et P sont impliquées dans la phase précoce du recrutement des leucocytes, plus précisément : le « *rolling* ». Des marquages immunohistochimiques révèlent que VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) et ICAM-1 (*intracellular cell adhesion molecule-1*) sont exprimées de manière prédominante par l'endothélium des lésions précoces mais aussi par différentes cellules présentes dans l'intima des lésions avancées chez la souris et le lapin [13]. La délétion de ICAM-1 réduit le recrutement des monocytes à la lésion mais de manière moindre que la délétion de VCAM-1 [14]. L'augmentation de densité en macrophages dans la plaque est associée à l'expression de VCAM-1 alors que celle de la densité de lymphocytes implique la présence de ICAM-1 et de VCAM-1. Ces dernières, contrairement aux sélectines, vont engendrer un lien ferme entre l'endothélium et les leucocytes. Toutes ces molécules d'adhérence permettent donc le recrutement de monocytes et de lymphocytes au futur site d'athérosclérose. Ces molécules favorisent également la rétention des leucocytes par leur expression en surface des cellules de l'intima.

La migration des monocytes à travers la paroi artérielle est stimulée par diverses molécules chémoattractantes. Les LDL oxydées induisent l'expression de molécules telles que MCP-1 par les cellules endothéliales. Les monocytes exprimant le récepteur au MCP-1, le CCR2, remontent le gradient en chémokines pour arriver au site de lésion. La délétion des

gènes MCP-1 ou CCR2 réduit fortement le développement de lésions athéromateuses chez des souris apoE déficientes (ApoE<sup>-/-</sup>) [15]. Les LDL oxydées peuvent elles-mêmes attirer les monocytes. En effet, lors de la migration à travers l'endothélium, les monocytes se différencient en macrophages sous l'action du MCSF (*macrophage colony-stimulating factor*) sécrété par les cellules endothéliales. Cette différenciation se caractérise par l'acquisition de divers récepteurs dont les récepteurs scavenger qui reconnaissent les LDL oxydées.

Une fois recrutés dans l'intima, les macrophages vont produire un grand nombre de cytokines. La production de celles-ci joue un rôle central dans la progression de l'inflammation. Parmi les cytokines produites, l'IL-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ ) est particulièrement impliquée. L'expression de cette cytokine peut être induite par divers stimulus dont par certaines cytokines d'origine lymphocytaire comme le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating*) [16]. Il a également été rapporté que le TNF- $\alpha$  (*tumor necrosis factor- $\alpha$* ) stimule la production d'IL-1 $\beta$  par les monocytes [17]. Avec le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  est l'une des principales cytokines générées par les macrophages. Celle-ci favorise l'adhérence des leucocytes à l'endothélium, la prolifération des cellules endothéliales et l'activation des lymphocytes T. Une étude portant sur des souris Apo E déficientes dans lesquelles le gène IL-1 $\beta$  a été délété (ApoE<sup>-/-</sup> IL1 $\beta$ <sup>-/-</sup>) indique que ces souris présentent une diminution de la taille des lésions de 30 % comparativement aux souris contrôle (ApoE<sup>-/-</sup> IL1 $\beta$ <sup>+/+</sup>). De plus, le niveau d'expression d'ARN messager de VCAM-1 et de MCP-1 est significativement réduit chez ces souris par rapport aux souris contrôles [18].

### 1.3.3. Formation des cellules spumeuses et du centre nécrotique

La reconnaissance des LDL oxydées par les récepteurs « scavenger » provoque l'internalisation de ces particules par les macrophages. Ce processus mène à la formation de cellules chargées en cholestérol, les cellules spumeuses (**Figure I.4**). Celles-ci peuvent être dérivées de macrophages ou de cellules musculaires lisses. La présence de cellules spumeuses est un marqueur des lésions précoces, les stries lipidiques mais également des lésions tardives. Le cholestérol internalisé par les macrophages a divers devenir métaboliques dont l'estérification par l'acyl-CoA et le stockage dans des gouttelettes lipidiques caractérisant ces cellules. Les esters de cholestérol ainsi formés peuvent être hydrolysés et incorporés en membrane ou exportés de la cellule. L'incorporation en membrane inhibe l'activation du facteur de transcription SREBP nécessaire à la synthèse de cholestérol et à l'expression de récepteur aux LDL. Cependant, ce mécanisme ne permet pas d'inhiber l'internalisation du cholestérol par les récepteurs scavenger et par les mécanismes de phagocytose.

Avec le temps, les vacuoles lipidiques de plus en plus grandes vont entraîner la mort des cellules spumeuses et la libération du contenu lipidique dans l'intima formant ainsi le centre nécrotique. Des études utilisant des modèles animaux suggèrent que l'apoptose ou mort cellulaire programmée joue un rôle important dans la formation du corps nécrotique. L'apoptose des macrophages et des cellules musculaires lisses semble impliquer les interactions entre cellules et l'environnement inflammatoire local. Les LDL oxydées semblent

également favoriser l'apoptose et la nécrose dans la lésion [19]. En effet, ceux-ci sont cytotoxiques pour un grand nombre de types cellulaires.

#### **1.3.4. Migration des cellules musculaires lisses et formation de la chape fibreuse**

L'évolution de la strie lipidique vers une lésion complexe est caractérisée par la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima (**Figure I.5**). A cet endroit, ces cellules vont proliférer, et d'une part internaliser les LDL oxydés contribuant à la formation de cellules spumeuses et d'autre part, sécréter divers composants de la matrice extracellulaire menant à la formation d'une chape fibreuse autour du centre nécrotique. En effet, les cellules musculaires lisses perdent leur phénotype contractile pour adopter un phénotype sécrétoire. Elles sécrètent différentes molécules, comme du collagène et des protéoglycanes, des facteurs de croissance et diverses cytokines. La chape fibreuse contribue à la croissance et à la stabilité de la lésion [20].

La migration des cellules musculaires lisses est contrôlée par des facteurs de croissance et des cytokines, dont les plus importants sont le PDGF (*platelet derived growth factor*), le FGF (*fibroblast growth factor*), l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . Ces molécules sont sécrétées par différentes cellules activées dont les macrophages. De plus, les cytokines produites à la suite d'interactions entre macrophages et lymphocytes T, dont l'interféron  $\gamma$  semblent particulièrement impliquées dans ce processus.

#### **1.3.5. Rupture de la plaque et formation du thrombus**

La composition de la plaque athéromateuse est un facteur déterminant pour l'évolution clinique de la maladie. La plaque vulnérable se caractérise par une fine chape fibreuse, un large centre nécrotique et une haute densité en macrophages. En effet, les macrophages sécrètent des métalloprotéinases (MMP) affectant la stabilité de la plaque par dégradation des protéines matricielles (**Figure I.6**). Chez l'homme, dans des plaques athéromateuses vulnérables, trois collagénases interstitielles sont surexprimées, MMP-1, -8 et -13 [21] [22]. Du fait de leur réduction de masse par apoptose, les cellules musculaires lisses ne permettent pas de compenser ce phénomène en synthétisant de nouvelles protéines matricielles. De plus, l'interféron  $\gamma$  produit par les lymphocytes activés inhibe la synthèse de collagène par les cellules musculaires lisses

D'autres phénomènes sont associés à la fragilisation de la plaque athéromateuse, comme la néovascularisation. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins implique l'activation de protéases et le remodelage du tissu ; suggérant que ce phénomène contribue à l'instabilité de la plaque. De plus, ces vaisseaux nouvellement formés sont fragiles et provoquent des microhémorragies. La rupture de la plaque entraîne l'exposition des lipides de la plaque et des facteurs tissulaires au sang ; ce qui initie la cascade de coagulation, l'agrégation plaquettaire et la formation d'un thrombus (**Figure I.6**). L'agrégation plaquettaire est la conséquence première de la rupture de plaque qui se traduit par la formation d'un thrombus plaquettaire. L'exposition du sous-endothélium entraîne l'activation de premières plaquettes au niveau du

site de la rupture de la plaque. Ces premières plaquettes activées vont changer de forme et libérer des substances proagrégantes dont le thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) qui va entraîner le recrutement d'autres plaquettes et in fine la formation du clou plaquettaire stabilisé ou thrombus artériel. Ce thrombus artériel est responsable d'une occlusion de l'artère avec ischémie et nécrose de la région non irriguée. Suivant l'artère touchée par cette rupture de plaque, les conséquences peuvent être sévères (infarctus du myocarde dans une coronaire, accident vasculaire cérébral dans une carotide).

Beaucoup de médiateurs sont impliqués dans l'initiation et le développement des lésions athéromateuses mais aussi dans l'aggravation menant à la rupture de la plaque et à la formation du thrombus. Parmi ces médiateurs, deux dérivés de l'acide arachidonique : le TXA<sub>2</sub> et les isoprostanes semblent être particulièrement impliqués. Ci-dessous sont décrit leur nature, leur synthèse et leur implication dans l'athérosclérose.

## **2. Médiateurs issus de l'acide arachidonique impliqués dans l'athérosclérose**

La biosynthèse de dérivés de l'acide arachidonique issus d'une voie enzymatique [23] ou non enzymatique est augmentée chez les patients souffrant de lésions athéromateuses matures. Ces médiateurs semblent donc jouer un rôle dans le développement ou l'aggravation de l'athérosclérose. Parmi ces médiateurs, le thromboxane et l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> semblent particulièrement impliqués.

### **2.1. Le thromboxane A<sub>2</sub>**

#### **2.1.1. Cascade de l'acide arachidonique**

L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé composé de vingt atomes de carbone et contenant quatre doubles liaisons. Cet acide gras est le précurseur d'un grand nombre de molécules dont les prostaglandines, la prostacycline, le thromboxane A<sub>2</sub>, et les leucotriènes. L'acide arachidonique provient de l'hydrolyse des acides gras des phospholipides membranaires. Cette hydrolyse est catalysée par la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) libérant l'acide gras présent en position 2 sur le glycérol. Il existe différentes PLA<sub>2</sub> parmi lesquelles on distingue les PLA<sub>2</sub> sécrétoire (sPLA<sub>2</sub>), les PLA<sub>2</sub> cytoplasmiques (cPLA<sub>2</sub>) et les PLA<sub>2</sub> indépendantes du calcium (iPLA<sub>2</sub>). La cPLA<sub>2</sub> impliquée dans la cascade de l'acide arachidonique appartient à la famille des PLA<sub>2</sub> cytosoliques dépendantes du calcium pour leur activation et leur translocation vers la membrane du réticulum endoplasmique.

Une fois libéré de la bicouche phospholipidique, l'acide arachidonique peut suivre trois voies métaboliques distinctes (**Figure I.7**). Il peut être métabolisé par les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) et être converti en thromboxane, prostacycline ou prostaglandines. L'acide arachidonique peut également être le substrat de lipoxygénases (LO) produisant leucotriènes, lipoxines ou acide hydroxyéicosatétraénoïque (HETE). Le cytochrome P450 peut aussi convertir l'acide arachidonique en acides époxyéicosatriénoïques.

### 2.1.2. La voie des cyclooxygénases

Les cyclooxygénases sont les enzymes responsables de la biosynthèse des prostaglandines (PG), de la prostacycline ( $\text{PGI}_2$ ) et  $\text{TXA}_2$ . Elles catalysent la formation d'un cycle cyclopentanique, d'où leur nom.

Il existe au moins deux isoformes de cyclooxygénases : la COX-1 et la COX-2. La cyclooxygénase-1 est exprimée de façon constitutive dans la plupart des tissus, et plus particulièrement dans les reins et l'estomac où elle participe aux processus de défense de la muqueuse digestive et à la régulation de la circulation rénale, respectivement. Sa structure tridimensionnelle est caractérisée par trois domaines: un domaine EGF-like formé de deux doubles feuilletts  $\beta$ , un domaine de liaison à la membrane composé de quatre hélices  $\alpha$  dans lequel viendra se loger l'acide arachidonique ou les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et d'un domaine catalytique bifonctionnel. La COX-2 quant à elle, est une enzyme inductible impliquée dans de nombreux processus pathologiques. Elle partage une homologie de 60 % au niveau de la séquence en acides aminés avec la COX-1. L'induction de l'expression de la COX-2 dans divers types cellulaires liés à l'inflammation (monocytes, fibroblastes, ...) est provoquée par des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , mais aussi d'autres stimuli comme les molécules mitogènes.

Sous l'action des cyclooxygénases, l'acide arachidonique est converti en prostaglandine  $\text{H}_2$ . Cette réaction se déroule en deux étapes. Les COX dans un premier temps catalysent l'oxydation et la cyclisation de l'acide arachidonique permettant la formation de prostaglandine  $\text{G}_2$ . La seconde étape est une peroxydation qui transforme la  $\text{PGG}_2$  en  $\text{PGH}_2$ . Ce précurseur étant instable, il est rapidement transformé en divers métabolites (**Figure I.8**). La  $\text{PGH}_2$  peut subir des isomérisations par l'endoperoxyde D isomérase ou l'endoperoxyde E isomérase pour former les prostaglandines  $\text{D}_2$  et  $\text{E}_2$ , respectivement. La  $\text{PGH}_2$  peut être également réduite par l'endoperoxyde F réductase et former la prostaglandine  $\text{F}_{2\alpha}$ . Finalement, ce précurseur utilisé comme substrat par la prostaglandine synthétase et la thromboxane synthétase pour produire la prostaglandine  $\text{I}_2$  et le thromboxane  $\text{A}_2$ , respectivement. Tous ces métabolites jouent des rôles spécifiques dans diverses fonctions de l'organisme par liaison à leurs récepteurs.

### 2.1.3. Rôles physiologiques du thromboxane $\text{A}_2$

Le thromboxane  $\text{A}_2$  est un métabolite instable qui est rapidement dégradé en forme inactive, le thromboxane  $\text{B}_2$ . Le thromboxane  $\text{A}_2$  agit sur les cellules entourant le site de production, soit de façon autocrine ou paracrine. La stimulation des cellules par ces médiateurs provoque différentes réponses physiologiques et pathologiques.

Le thromboxane est notamment connu pour son activité contractile sur les cellules musculaires lisses de divers types (vasculaires [24], bronchique, ...) mais également son effet mitogène. Une des actions importantes du thromboxane est l'activation des plaquettes menant au changement de forme de celles-ci, à l'agrégation et à la formation du thrombus [25]. Sur

les cellules endothéliales, le thromboxane favorise l'expression de différentes molécules d'adhérence [26] et la production de PGI<sub>2</sub>.

## 2.2. Les isoprostanes

### 2.2.1. Formation des isoprostanes

Les isoprostanes, comme le thromboxane dérivent de l'acide arachidonique mais via une voie non-enzymatique impliquant la peroxydation lipidique [27]. En effet, la biosynthèse de ces composés est basée sur l'attaque des phospholipides par les ROS (*reactive oxygen species*). Ceux-ci attaquent les liaisons insaturées de l'acide arachidonique pour former des radicaux arachidonyles. Ceux-ci vont ensuite réagir avec l'oxygène et produire des radicaux peroxydes. Après endocyclisation et ajout d'oxygène, ces derniers forment des endoperoxydes bicycliques de type PGH<sub>2</sub>. La réduction partielle ou totale de ceux-ci va générer les isoprostanes de la série E<sub>2</sub> ou D<sub>2</sub> et F<sub>2</sub>, respectivement. Les isoprostanes représentent donc une famille d'isomères de prostaglandines. Selon la position du radical peroxyde, différents régioisomères peuvent être formés dans une même série. Dans la série F<sub>2</sub>, se trouve l'isoprostane de type III appelé également « 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ».

En plus de provenir de la peroxydation des phospholipides membranaires de divers types cellulaires, les isoprostanes peuvent également être issus des LDL.

### 2.2.2. Propriétés du 8-iso-PGF<sub>2α</sub>

Le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> présente différentes activités biologiques. Ainsi, il est capable d'induire la vasoconstriction et la synthèse d'ADN des cellules musculaires lisses vasculaires [28]. Il est également capable de moduler les fonctions plaquettaires. Il favorise l'agrégation plaquettaire en présence de différents activateurs [29].

## 2.3. Le récepteur TP

### 2.3.1. Distribution du récepteur TP

L'action du thromboxane est médiée par la liaison à son récepteur spécifique, le récepteur TP. Ce récepteur TP est présent dans différents tissus tels que le thymus, la rate, les reins, le cerveau, ... Il est exprimé par divers types cellulaires tels que les cellules endothéliales [30] et les cellules musculaires lisses [31].

### 2.3.2. Structure et isoformes du récepteur TP

Depuis le clonage de l'ADN complémentaire du gène codant pour le récepteur TP de cellules placentaires et de plaquettes humaines [32], de nombreuses études ont tenté de caractériser ce récepteur. Celui-ci présente sept domaines transmembranaires à hélice  $\alpha$ , ce qui le classe dans la famille des récepteurs à protéines G (**Figure I.9**). Des études génétiques ont confirmé la présence d'un seul gène codant pour le récepteur TP, localisé sur le

chromosome 19p13.3 [33]. Cependant, un second ADN complémentaire codant pour une autre forme du récepteur a été isolé de cellules endothéliales de cordon ombilical humain [30]. Chez l'homme, il existe donc deux isoformes du récepteur TP, l'isoforme  $\alpha$  clonée à partir du placenta et l'isoforme  $\beta$ . Ces deux isoformes sont identiques pour les 328 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale mais diffèrent dans le domaine C-terminal cytoplasmique. Les récepteurs TP $\alpha$  et TP $\beta$  ont 15 et 79 acides aminés en plus de leur séquence commune (**Figure I.9**). Cette différence s'explique par un mécanisme d'épissage alternatif qui considère l'exon 3 de l'ARN messager comme un intron formant l'isoforme  $\alpha$ . L'expression de l'isoforme  $\alpha$  est prédominante et similaire dans la plupart des cellules et tissus. Par contre, l'expression de l'isoforme  $\beta$  présente de fortes différences de tissus à tissus [31].

### 2.3.3. Distribution du récepteur TP

La stimulation du récepteur TP provoque l'activation de différentes cascades de signalisation régulant la mobilité, l'activation de facteurs de transcription, la prolifération, ... Le récepteur TP communique avec différentes protéines G qui sont responsables de l'activation de divers effecteurs incluant la phospholipase C, le facteur GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) et l'adenylyl cyclase. La première protéine G couplée au récepteur TP découverte fut la protéine G<sub>q</sub> [34]. Le récepteur est également capable de communiquer avec les protéines de la famille G<sub>12</sub> (G<sub>12</sub> et G<sub>13</sub>), G<sub>i</sub>, G<sub>s</sub> et G<sub>h</sub>. Cependant, les protéines interagissant principalement avec le récepteur TP sont les protéines G<sub>q</sub> et G<sub>13</sub>. La stimulation des protéines de la famille de protéines G<sub>12</sub> active le facteur RhoGEF. L'activation de celui-ci entraîne plusieurs réponses telles que la mobilité cellulaire, la contraction, la prolifération, l'apoptose. Par contre, la stimulation de la protéine G<sub>q</sub> (**Figure I.10**) mène à l'activation de la PLC- $\beta$  qui catalyse l'hydrolyse du phosphoinositol 4,5 biphosphate en 1,2diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Ce dernier se lie à son récepteur présent sur le réticulum endoplasmique et est responsable de l'efflux de calcium dans le cytoplasme. Le DAG, resté en membrane recrute et active les PKC. A leur tour, ces enzymes activent les intermédiaires des voies des MAP Kinases qui induisent la prolifération cellulaire. Les PKC et ces intermédiaires des voies des MAPK sont capables d'activer la phospholipase A<sub>2</sub> qui catalyse la libération d'acide arachidonique qui sera ensuite converti en prostanoides. Les PKC sont également responsables de l'expression de différents gènes impliqués dans divers processus.

### 2.3.4. Le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> lie le récepteur TP

Il a été démontré que le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  agit par l'intermédiaire du récepteur du thromboxane A<sub>2</sub> (TP) [35]. En effet, les effets induits par ce composé sont absents lors d'une déficience en récepteur TP [36] ou lors d'un antagonisme de ce dernier [37]. Cependant, l'existence d'un récepteur spécifique du 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  n'est pas exclue, cette hypothèse a déjà été proposée en 1993 par Fukunaga [38].

## 2.4. Rôles du thromboxane et du 8-iso-PGF<sub>2α</sub> dans l'athérosclérose

Les taux de thromboxane et isoprostanes anormalement augmentés dans les plaques athéromateuses et dans le sang des patients suggèrent l'implication de ces médiateurs dans l'initiation ou l'aggravation de la pathologie athéromateuse.

Afin d'évaluer le rôle du thromboxane dans le développement de l'athérosclérose, une étude portant sur des souris déficientes pour le récepteur aux LDL traitées avec de faibles doses en aspirine a été réalisée [39]. Après traitement, ces souris présentent un retard dans la progression des lésions athéromateuses par rapport aux souris non traitées. Le taux de thromboxane B<sub>2</sub> est nul et le taux de MCP-1 et d'ICAM-1 soluble est fortement réduit en comparaison aux souris contrôles. De plus, le traitement à l'aspirine permet de diminuer le contenu en cellules spumeuses de lésions et ainsi de réduire la progression de l'athérosclérose. Cette étude indique que le thromboxane dérivé de la cyclooxygénase-1 joue un rôle dans la progression des lésions athéromateuses.

Kobayashi et ses collaborateurs ont démontré qu'une déficience en récepteur TP chez des souris Apo E<sup>-/-</sup> freinait le processus d'athérogenèse [40], en diminuant le dysfonctionnement endothélial, l'adhérence des leucocytes à l'endothélium et la réactivité des plaquettes.

L'implication du 8-iso-PGF<sub>2α</sub> dans l'athérosclérose s'explique par sa présence au sein des plaques athéromateuses [41]. De plus, une corrélation entre de hauts taux de cet isoprostane et des facteurs de risque de l'athérosclérose comme le tabagisme et l'hypercholestérolémie a été observée. Un autre lien a été établi entre l'augmentation de la peroxydation lipidique et sévérité de l'atteinte vasculaire [42]; suggérant le rôle du 8-iso-PGF<sub>2α</sub> dans le développement de l'athérosclérose.

Les effets pro-athérogènes du 8-iso-PGF<sub>2α</sub> ont été démontrés dans un modèle murin dans lequel le récepteur TP est déficient (TP<sup>-/-</sup>). Après quatre semaines de traitement avec cet isoprostane, les souris contrôles (TP<sup>+/+</sup>) alors qu'il en est rien chez les souris TP<sup>-/-</sup> présentent une augmentation de l'expression de MCP-1 et d'ICAM soluble [36]; ce qui confirme que le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> joue un rôle important dans l'athérosclérose et que son action dépend du récepteur TP. Une autre étude a montré que la vitamine E, un antioxydant réduisait la progression des plaques athéromateuses chez les souris déficientes pour le récepteur aux LDL en diminuant les réactions oxydatives et inflammatoires [43]; suggérant également l'implication des isoprostanes dans l'athérosclérose.

## 2.5. Modulateurs de la voie de l'acide arachidonique et antagonistes du récepteur TP

En raison de l'implication du thromboxane  $A_2$  et du 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  dans le développement de l'athérosclérose, leur synthèse et ou leur action sont devenues des cibles thérapeutiques.

L'aspirine inhibe la cyclooxygénase-1 empêchant la production de thromboxane  $A_2$  plaquettaire, ce qui se traduit par un effet anti-agrégant plaquettaire et une diminution du risque d'accidents cardiovasculaires. La cyclooxygénase endothéliale, responsable de la synthèse de PGI $_2$  inhibant l'agrégation plaquettaire, n'est que partiellement affectée. Cependant, l'aspirine ne permet pas d'éviter la production des différents isoprostanes générés par voie non-enzymatique.

Les inhibiteurs spécifiques la cyclooxygénase-2 (Coxib) empêchent la production des prostaglandines inflammatoires. Cependant, ils n'empêchent pas la formation du thromboxane  $A_2$  par la COX-1, ni celle des isoprostanes. De plus, ils inhibent la production de PGI $_2$  qui est un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et un vasodilatateur. Les inhibiteurs de la thromboxane synthétase et les antioxydants bloquent la production du thromboxane et des isoprostanes, respectivement. Comme l'inhibition de la synthèse du thromboxane et des isoprostanes paraît difficile par un traitement unique, il existe un intérêt particulier pour l'inhibition des effets de ces médiateurs par antagonisme du récepteur TP.

Contrairement aux agonistes du récepteur, les antagonistes empêchent l'activation de celui-ci. Il existe différents antagonistes du récepteur TP, dont un de référence, le SQ29548. Cependant, il s'est révélé être un mauvais candidat pour le traitement des maladies cardiovasculaires car il possède des propriétés mutagènes. Un nouvel antagoniste du TP en phase II d'évaluation clinique, le S18886 (terutroban), semble prometteur. Depuis d'autres molécules ont été synthétisées dont le BM531, le BM567 et le BM573. Ceux-ci présentent une grande affinité pour le récepteur TP, une activité anti-agrégante plaquettaire et une activité myorelaxante de l'aorte de rat préalablement contractée avec un analogue du thromboxane, le U46619 [44] [45]. Le BM520, un isomère du BM573 est également capable de relaxer l'aorte de rat préalablement contractée avec le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  [46].

Cyrus et ses collaborateurs ont testé l'effet du BM573 sur le développement et la progression de l'athérosclérose chez des souris déficientes pour le récepteur aux LDL [47]. En plus d'inactiver le récepteur TP, le BM573 inhibe la thromboxane synthétase. Après douze semaines de traitement, le BM573 réduit de façon significative la progression des lésions athéromateuses mais affecte également la composition de la plaque. En effet, les lésions présentent 40 % en moins de macrophages/cellules spumeuses par rapport au placebo. Le traitement avec le BM573 permet également d'augmenter le nombre de cellules musculaires lisses et la quantité de collagène dans la plaque; ce qui renforce la stabilité de celle-ci. Cette molécule est donc très prometteuse.

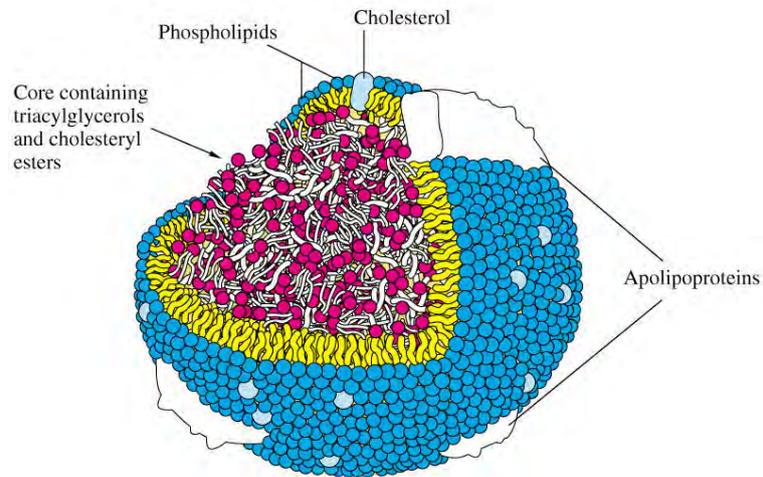
### 3.Objectifs du mémoire

L'athérosclérose est une maladie chronique inflammatoire qui suit un processus lent et progressif. La lésion débute par une accumulation de cholestérol dans la paroi artérielle déclenchant des processus complexes qui aboutissent au recrutement de cellules inflammatoires et à la formation d'une plaque athéromateuse. La migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima est une étape clef dans la progression de la lésion. La croissance continue de celle-ci va peu à peu empêcher la circulation correcte du sang et provoquer l'apparition de symptômes affectant la vie du patient.

Le développement de l'athérosclérose est influencé par un grand nombre de médiateurs. Parmi eux, le thromboxane et les isoprostanes semblent jouer un rôle déterminant. En effet, la production de ces molécules est anormalement élevée dans la plaque athéromateuse mais également au niveau plasmatique. Cependant, leurs rôles dans l'athérogenèse ne sont pas encore clairement définis. Ces deux médiateurs lipidiques exercent leur rôle via le récepteur TP. Une étude montre qu'un modèle de souris présentant un double knockout apoE<sup>-/-</sup>TP<sup>-/-</sup> développe des lésions remarquablement plus petites que celles des souris apoE<sup>-/-</sup> [40]. Cette observation suggère l'implication du récepteur TP dans le développement de l'athérosclérose. Ce récepteur est exprimé par différents type cellulaire présents dans la plaque athéromateuse : les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules musculaires lisses et les plaquettes. Afin de déterminer le mécanisme responsable de la réduction de l'athérosclérose chez les souris apoE<sup>-/-</sup>TP<sup>-/-</sup>, Zhuge et ses collaborateurs ont examiné le rôle du récepteur TP des cellules dérivées de la moelle dans le développement des lésions athéromateuses [48]. Pour ce faire, la moelle osseuse de souris apoE<sup>-/-</sup> ou apoE<sup>-/-</sup>TP<sup>-/-</sup> a été transplantée chez des souris apoE<sup>-/-</sup> ou apoE<sup>-/-</sup>TP<sup>-/-</sup> dont la moelle a été irradiée. Après douze semaines de régime riche en lipides, les lésions athéromateuses ont été analysées. Chez les souris apoE<sup>-/-</sup> transplantées avec des cellules de moelle provenant de souris apoE<sup>-/-</sup> ou apoE<sup>-/-</sup>TP<sup>-/-</sup>, la taille des lésions est semblable à celle des souris apoE<sup>-/-</sup> non transplantées. Par contre, chez les souris apoE<sup>-/-</sup>TP<sup>-/-</sup> transplantées avec des cellules de moelle provenant de souris apoE<sup>-/-</sup> ou apoE<sup>-/-</sup>TP<sup>-/-</sup>, la taille des lésions est fortement réduite. Ce résultat indique que la diminution de l'athérosclérose chez les souris TP<sup>-/-</sup> n'est pas due à l'absence du récepteur TP sur les cellules dérivées de la moelle. Sur base de cette étude, l'impact des agonistes du récepteur TP sur l'athérosclérose est dû à leur effet sur d'autres types cellulaires exprimant le récepteur TP que les macrophages et les plaquettes. L'effet des agonistes du récepteur TP sur les cellules endothéliales a déjà été largement étudié. Ceux-ci ont pour principaux effets d'augmenter l'adhérence de leucocytes et leur infiltration dans l'intima [49]. Par contre, peu de chose sont connues à propos de leurs effets sur les cellules musculaires lisses des artères touchées. Un certain nombre de publications traite de ce sujet mais ces travaux ont été réalisés sur des cellules animales, peu relevant du contexte pathologique humain.

Comme les agonistes du récepteur TP semblent jouer un rôle important dans la progression des lésions athéromateuses, la modulation de l'activation du récepteur TP est devenue une cible thérapeutique attractive pour prévenir ou retarder le développement de l'athérosclérose. L'objectif principal de ce mémoire est d'étudier l'effet de deux agonistes du

récepteur TP ; le U46619, un analogue du thromboxane et l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sur différents paramètres impliqués dans le développement de l'athérosclérose tels que la prolifération cellulaire et l'expression de gènes pro-inflammatoires sur des cellules musculaires lisses d'artères humaines. Afin de mimer le contexte inflammatoire qui règne dans la plaque athéromateuse, les effets de ces deux agonistes du récepteur TP ont également été explorés en combinaison avec la cytokine pro-inflammatoire IL-1β. L'étude des effets de deux antagonistes, le SQ29548 et le BM520 sur l'inactivation du récepteur TP est également décrite dans ce mémoire. L'ensemble de ces résultats nous permettra d'obtenir une meilleure compréhension du rôle des agonistes du récepteur TP dans la pathologie humaine.



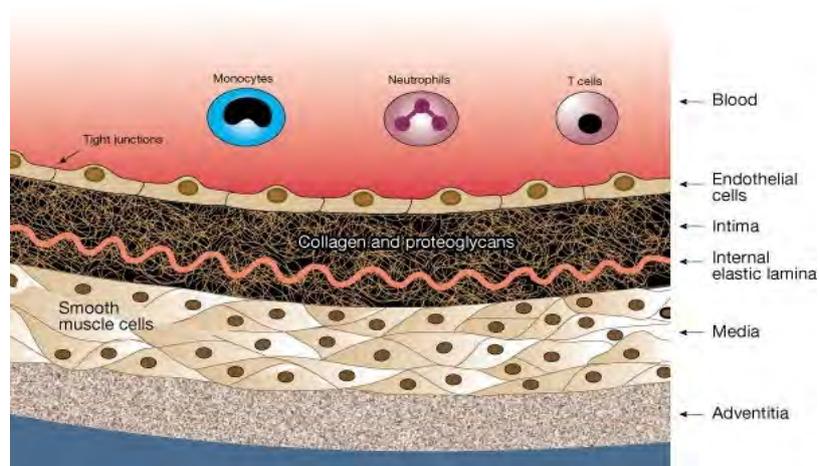
**Figure I.1. Structure des lipoprotéines.**

Le cœur des lipoprotéines est essentiellement constitué de composants hydrophobes; les triglycérides et les esters de cholestérol. En surface, ces lipides insolubles sont recouverts d'une couche amphiphile composée de phospholipides, de cholestérol non estérifié (libre) et d'apo(lipo)protéines.

(<http://www.uwsp.edu/chemistry/tzamis/ch260/lipoprotein.jpg>)

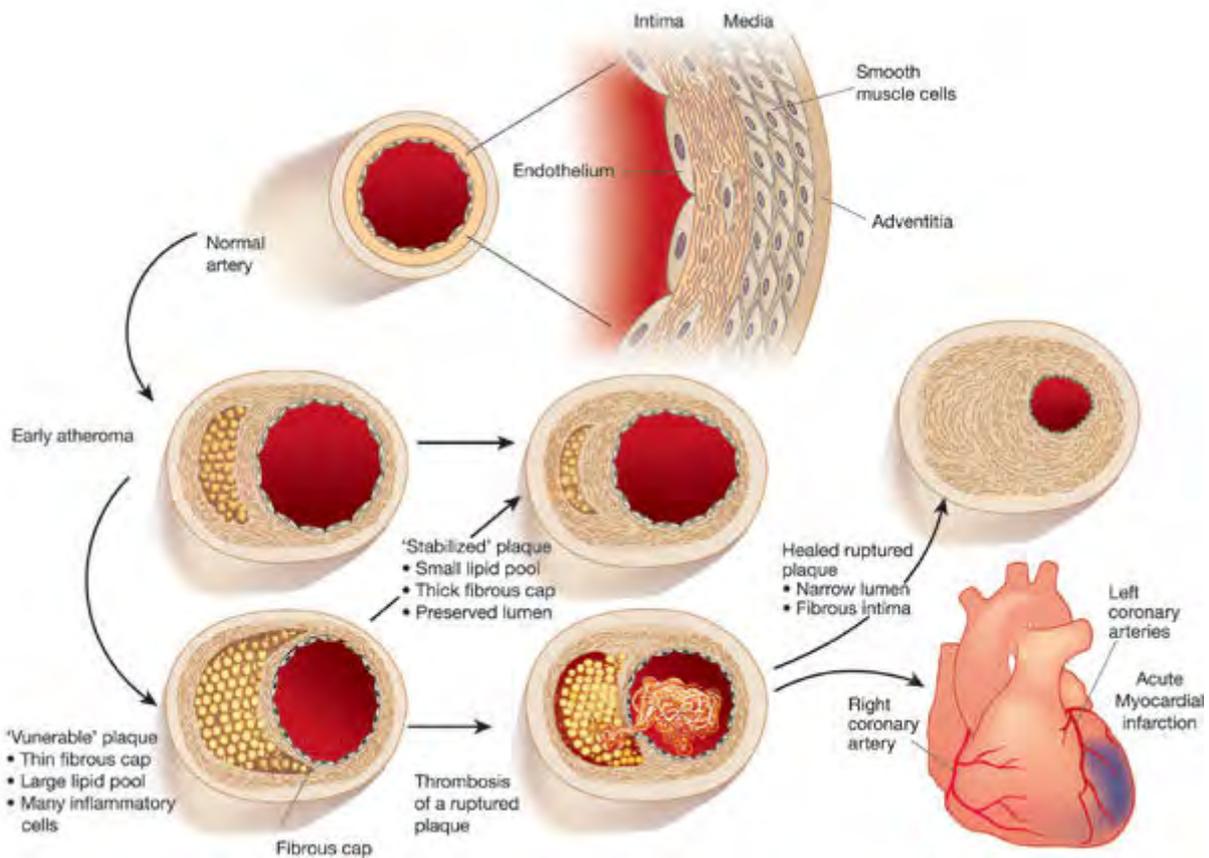






**Figure I.2. Structure d'une artère saine**

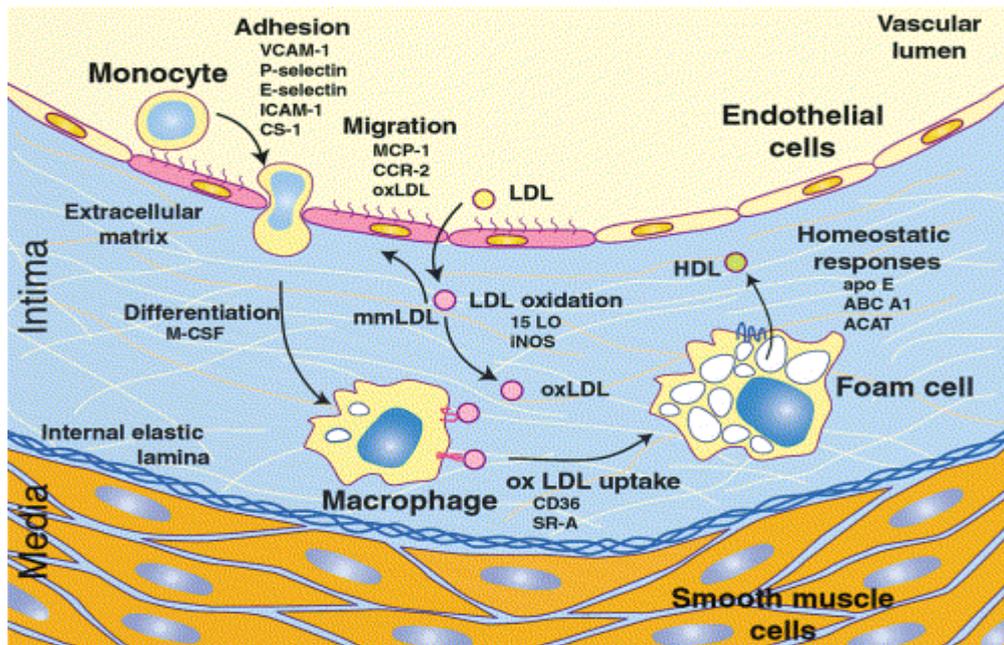
La paroi artérielle est composée de trois tuniques. L'intima, en contact avec le flux sanguin est majoritairement constitué de cellules endothéliales. La média, la couche intermédiaire est principalement constituée de cellules musculaires lisses mais aussi de constituants extracellulaires. En périphérie se trouve l'adventice qui est constituée d'adipocytes, de fibres de collagène et d'élastine. (Lusis 2000)



**Figure I.3. Evolution de la lésion athéromateuse**

L'athérosclérose suit un processus lent et progressif passant par plusieurs stades. La lésion débute par une accumulation de macrophages dérivés de monocytes gorgés de cholestérol dans la paroi artérielle. Cette lésion précoce correspond à la strie lipidique. Sous l'action de divers médiateurs, les cellules musculaires de la média migrent vers l'intima où elles forment la chape fibreuse. La partie lipidique et la chape fibreuse forment la plaque athéromateuse. Celle-ci peut se stabiliser ou évoluer vers une lésion plus complexe. L'évolution de la maladie dépend de la composition de la plaque. La plaque vulnérable se caractérise par une fine chape fibreuse, un large centre nécrotique et une haute densité en macrophages. La rupture de la plaque entraîne la formation d'un thrombus qui sera responsable de symptômes affectant la vie du patient, comme un infarctus du myocarde. Le thrombus peut également s'incorporer à la paroi et réduire davantage la lumière artérielle.

(Libby 2002)



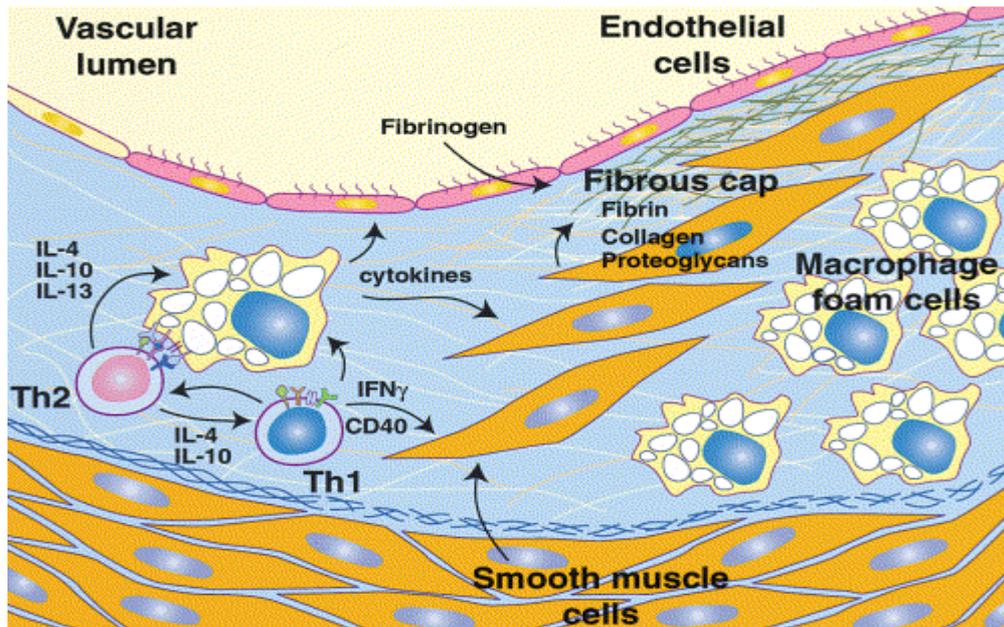
**Figure I.4. Athérogenèse : initiation de la lésion et formation des cellules spumeuses.**

L'initiation de la lésion débute par l'accumulation de LDL dans l'espace sous-endothélial. A cet endroit, ces particules sont sujettes à des modifications telles que l'oxydation. Ce phénomène mène à la production de mmLDL (minimally modified LDL) et de oxLDL (oxidized LDL). Les mmLDL ont la capacité d'activer l'endothélium en augmentant l'expression de molécules d'adhérence et de molécules chemoattractantes comme le MCP-1. L'expression de ces molécules provoque le recrutement des leucocytes. Une fois l'endothélium traversé, les monocytes se différencient en macrophages et internalisent les oxLDL via les récepteurs « scavenger ». Ce phénomène donne naissance aux cellules spumeuses.

(Glass 2001)



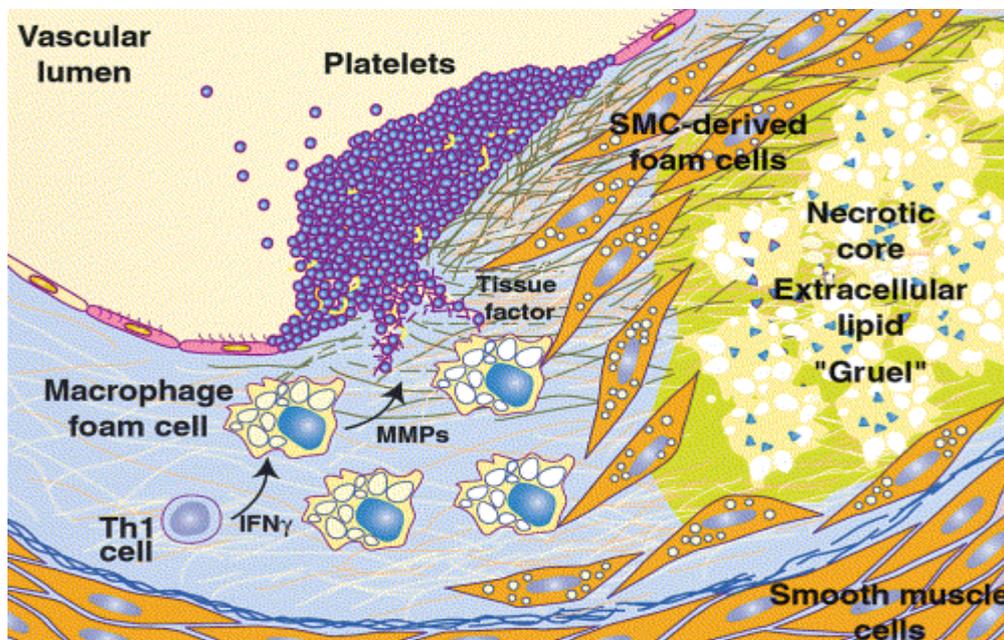




**Figure I.5. Athérogenèse : progression de la lésion.**

Les interactions entre lymphocytes et macrophages et les cytokines produites par ces derniers provoquent la migration des cellules musculaires lisses de la média vers l'intima. A cet endroit, ces cellules vont proliférer et sécréter de la matrice extracellulaire formant une chape fibreuse. Les cytokines produites vont accentuer l'inflammation locale.

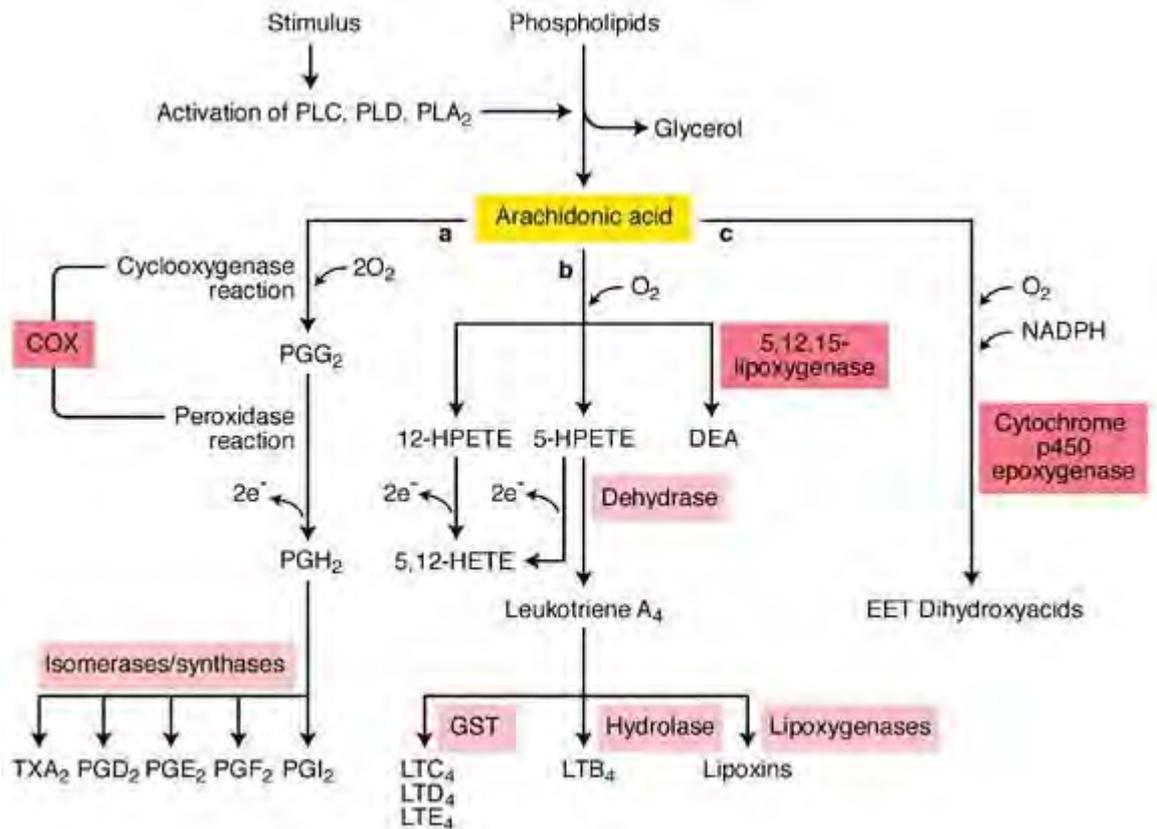
(Glass 2001)



**Figure I.6. Athérogenèse : formation du corps nécrotique et rupture de la plaque.**

Les cellules spumeuses dérivées de macrophages et de cellules musculaires lisses meurent avec le temps et sont à l'origine de la formation du corps nécrotique. Sous l'action de diverses cytokines, les macrophages vont sécréter des métalloprotéinases affectant la stabilité de la plaque. La rupture de la plaque provoque l'aggrégation plaquettaire et la formation d'un thrombus.

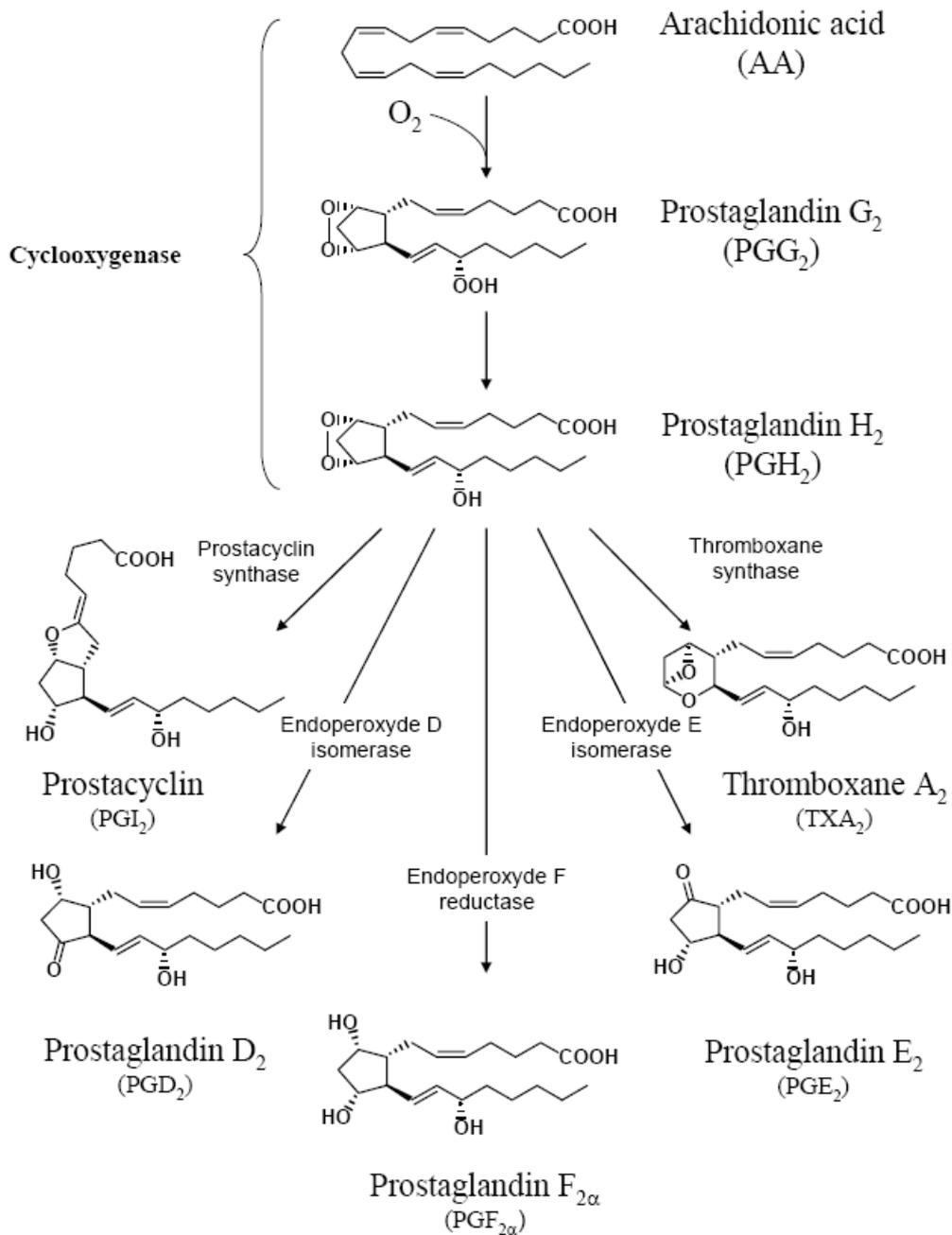
(Glass 2001)



### Figure I.7. Les différentes voies métaboliques de l'acide arachidonique

Une fois libéré de la bicouche phospholipidique, l'acide arachidonique peut entrer dans différentes voies métaboliques distinctes. Il peut être métabolisé par les cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) en thromboxane A<sub>2</sub>, prostacycline ou prostaglandines. L'acide arachidonique peut également être le substrat de lipoxygénases (LO) produisant les leucotriènes, les lipoxines ou l'acide hydroxyeicosatétraénoïque (HETE). Le cytochrome P450 peut aussi convertir l'acide arachidonique en acides époxyéicosatriénoïques.

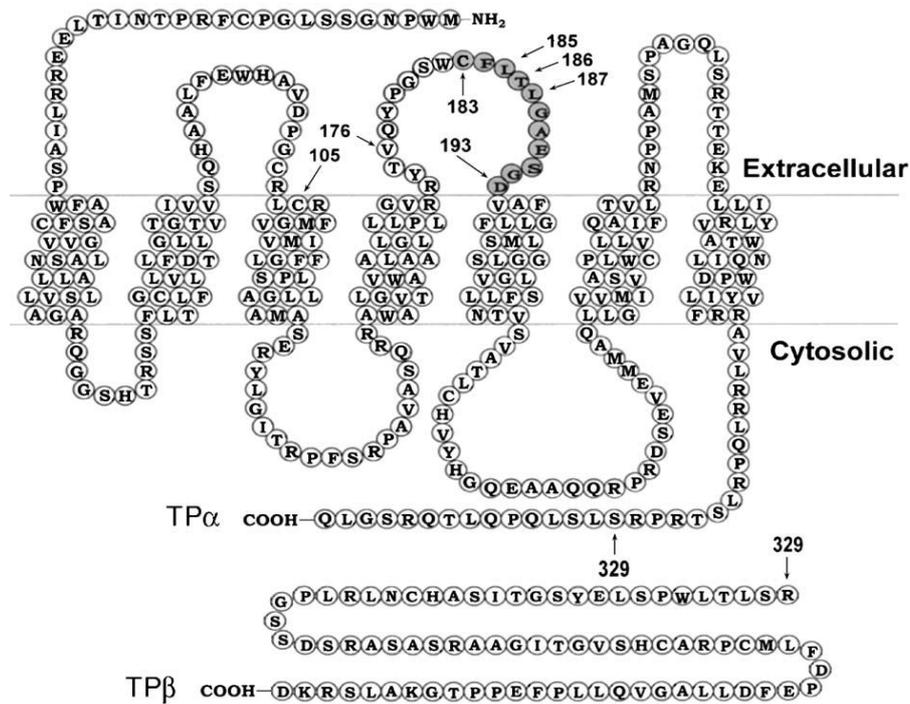
(<http://www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/03005854h.htm>)



**Figure I.8. La voie des cyclooxygénases**

Sous l'action des cyclooxygénases, l'acide arachidonique est converti en prostaglandine G<sub>2</sub> et ensuite en PGH<sub>2</sub>. Ce précurseur est rapidement transformé pour produire divers métabolites, la prostacycline, le thromboxane A<sub>2</sub> et les prostaglandines.

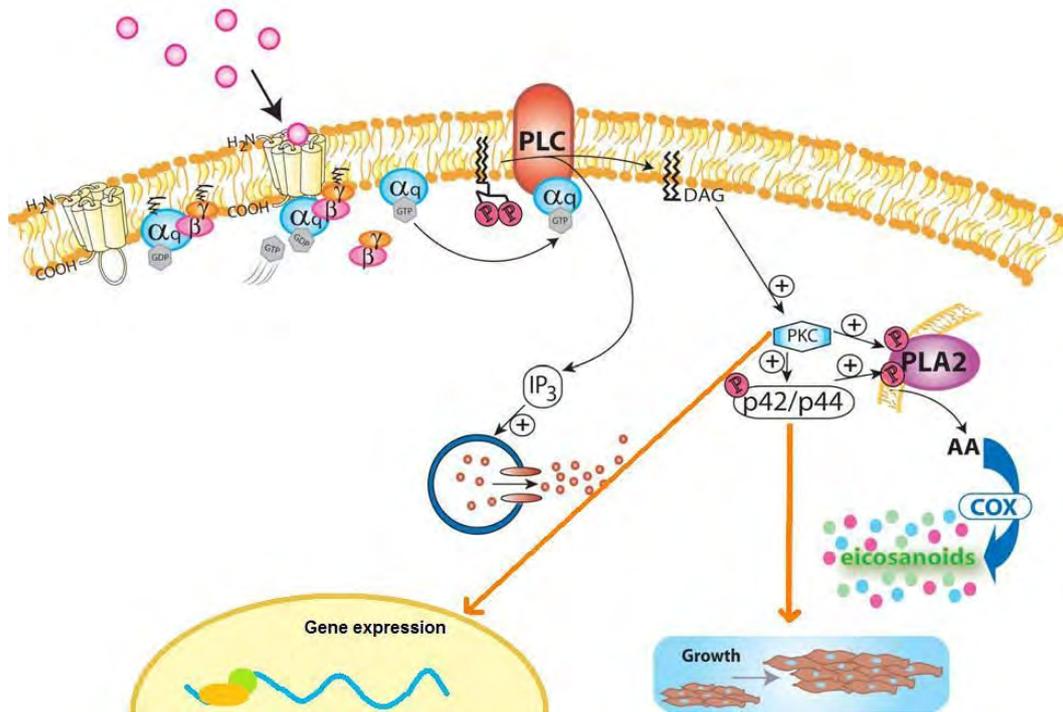
(Hanson, 2007)



### Figure I.9. Structure et isoformes du récepteur TP

Le récepteur TP est un récepteur à protéine G présentant sept domaines transmembranaires à hélice  $\alpha$ . Chez l'homme, il existe deux isoformes du récepteur TP, l'isoforme  $\alpha$  et l'isoforme  $\beta$ . Ces deux isoformes sont identiques pour les 328 premiers acides aminés de l'extrémité N-terminale mais diffèrent dans le domaine C-terminal cytoplasmique.

(Huang *et al.* 2004)



### Figure I.10. Signalisation du récepteur TP

La stimulation du récepteur TP mène entre autre, à l'activation de la protéine  $G_q$ . Celle-ci provoque l'activation de la PLC- $\beta$  qui catalyse l'hydrolyse du phosphoinositol 4,5 biphosphate en 1,2diacylglycérol (DAG) et en inositol 1,4,5-triphosphate ( $IP_3$ ). Ce dernier se lie à son récepteur présent sur le réticulum endoplasmique et est responsable de l'efflux de calcium dans le cytoplasme. Le DAG, resté en membrane, recrute et active les PKC. A leur tour, ces enzymes activent les intermédiaires des voies des MAP Kinases responsables de la prolifération cellulaire. Les PKC et ces intermédiaires des voies des MAPK sont capables d'activer la phospholipase  $A_2$ , qui catalyse la libération d'acide arachidonique qui sera ensuite converti en prostanoïdes. Les PKC sont également responsables de l'expression de différents gènes impliqués dans divers processus.

(modifié par partir de *Billington 2003*)

## II. Matériel et méthodes

### 1. Culture cellulaire

La lignée cellulaire utilisée est la lignée T/G HA-VSMC (LGC Promochem), des cellules musculaires d'aorte humaine. Ces cellules ont été prélevées d'une aorte saine d'un enfant (fille) âgé de 11 mois de type caucasien. La morphologie de ces cellules est semblable à celle des fibroblastes : allongée avec des prolongements cytoplasmiques (**Figure II.1**). Les HVSMC sont cultivées dans du milieu F12 contenant 10 % de sérum et divers compléments (**Tableau II.1**) à 37 °C et dans une atmosphère contenant 5 % de dioxyde de carbone.

#### 1.1. Matériel

- Milieu de culture F12 HAM (Gibco, UK) + compléments (**Tableau II.1**)
- FBS (*fœtal bovine serum*) (Gibco, UK)
- Trypsine 0,5 g/l-EDTA 0,2 % dans solution de Puck (Gibco, UK)
- PBS (*phosphate buffer saline*) (Gibco, UK)
- Tubes 10 ml (Sterilin, UK)
- Boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (T75) (Costar, Corning, USA)
- Boîtes de culture de 25 cm<sup>2</sup> (T25) (Costar, Corning, USA)
- Plaque 24 puits (Costar, Corning, USA)
- Plaque 96 puits (Costar, Corning)
- Pipettes de 2, 5, 10 et 25 ml (Sarstedt Allemagne)

#### 1.2. Méthode

Le repiquage de ces cellules se déroule en conditions stériles lorsque celles-ci atteignent un degré de confluence élevé, c'est-à-dire trois fois par semaine. Le milieu de culture, la trypsine-EDTA, le milieu servant à inhiber celle-ci (milieu F12 + 10 % de sérum) et le PBS sont préchauffés à 37 °C. Les boîtes de culture sont tout d'abord décantées et rincées au PBS. Les cellules sont ensuite brièvement exposées à la trypsine-EDTA. Une fois les cellules détachées, 5 ml de milieu contenant 10 % de sérum sont ajoutés et les cellules sont transférées dans un tube pour être centrifugées 5 minutes à 1200 rpm. Le surnageant est ensuite décanté et le culot est resuspendu dans du milieu complet. La suspension cellulaire est finalement distribuée dans de nouvelles boîtes de culture T75 pour continuer la culture ou dans des T25 ou plaques 24 ou 96 puits à différentes densités pour la stimulation.

## 2. Stimulation des cellules

### 2.1. Molécules utilisées (**Figure II.2**)

- U46619 (Cayman Chemical, USA) : analogue du thromboxane et agoniste du récepteur TP. Resuspendu dans du DMSO (Acros) à une concentration de  $3.10^{-2}$  M et conservé à -20 °C. Utilisé à une concentration finale de 1 μM

- 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (Cayman Chemical, USA): agoniste du récepteur TP. Resuspendu dans du DMSO (Acros) à une concentration de 2.10<sup>-2</sup> M et conservé à -20 °C. Utilisé à une concentration finale de 50 μM
- BM520 (département de pharmacie FUNDP): antagoniste du récepteur TP. Resuspendu dans du DMSO (Acros) à une concentration de 2.10<sup>-3</sup> M et conservé à -20 °C. Utilisé à une concentration finale de 1 μM
- SQ29548 (Cayman Chemical, USA) : antagoniste du récepteur TP. Resuspendu dans du DMSO (Acros) à une concentration de 2.10<sup>-3</sup> M et conservé à -20 °C. Utilisé à une concentration finale de 1 μM
- IL-1β (R&D system 201-LB) : cytokine pro-inflammatoire. Resuspendue dans du PBS à une concentration de 10 μg/ml. Utilisée à une concentration de 3 ng/ml.

## 2.2. Méthode

Avant toute stimulation, les cellules sont privées de sérum pendant une période de 24 heures. Ensuite, les cellules sont incubées 6 heures avec l'agoniste U46619 à 1 μM ou le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> à 50 μM et/ou avec l'IL-1β à 3 ng/ml avec ou sans pré-incubation d'une heure avec les antagonistes BM520 à 1 μM ou SQ29548 à 1 μM.

## 3. Mesure de la libération de calcium cytoplasmique au Fura-2 AM

### 3.1. Matériel

- PBS (1 l) : 9 g NaCl et 20 ml tampon phosphate pH 7,4
- Tampon Krebs-Hepes (mM): NaCl 118, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 4.2, Glucose 11.7, CaCl<sub>2</sub> 1.3, HEPES 10
- BSA (Sigma)
- Pluronic F127 (Invitrogen USA)
- Fura-2 AM (Invitrogen USA)
- Triton X100 18 % (Sigma, USA)
- EGTA 190 mM
- Fluorimètre

### 3.2. Méthode

Dans des plaques 96 puits, les cellules sontensemencées à raison de 10.000 cellules par puits. Les cellules sont tout d'abord rincées une fois au PBS et deux fois au tampon Krebs-Hepes contenant 0,5 % de BSA avant d'être incubées en présence de la sonde Fura-2 AM à une concentration finale de 5 μM et du pluronic F127 (0,02 % final) dans le tampon contenant 0,5 % de BSA. Après une heure d'incubation à 37 °C, les puits sont lavés 3 fois le tampon. La fluorescence basale est tout d'abord mesurée. Ensuite, l'agoniste du récepteur TP est ajouté à différentes concentrations et la fluorescence stimulée est mesurée après 1 minute. Les

longueurs d'onde d'excitation sont de 340 et 380 nm et la longueur d'émission est de 510 nm. Le ratio de la fluorescence des deux longueurs d'onde noté  $R_{340/380}$  est calculé et la concentration en calcium intracellulaire est calculée par la formule suivante :  $[Ca^{2+}]_i = (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$  où les ratios  $R_{min}$  et  $R_{max}$  sont déterminés par l'ajout d'EGTA 190 mM final et de Triton X100 18% final respectivement.

## 4. Test de prolifération : dosage MTT

Toutes les cellules métaboliquement actives incorporent le MTT. Celui-ci est ensuite clivé en son dérivé formazan formant des cristaux violet insolubles. Cette réaction est catalysée par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Le dosage MTT permet donc de tester la viabilité cellulaire et de façon indirecte la prolifération induite par une molécule. Ainsi, une corrélation entre la quantité de MTT modifié libéré après lyse des cellules et la quantité de cellules et donc la prolifération cellulaire peut-être faite.

### 4.1. Matériel

- MTT (Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-yl)-2,5-diphényltétrazolium, Sigma)
- PBS
- Solution MTT 2,5 mg/ml de PBS (Sigma)
- Solution de lyse (2 volumes de SDS 30 % - 1 volume de N,N-diméthylformamide) pH 4,7

### 4.2. Méthode

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits à une densité de  $1.10^4$  cellules/puits. Après une mise au repos de 24 h, les cellules sont cultivées pendant quatre jours en présence des différentes molécules et de divers inhibiteurs (**Tableau II.2**) dans le milieu complet contenant 0,5 % de sérum. Après deux jours, le milieu de stimulation est renouvelé. Au quatrième jour, 500  $\mu$ l de solution MTT sont ajoutés dans le milieu de stimulation de chaque puits. Suite à une incubation de 2 h à 37 °C, le milieu est décanté et les cellules sont lysées (1 ml de solution de lyse par puits) sous agitation à 37 °C jusqu'à dissolution totale des cristaux violets. Finalement, l'absorbance des puits est lue à 570 nm.

## 5. Dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford

La méthode de Bradford est une méthode d'analyse spectrométrique qui permet de déterminer la concentration en protéines de divers échantillons cellulaires. Cette méthode se base sur un changement de propriétés physico-chimiques du bleu de Coomassie. En solution, ce colorant se trouve sous la forme cationique rouge dont l'absorbance est de 465 nm. Lié aux protéines, il devient anionique et bleu dont l'absorbance est de 595 nm. L'absorbance d'un échantillon donné sera donc proportionnelle à la quantité de protéines présente dans cet échantillon.

## 5.1 Matériel

- Solution Bradford diluée 5x (Bio-Rad, USA)
- BSA 2 µg/µl (Sigma)
- H<sub>2</sub>O distillée
- Tampon de lyse (voir tableau II.3)
- Spectrophotomètre
- Tubes (Kartels, Italie)

## 5.2. Méthode

2,5 µl de chaque échantillon sont ajoutés à intervalles réguliers dans des tubes contenant 1 ml de solution Bradford. La même quantité de tampon de lyse utilisé lors de l'extraction protéique est également transférée dans un de ces tubes et servira de blanc. L'absorbance de ce tampon sera soustraite de celle de tous les échantillons. Après 5 minutes de réaction, l'absorbance des échantillons est mesurée tube par tube toujours à intervalles réguliers. L'absorbance de concentrations connues en BSA est également mesurée et permettra de déterminer la concentration en protéines des échantillons selon la formule :

$$\frac{[(DO_{\text{moyenne}} \text{ échantillon} - DO_{\text{moyenne}} \text{ tampon lyse} / DO_{\text{moyenne}} \text{ BSA} - DO_{\text{moyenne}} \text{ H}_2\text{O})] \times C_{\text{BSA}}}{\text{Volume échantillon } (\mu\text{l})}$$

Volume échantillon (µl)

## 6. Extraction protéique totale pour western blot

### 6.1. Matériel

- Tampon de lyse (**Tableau II.3**)
- Racloir
- Centrifugeuse 4°C

### 6.2. Méthode

Après stimulation des cellules, les boîtes T25 sont placées sur glace et décantées à l'aide de pipettes pasteur. Ensuite, 200 µl de tampon de lyse sont déposés sur le tapis cellulaire de chaque boîte et les cellules sont raclées et transférées dans des microtubes. Après centrifugation de ces lysats 5 minutes à 13.000 rpm, les surnageants sont collectés et conservés à -70 °C. Une fraction de chaque surnageant est prélevée et servira pour le dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford.

## 7. Western blot

Le western blot permet de mettre en évidence l'abondance ou la phosphorylation d'une protéine d'intérêt. Cette technique se déroule en plusieurs étapes. Les protéines vont tout d'abord migrer dans un gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) selon leur poids moléculaire avant d'être transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidènefluoride). L'anticorps spécifique de la protéine d'intérêt est ensuite mis en contact avec cette membrane et la révélation est réalisée grâce à un anticorps secondaire couplé à la HRP.

### 7.1. Matériel

(Tableau II.4.)

- Gel buffer
- Acrylamide (BioRad laboratories)
- Spacer gel buffer
- Running buffer
- Bleu de charge 5x
- Blotting buffer
- TBS 10x
- Running gel
- Stacking gel
- Bloc chauffant
- Cuves
- Papier whatman
- Membrane de PVDF
- Anticorps (Tableau II.5.)
- Etalon (Seeblue plus, Invitrogen)
- Tween
- ECL blocking agent (Amersham Biosciences, Sweden)
- Solution de révélation (Amersham Biosciences, UK)

### 7.2. Méthode

#### 7.2.1. Préparation des gels

Une fois les plaques de verre assemblées pour former un système étanche, le running gel est préparé et coulé. Celui-ci est ensuite recouvert avec de l'isobutanol saturé et est laissé polymériser 1 heure. Après polymérisation, l'isobutanol est éliminé par d'abondants lavages à l'eau distillé. Le stacking gel est ensuite coulé au dessus du running gel et le peigne est introduit dans celui-ci. Durant la période de polymérisation de 30 minutes, les échantillons sont préparés.

#### 7.2.2. Préparation des échantillons et migration

Afin d'engager une même quantité en protéines, une quantité définie de chaque échantillon est prélevée (entre 12 et 20  $\mu\text{g}$ ) et ce volume est porté à 12  $\mu\text{l}$ . 3  $\mu\text{l}$  de bleu de charge sont ajoutés dans chaque échantillon. Ce composant permet d'alourdir et de visualiser la migration des échantillons. Les échantillons sont ensuite placés 5 minutes sur un bloc chauffant à 100  $^{\circ}\text{C}$  pour dénaturer les protéines.

Une fois la polymérisation du stacking gel terminée, le peigne est enlevé et le gel est placé dans la cuve de migration où est ensuite versé le tampon d'électrophorèse (running buffer) 1x. Finalement, 10 µl d'étalon de poids moléculaire ou 13,5 µl de chaque échantillon sont déposés dans les puits et la migration est lancée.

### 7.2.3. Transfert sur membrane

Après migration des échantillons, le gel est démoulé et les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidènefluoride (PVDF) préalablement activée au méthanol. Pour ce faire, un montage en « sandwich », éponge-papier whatman-gel-membrane-papier whatman-éponge imbibé de tampon de transfert est réalisé. Ce transfert semi-sec se déroule pendant 2 heures à 1 mA/cm<sup>2</sup> ou overnight à 35 mA.

### 7.2.4. Traitement de la membrane

Le transfert terminé, le montage est démonté et la membrane est transférée dans un biberon où elle est incubée en présence de solution de blocage (TBS-tween 0,1 % contenant 2 % d'agent bloquant) 1 h à température ambiante ou overnight à 4 °C. Après blocage, la membrane est incubée 1 h avec l'anticorps primaire. Après trois lavages au TBS-tween 0,1 %, la membrane est incubée 1 h avec l'anticorps secondaire, spécifique de l'espèce ayant produit le premier anticorps et couplé la HRP (horseradish peroxidase).

### 7.2.5. Révélation

Une fois lavée, la membrane est prête pour la révélation. La présence de la protéine d'intérêt est révélée par chémoluminescence : le substrat ECL dégradé par la HRP produit de la lumière qui est détectée sur un film photographique. La membrane est donc recouverte d'un mélange des deux substrats reconstituant la solution de révélation avant d'être mise en contact avec le film. Le temps d'exposition du film varie en fonction de la quantité en protéines et des anticorps utilisés.

## 8. Extraction nucléaire

### 8.1. Matériel (Tableau II.6)

- PBS
- PBS + 1 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> + 5 mM NaF
- HB (Hypotonic Buffer) 10x
- H<sub>2</sub>O distillée
- Tampon de lyse 0,5 % NP-40
- RE (Resuspension Buffer)
- SA (Saline Buffer)
- Racloirs
- Centrifugeuse

### 8.2. Méthode

Après stimulation des cellules, les boîtes T75 sont placées sur glace et rincées deux fois : une première fois avec 10 ml de PBS et une deuxième fois avec 10 ml de PBS contenant 1 mM de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> et 5 mM de NaF. Les cellules sont ensuite incubées dans 10 ml de HB 1x

pendant 5 minutes. Après cette courte incubation, ce tampon est décanté et les cellules sont raclées dans 500 µl de tampon de lyse. Les lysats cellulaires sont ensuite incubés 5 minutes sur glace avant d'être transférés dans des microtubes. Après une centrifugation de 30 secondes à 13.000 rpm, les surnageants sont décantés et les culots sont resuspendus dans 50 µl de RE. Après resuspension du culot, un même volume de SA est rajouté. Ensuite, les microtubes sont placés sur roue à 4 °C pendant 30 minutes avant d'être à nouveau centrifugés 10 minutes. Les surnageants sont finalement aliquotés et conservés à -70 °C. Une fraction de chaque surnageant est prélevé et servira pour le dosage de la concentration en protéines par la méthode de Bradford.

## 9. Dosage colorimétrique de l'activité de liaison des facteurs de transcription à leur séquence consensus (Trans-AM)

Cette méthode permet de mesurer la capacité de liaison d'un facteur de transcription à sa séquence spécifique. Les extraits nucléaires sont déposés dans des puits où ont été préalablement fixés des brins d'ADN contenant le site spécifique d'un facteur de transcription donné. La quantification de la liaison du facteur de transcription d'intérêt à sa séquence est réalisée grâce à des anticorps spécifiques de la protéine et des anticorps secondaire couplés à la HRP. La coloration résultant du clivage du substrat par cette enzyme permet de quantifier la liaison du facteur de transcription à sa séquence spécifique.

### 9.1. Matériel

- PBS 50 (1 l) : 3 g NaCl + 20 ml de tampon phosphate
- Tween 20 (Sigma)
- TMB (BioSource, Belgique)
- NF-kB (Tableau II.7.1)
- Tampon de binding concentré
- Tampon de binding complet 1x
- Tampon de lyse stock
- Tampon de lyse complet
- Gloria
- Solution STOP (BioSource, Belgique)
- Lecteur de plaque (Bio-Rad)
- AP-1 (Tableau II.7.2)
- Tampon de binding 3x concentré
- Tampon de binding complet 1x
- Tampon de lyse
- Tampon RE
- Tampon SA
- HB 2x
- BSA

## 9.2.Méthode

30 µl de tampon de binding spécifique des facteurs de transcription NF-kB et AP-1 sont déposées dans les puits adéquats dans lesquels sont fixées leurs séquences consensus. 20 µl de lysat dilué dans le tampon de lyse à une concentration de 5 µg/20 µl sont ensuite ajoutés avant d'incuber les plaques sur un agitateur pendant 1 h à température ambiante. Après 3 lavages avec 200 µl de PBS 50 contenant 0,1 % de tween, 100 µl d'anticorps primaire dilué 1000 fois sont placés dans les puits adéquats. L'anticorps reconnaissant NF-kB est un anti-p65 et est dilué dans du PBS 50 contenant 1 % de Gloria, celui reconnaissant AP-1 est un anti c-jun dilué dans du PBS contenant 1 % de BSA. Après 60 minutes d'incubation, les puits sont à nouveau lavés 3 fois et 100 µl du conjugué anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase dilué 1000 fois dans les diluants respectifs sont ajoutés. Après une incubation de 60 minutes et 4 lavages, 100 µl de TMB contenant le substrat de la peroxydase sont ajoutés dans chaque puits et les plaques sont placées à l'obscurité. Après une période de 10 minutes, une même quantité de solution stop est ajoutée. Finalement la plaque contenant les puits spécifiques à NF-kB est lue à une longueur d'onde de 405 nm et celle spécifique à AP-1 à 450 nm.

## 10. ELISA

Les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 200.000 cellules par puits. Après 24 heures de privation de sérum, les cellules sont mises en présence des différentes molécules. Les tests ELISA PGE<sub>2</sub> (R&D system KGE004B) et MCP-1 (R&D system DCP00) sont réalisés à partir du milieu de stimulation récolté après incubation. Les kits contiennent toutes les solutions nécessaires au dosage. Afin de normaliser la sécrétion de PGE<sub>2</sub> et MCP-1 par puits, la concentration mesurée en ces deux molécules (pg/ml) est divisée par la concentration totale en protéines (µg/ml) de chaque puits. La détermination de la concentration totale en protéines est réalisée par la méthode de Folin.

### 10.1. PGE<sub>2</sub>

Avant d'être déposés dans les micro-puits, les milieux de culture sont centrifugés 3 minutes à 13.000 rpm pour éliminer les éventuels débris cellulaires. Un standard PGE<sub>2</sub> est reconstitué avec de l'eau distillée et différentes concentrations sont réalisées. 150 µl de milieu de culture et des dilutions du standard sont placés dans les micro-puits. 200 µl du diluant utilisé pour réaliser les dilutions du standard sont placés dans un puits qui correspondra au puits NSB (*no specific binding*). Dans tous les puits, excepté le NSB 50 µl de l'anticorps primaire sont ajoutés. Après une heure d'incubation à température ambiante sur un agitateur, un même volume de l'anticorps secondaire est disposé dans tous les puits y compris le NSB. Après 2 heures d'incubation sur l'agitateur, tous les puits sont lavés 4 fois avec le tampon de lavage et 200 µl de la solution substrat sont ajoutés avant une incubation de 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Finalement, 100 µl de la solution stop sont disposés dans chaque puits et la plaque est lue à 450 nm avec une correction de 540 endéans

30 minutes. La concentration en PGE<sub>2</sub> secrétée est calculée à l'aide de la droite obtenue grâce aux différentes concentrations du standard.

## 10.2. MCP-1

Comme pour l'ELISA PGE<sub>2</sub>, les échantillons sont centrifugés 3 minutes à 13.000 rpm avant leur dosage. 200 µl des échantillons et des différentes dilutions du standard préalablement reconstitué sont disposés dans les puits du kit. Après une période d'incubation de 2 heures à température ambiante, les puits sont lavés 3 fois avec le tampon de lavage avant d'ajouter 200 µl de la solution de conjugué par puits. Les puits sont de nouveau lavés 3 fois après 1 heure d'incubation. 200 µl de la solution substrat sont disposés dans chaque puits et la plaque est incubée 20 minutes à température ambiante à l'obscurité. Finalement, 50 µl de solution stop sont ajoutés avant la lecture de la plaque à 450 nm avec une correction de 540 nm. La concentration en MCP-1 secrétée est calculée à l'aide de la droite obtenue grâce aux différentes concentrations du standard.

## 10.3. Méthode de Folin

La méthode de Folin, comme la méthode de Bradford, est une méthode d'analyse spectrométrique qui permet de déterminer la concentration en protéines. La solution de Folin constituée d'un mélange de divers acides se réduit en présence de protéines et adopte une coloration bleue.

### 10.3.1. Matériel

- Solution A (ml): NaCO<sub>3</sub> 2 % : 100, Tartrate : 1, CuSO<sub>4</sub> 1% : 1
- Folin (Merck Allemagne)
- H<sub>2</sub>O distillée
- NaOH 0,5 N et 1 N
- BSA 2 µg/µl (Sigma)
- Tubes à Bradford (Kartels, Italie)
- spectrophotomètre

### 10.3.2. Méthode

Après récolte des milieux de stimulation pour les tests ELISA, les cellules sont rincées avec du PBS avant d'être lysées avec du NaOH 0,5 N (200 µl/puits) pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, les lysats sont aliquotés et conservés à -20 °C. Pour le dosage, 150 µl de lysat cellulaire ou de NaOH 0,5 N (blancs) ou de BSA en concentrations connues sont déposés dans des tubes à Bradford. 750 µl de solution A sont ensuite ajoutés à intervalles réguliers. Après 5 minutes de réaction, 75 µl de Folin dilué deux fois sont ajoutés dans chaque tube en respectant le même intervalle de temps. Finalement, l'absorbance est lue à intervalles réguliers à 740 nm après 30 minutes.

## 11. Immunofluorescence

L'immunofluorescence permet de visualiser la localisation cellulaire d'une protéine d'intérêt. Cette technique se base sur la reconnaissance de cette protéine par un anticorps spécifique. La détection du complexe ainsi formé se réalise à l'aide d'un anticorps secondaire et qui reconnaît la partie constante de l'anticorps primaire. Après excitation par un laser du microscope confocal, celui-ci réémet une longueur d'onde qui permettra de visualiser la localisation cellulaire de la protéine d'intérêt.

### 11.1. Matériel

- Couvre-objets (VWR Belgique)
- PBS + 1 % BSA
- PBS + 4 % PFA
- PBS + 1 % triton X100
- Anticorps primaires et secondaires (Tableau II.8)
- To-Pro : dilué 80x dans RNase 2 mg/ml PBS (Molecular probe, USA)
- Mowiol (Sigma, Allemagne)
- Microscope confocal (Leica)

### 11.2. Méthode

Les cellules sontensemencées dans des boîtes 24 puits à raison de 10.000 cellules par puits où ont été préalablement déposés des couvre-objets. Après stimulation, les cellules sont rincées 3 fois au PBS avant d'être fixées avec du paraformaldéhyde 4 %. Suite à une incubation de 10 minutes, les cellules sont de nouveau rincées 3 fois au PBS avant d'être perméabilisées pendant 5 minutes à température ambiante au Triton 1 %. Ensuite, 3 rinçages sont réalisés avec du PBS-BSA 1 %. Pour l'incubation avec l'anticorps primaire, les couvre-objets sont enlevés des puits à l'aide d'une pince et retournés sur une goutte de 30 µl d'anticorps dilué 100 fois sur un parafilm. L'ensemble des couvre-objets est placé dans une chambre humide pendant 2 heures à température ambiante ou overnight à 4 °C. Une fois cette période écoulée, les couvre-objets sont replacés dans la boîte de culture et rincés 3 fois au PBS-BSA 1 %. L'incubation avec l'anticorps secondaire se déroule selon le même procédé que pour l'anticorps primaire, excepté que l'incubation ne dure qu'une heure et qu'elle a lieu dans l'obscurité pour préserver le fluorochrome. Après 4 rinçages, 3 au PBS-BSA 1 % et 1 au PBS seul, un marquage des noyaux au TO-PRO est réalisé : les couvre-objets sont incubés pendant 35 minutes avec du TO-PRO dilué 80 fois dans une solution de RNase et à nouveau placés en chambre humide et à l'obscurité. Pour finir, les couvre-objets sont rincés 3 fois au PBS avant d'être retournés sur une goutte de Mowiol préalablement préchauffé et déposé sur une lame porte-objet.

## 12. Mesure de l'expression de gènes par RT-PCR en temps réel

La PCR en temps réel permet de quantifier l'ADNc présent dans un échantillon donné. Cette technique se base sur la détection et la quantification d'un «reporter» fluorescent, le SYBR Green. Durant la phase de polymérisation de la réaction de PCR, un nombre croissant de molécules se lie au brin naissant et l'augmentation de la fluorescence est suivie en temps réel. L'augmentation du signal fluorescent est donc directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés. L'analyse de l'expression de gènes se déroule en plusieurs étapes. La première étape est d'extraire l'ARN des cellules. La seconde étape est la rétrotranscription qui permet la synthèse d'ADN complémentaire à partir de l'ARN précédemment extrait. La dernière étape est la PCR en temps réel.

### 12.1. Extraction d'ARN total

#### 12.1.1. Matériel

- TRI Reagent Solution (Applied Biosystems)
- Chloroforme RNase free
- Isopropanol RNase free
- Ethanol 75 % RNase free
- H<sub>2</sub>O RNase free
- Racloirs
- Centrifugeuse (4 °C)
- Spectrophotomètre

#### 12.1.2. Méthode

Les boîtes de culture T75 sont placées sur glace et le milieu de stimulation est décanté. Ensuite, 1 ml de TRI Reagent Solution est déposé par T75 et les cellules sont raclées avant d'être transférées dans des microtubes où elles sont laissées incuber 5 minutes à température ambiante. Après cette étape, il est possible de conserver les échantillons à -70 °C ou de continuer la procédure. Dans ce cas, 200 µl de chloroforme sont ajoutés dans chaque échantillon qui est ensuite agité vigoureusement pendant 15 secondes. Après une incubation de 5 à 15 minutes, les microtubes sont centrifugés 15 minutes à 12000 g à 4 °C et la phase supérieure est récupérée dans de nouveaux tubes. Un volume équivalent en isopropanol est ajouté et les tubes sont vortexés à faible vitesse avant d'être incubés 10 minutes à température ambiante. Après une centrifugation de 10 minutes, les surnageants sont décantés et les culots sont resuspendus dans 1 ml d'éthanol 75 %. Les surnageants sont à nouveau décantés après une centrifugation de 5 minutes à 7600 g. Les culots sont ensuite laissés sécher 10 à 15 minutes à température ambiante avant d'être resuspendus dans 100 µl d'eau RNase free 10 minutes à 55 °C. La quantité d'ARN de chaque échantillon est finalement déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre.

## 12.2.Rétro-transcription

### 12.2.1.Matériel

Kit transcriptor first strand cDNA synthesis (Roche) :

- Oligonucleotide (dT) primer
- Transcriptor reverse transcriptase reaction buffer
- Protector RNase inhibitor
- Deoxynucleotide mix
- Transcriptor reverse transcriptase

### 12.2.2. Méthode

Un volume déterminé contenant 1 µg d'ARN de chaque échantillon est porté à 12 µl avec de l'eau RNase free. A ce volume est ajouté 1 µl de primer oligo-T et le mélange est incubé 10 minutes à 65 °C. Un mix de 7 µl contenant des inhibiteurs d'RNase, des déoxy nucléotides, la transcriptase inverse et le tampon de l'enzyme (**Tableau II.9**) est ensuite ajouté dans chaque échantillon avant deux incubations consécutives, la première de 30 minutes à 55 °C et la suivante de 5 minutes à 85 °C. Les échantillons sont finalement refroidis sur glace avant d'être amplifiés.

## 12.3. PCR en temps réel

### 12.3.1.Matériel

- Amorces : forward et reverse de chaque gène (**Tableau II.10**)
- SYBR Green (Applied Biosystems, UK)
- H<sub>2</sub>O distillée
- Plaque 96 puits
- Appareil PCR Science I 7900 HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems)

### 12.3.2. Méthode

Pour chaque gène étudié ainsi que pour le house keeping gene, un mix réactionnel composé de 60 µl de chacune des amorces forward et reverse à une concentration final de 3 µM, de 60 µl d'eau distillée et de 300 µl de SYBR Green est préparé et disposé dans les puits adéquats (20 µl par puits). 5 µl d'ADN complémentaire dilué 100 fois dans de l'eau distillée sont ensuite déposés dans les puits. La plaque est finalement recouverte d'un film autocollant et centrifugée brièvement avant d'être placée dans la machine.

Une courbe d'amplification correspondant aux valeurs de fluorescence enregistrées au cours de chaque cycle est alors donnée. Plus il y a de template à amplifier, moins élevé sera le nombre de cycles requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera significativement plus élevée que le bruit de fond. La valeur du Ct est ensuite traduite en un résultat quantitatif, le fold d'induction en la comparant avec les valeurs du Ct obtenues par les house keeping gene :

- La moyenne des Ct est calculée pour chaque condition et chaque gène
- La moyenne des Ct obtenus pour le house keeping gene est soustraite à la moyenne obtenue pour les gènes d'intérêt (delta Ct)
- Le delta Ct de la condition contrôle est soustrait au delta Ct des autres conditions (delta delta Ct)
- Le fold d'induction de chaque condition est finalement obtenu après avoir effectué le calcul :  $2^{-\text{delta delta Ct}}$

## 13. Agrégation plaquettaire

### 13.1. Matériel

- Agrégomètre (Chronolog Corporation)
- Centrifugeuse
- Tubes pour agrégomètre
- Tubes en polypropylène citratés

### 13.2. Méthode

Après être récolté dans les tubes en polypropylène citratés, le sang d'un volontaire sain est centrifugé 10 minutes à 200 g. La fraction supérieure ainsi obtenue est transférée dans un autre tube et correspond au PRP (*Platelet-rich plasma*). Le reste de l'échantillon sanguin est à nouveau centrifugé à 2000 g pendant 10 minutes, et la fraction supérieure correspondant au PPP (*Platelet-poor plasma*) est prélevée. La concentration en plaquettes est déterminée selon la densité optique et est ajustée à  $3.10^5$  plaquettes/µl par l'ajout de PPP. Ce dernier est également utilisé comme référence pour l'agrégomètre. Le PRP est déposé dans des tubes sous agitation et les molécules étudiées sont ajoutées. Le PRP est incubé 2 minutes en présence du BM520 à différentes concentrations avant que l'acide arachidonique (600 µM) ou le U46619 (1 µM) ne soit ajouté. L'EC<sub>50</sub> du BM520, concentration réduisant de 50 % l'agrégation plaquettaire induite après stimulation au U46619 ou l'acide arachidonique, est déterminée par une régression non linéaire (GraphPad Prism software 2.01).

### III. Résultats

#### 1. Effets des agonistes du récepteur TP sur la mobilisation de calcium intracellulaire

La stimulation du récepteur TP par des agonistes provoque l'activation de la phospholipase C qui catalyse l'hydrolyse d'un phospholipide, le phosphoinositol 4,5-biphosphate en deux composés : le diacylglycérol et l'inositol triphosphate. Ce dernier, libéré de la membrane plasmique va se fixer sur son récepteur présent sur le réticulum endoplasmique et induire un efflux d'ions calcium dans le cytoplasme. Cette libération de calcium est visualisable à l'aide d'une sonde fluorescence, le Fura-2 AM composé d'un fluorochrome et d'un groupement chélateur de calcium.

La plupart des sondes fluorescentes pénètrent difficilement dans les cellules car celles-ci sont généralement des anions polycarboxylates. Ces sondes sont donc conditionnées sous forme acétoxyméthyl ester (AM) non ionisable et plus lipophile, ce qui facilite le passage de la membrane cytoplasmique et ainsi leur entrée dans les cellules. Une fois à l'intérieur de celles-ci, la sonde subit une hydrolyse par des estérases cytoplasmiques régénérant la fonction carboxylate. Sous cette forme, la sonde reste dans la cellule et est capable de se lier au calcium.

Suite à de nombreuses mises au point concernant l'optimisation de la densité cellulaire et de la concentration en sonde, un dosage de la libération de calcium dans le cytoplasme induit par les agonistes du récepteur TP a été développé.

Afin de vérifier l'activation du récepteur TP par ses agonistes, les HVSMC chargées en sonde ont été stimulées séparément par les deux agonistes du récepteur TP; et la fluorescence a été mesurée. L'ionomycine est utilisée comme contrôle positif. Cet ionophore augmente la perméabilité de la membrane plasmique en formant des pores dans celle-ci; ce qui permet au calcium présent dans le tampon dans lequel sont incubées les cellules d'entrer dans le cytoplasme et de se lier à la sonde. L'utilisation de l'ionomycine permet donc de valider la méthode de travail.

Les agonistes ont été testés à différentes concentrations allant de  $10^{-4}$  à  $10^{-7}$  molaire. Une augmentation du ratio normalisé de fluorescence est observée quand les cellules sont stimulées par le U46619 (**Figure III.1.A**); ce qui indique que cet agoniste induit bien une libération du calcium dans le cytoplasme des HVSMC et que, par conséquent cet agoniste active bien le récepteur TP. De plus, l'activation de ce récepteur est fonction de la concentration en agoniste. Le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> est lui aussi capable d'induire une libération de calcium dans le cytoplasme des HVSMC et ce, de façon dépendante de la concentration (**Figure III.1.B**). Cependant, cette libération est moindre que celle induite par le U46619. Cette observation indique que le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> active le récepteur TP mais que celui-ci a plus d'affinité pour le U46619.

## 2. Effet du U46619 sur le recrutement et l'activation des isoformes de la PKC

Le second composé issu de l'hydrolyse du phosphoinositol 4,5-biphosphate par la phospholipase C est le diacylglycérol. Celui-ci toujours ancré en membrane plasmique induit le recrutement des PKC et par la suite, leur activation. Une fois activées, les PKC transloquent dans le noyau où elles sont responsables de l'activation de facteurs de transcription.

Afin de déterminer si le U46619 induit dans un premier temps le recrutement des PKC à la membrane plasmique et dans un deuxième temps leur translocation dans le noyau, une immunofluorescence marquant deux isoformes de PKC, la PKC $\alpha$  et la PKC $\delta$  a été réalisée.

Le contrôle positif correspond à la stimulation des HVSMC par le PMA. Celui-ci induit le recrutement de la PKC $\alpha$  en membrane nucléaire et plasmique (**Figure III.2.A**). A des temps de stimulation courts, 15 et 30 minutes, aucun recrutement de l'isoforme  $\alpha$  en membrane plasmique ne semble induit par le U46619. A des temps de stimulation plus longs (1, 4 et 24 heures), aucun recrutement en membrane plasmique ou nucléaire n'est observé. Des résultats similaires sont observés pour l'isoforme  $\delta$  (**Figure III.2.B**). D'autres concentrations plus élevées en U46619 ont également été testées (résultats non montrés) mais les résultats obtenus sont identiques aux précédents.

## 3. Effets du U46619 et des antagonistes du récepteur TP seuls ou en combinaison avec l'IL1 $\beta$ sur la libération de PGE $_2$

Les PKC activées sont capables à leur tour d'activer divers effecteurs, dont la phospholipase A $_2$ . Celle-ci, une fois activée, catalyse la libération d'acide arachidonique de la membrane plasmique qui est ensuite transformé par les cyclo-oxygénases et diverses enzymes en un panel de composés, dont la prostaglandine E $_2$ .

Afin de doser la libération de prostaglandine E $_2$  par les HVSMC induite par le U46619, la concentration de cette molécule a été mesurée dans les milieux au moyen d'un test ELISA. Le dosage n'a pas pu être réalisé pour le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  en raison d'un manque de spécificité du kit, qui montre une réaction croisée entre le 8-iso-PGF $_{2\alpha}$  et l'anticorps anti-PGE $_2$ .

Le U46619, à une concentration de 1  $\mu$ M, n'est pas capable d'induire une libération de prostaglandine E $_2$  (**Figure III.3.A**). A une concentration cinq fois plus élevée, la libération de cette molécule est légèrement augmentée. Par contre à une concentration de 10  $\mu$ M, une concentration nettement plus élevée de prostaglandine E $_2$  est observée. La cytokine IL-1 $\beta$  induit une sécrétion très importante de prostaglandine E $_2$ . Combinée au U46619, à des concentrations inférieures ou égales à 1  $\mu$ M, l'induction augmente et ce, de manière dépendante de la concentration (**Figure III.3.B**) alors que le U46619 seul, à ces concentrations, n'a pas d'effet. Lorsque les cellules sont pré-incubées avec les antagonistes, l'effet induit par U46619 combiné à l'IL-1 $\beta$  est inhibé et la concentration en prostaglandine

est réduite au niveau de celle induite par la cytokine pro-inflammatoire utilisée seule (**Figure III.3.C**). Les résultats montrent que l'effet synergique du U46619 sur l'induction de la sécrétion de prostaglandine E<sub>2</sub> par l'IL-1 $\beta$  est bien due à une action de cet agoniste sur le récepteur TP.

#### **4. Effets des agonistes du récepteur TP sur l'activation des voies des MAPK**

Les autres effecteurs activés par les PKC sont des intermédiaires des voies des MAP kinases. Afin de vérifier l'activation de l'une de ces voies par des agonistes du récepteur TP, des extraits protéiques ont été réalisés à partir des HVSMC stimulées 15 ou 30 minutes avec les agonistes étudiés et pré-incubées ou non avec les antagonistes étudiés du récepteur TP. Après électrophorèse et transfert sur membrane, la forme phosphorylée des protéines ERK p42/p44 a été révélée à l'aide d'anticorps spécifiques.

Les HVSMC expriment les protéines ERK p42/p44 (**Figure III.4.A.1**). Les cellules ont été stimulées 15 ou 30 minutes avec les agonistes et précédées d'une incubation d'une heure avec les antagonistes du récepteur TP. Après 15 et 30 minutes de stimulation avec le U46619, les protéines ERK p42/p44 sont phosphorylées (**Figure III.4.A.2**). Le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  induit également la phosphorylation de ces protéines. La pré-incubation avec les antagonistes du récepteur TP ne permet pas d'inhiber la phosphorylation de ces MAP Kinases.

La phosphorylation d'autres intermédiaires des voies des MAP Kinases, comme JNK, p38 et son substrat Hsp27 a également été analysée. Après 15 ou 30 minutes de stimulation, les agonistes du récepteur TP étudiés ne permettent pas d'induire la phosphorylation de ces protéines (résultats non montrés).

#### **5. Effets des agonistes et des antagonistes du récepteur TP sur la prolifération cellulaire**

L'effet des agonistes du récepteur TP sur l'induction de la prolifération des HVSMC a ensuite été examiné en raison de l'activation des protéines p42/p44 que nous avons observée. Afin de déterminer l'effet des agonistes sur la prolifération cellulaire, des HVSMC quiescentes ont été incubées pendant deux ou quatre jours en présence de ces molécules. Le milieu de stimulation a été renouvelé au jour 2. Au bout de quatre jours de stimulation, le nombre de cellules vivantes est déterminé par un test MTT. Les cellules incorporent cette molécule et la métabolisent en formazan formant des cristaux violets. Une corrélation entre la quantité de MTT modifié libéré après lyse des cellules et le nombre de cellules vivantes peut ainsi être faite.

Le pourcentage de sérum du milieu de culture a dû être optimisé afin d'obtenir une prolifération minimale des cellules qui permettra de visualiser les effets pro-prolifératifs éventuels des agonistes du récepteur TP. Pour ce faire, les HVSMC ont été cultivées pendant deux ou quatre jours dans des milieux contenant différents pourcentages de sérum (**Figure**

**III.5.A).** Plus il y a de sérum, plus les cellules prolifèrent. Le pourcentage de 0,5 a été choisi pour les tests ultérieurs car il n'induit qu'une faible prolifération des cellules en comparaison aux cellules privées de sérum.

Les cellules ont donc été cultivées dans le milieu de culture contenant 0,5 % de sérum en présence ou absence des modulateurs du récepteur TP. Après deux jours, aucune conclusion ne peut être tirée (résultats non montrés). Par contre après quatre jours, le U46619 induit une prolifération des cellules mais le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> n'a pas d'effet (**Figure III.5.B**). La pré-incubation avec les antagonistes permet de supprimer l'effet induit par le U46619. Par ailleurs, les antagonistes seuls n'influencent aucunement la prolifération des cellules. L'effet prolifératif du U46619 passe donc bien par une activation du récepteur TP.

Ensuite, l'effet de différents inhibiteurs sur la prolifération induite par le U46619 a été étudié. La pré-incubation avec la calphostine C, un inhibiteur général de toutes les isoformes de PKC, permet de réduire fortement la prolifération induite par l'analogue du thromboxane, le U46619 (**Figure III.5.C**). Afin de déterminer plus précisément quelles isoformes sont impliquées, deux inhibiteurs spécifiques de différentes isoformes ont été testés. Le Go6976 inhibe les isoformes alpha (α), bêta (β), gamma (γ) et zêta (ξ). La pré-incubation des cellules avec cet inhibiteur ne permet pas de diminuer l'effet prolifératif de l'agoniste, mais contre toute attente l'accroît. Le deuxième inhibiteur testé est le HBDDE qui est responsable de l'inactivation des isoformes alpha et gamma. Même si cette molécule inhibe des isoformes commune avec le Go6976, elle permet de réduire le taux de prolifération des cellules (**Figure III.5.C**). L'effet du HBDDE a une efficacité équivalente à celle de la calphostine C; ce qui indique que la prolifération induite par le U46619 est dépendante des isoforme alpha et/ou gamma voire des deux.

Finalement, le rôle du calcium dans la prolifération cellulaire a été investigué. Afin de déterminer si ces ions jouent un rôle dans la prolifération induite par le U46619, les cellules ont été incubées en présence d'un chélateur de calcium, le BAPTA-AM. Celui-ci s'est révélé être toxique, c'est pourquoi différentes concentrations ont été testées. Des concentrations supérieures à 5 μM sont toxiques pour les cellules. Par contre à 5 et 1 μM, cette molécule n'induit aucune toxicité (**Figure III.5.D**). La chélation du calcium intracellulaire par le BAPTA-AM n'influence pas la prolifération cellulaire induite par l'agoniste du récepteur TP.

## **6. Effets des agonistes du récepteur TP sur la liaison de facteurs de transcription à leur séquence consensus**

L'activation des PKC permet de réguler l'expression de gènes. Celle-ci implique la liaison de facteurs de transcription spécifiques à leur séquence consensus. NF-κB étant le facteur de transcription plus souvent associé à l'inflammation, c'est-à-dire en aval de l'activation des cellules par des cytokines comme l'IL-1β et AP-1 étant le facteur de transcription le plus souvent associé aux PKC, leur activité de liaison à leur séquence spécifique a donc été mesurée.

L'activité du facteur de transcription AP-1 ne semble pas être augmentée par les agonistes du récepteur TP (**Figure III.6.A**). Par contre, pour le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, on observe que le U46619 augmente l'activité de liaison à l'ADN de ce facteur (**Figure III.6.B**). En revanche, le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ne semble pas influencer la liaison de NF- $\kappa$ B à sa séquence consensus.

## **7. Effets des agonistes du récepteur TP seuls ou en combinaison avec l'IL1 $\beta$ sur l'abondance d'ARNm de gènes pro-inflammatoires**

Comme le U46619 augmente l'activité de liaison à l'ADN du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, le niveau d'expression d'ARNm de divers gènes impliqués dans l'inflammation a ensuite été examiné. Cette analyse a été réalisée par RT-PCR en temps réel dans deux expériences indépendantes. Les profils d'expression de chaque gène dans les deux expériences sont similaires.

Tout d'abord, le niveau d'expression d'ARNm des protéines MCP-1 et IL-8, deux chemokines, a été analysé. Le U46619 augmente le niveau d'expression des ARNm codant pour ces deux chemokines de 5 et près de 8 fois, respectivement. Par contre, le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  n'augmente que de 2 fois le niveau d'expression de l'ARNm de MCP-1 et n'influence pas celui de IL-8 (**Figures III.7. A.1 et B.1**). Une forte induction est observée lorsque les cellules ont été stimulées avec l'IL-1 $\beta$  et celle-ci est davantage élevée lorsque l'IL-1 $\beta$  est combinée aux agonistes du récepteur TP. Cependant, l'induction est plus forte lorsque l'IL-1 $\beta$  est combinée au 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  qu'au U46619 (**Figures III.7. A.2 et B.2**). La pré-incubation avec les antagonistes du récepteur TP empêche l'effet des agonistes; le niveau d'expression des deux gènes retombe alors au niveau induit par l'IL-1 $\beta$  seul.

Le niveau d'expression de l'ARNm de l'interleukine-6 (IL-6) et de la cyclooxygénase-2 (COX-2) a également été étudié. Le profil d'expression de ces deux gènes est similaire. Le U46619 augmente l'expression de ces gènes de 36 et 21 fois respectivement. Le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  induit aussi une augmentation de l'expression de ces gènes mais de façon moindre que le U46619 (**Figures III.8. A1 et B.1**). L'IL-1 $\beta$  induit une forte augmentation de l'expression de IL-6, dix fois supérieure à celle de COX-2. La combinaison de IL-1 $\beta$  avec les agonistes du récepteur TP augmente davantage cette induction. Le U46619 combiné à l'interleukine induit de façon plus importante l'expression de ces gènes que le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  combiné à cette dernière. L'effet du U46619 combiné à l'IL-1 $\beta$  est plus qu'additif, il est synergique (**Figures III.8. A2 et B.2**). La pré-incubation avec les antagonistes du récepteur TP permet de réduire le niveau d'expression de l'IL-6 et de la COX-2 au niveau d'expression induit par l'IL-1 $\beta$ . Cependant pour l'IL-6, l'effet du 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ne semble être inhibé que partiellement.

Finalement, l'analyse du niveau d'expression de l'ARNm des deux molécules d'adhérence, VCAM-1 et ICAM-1 a été réalisée. Le U46619 provoque une augmentation de l'expression de ces gènes de 15 et 144 fois respectivement. Le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ne semble pas influencer l'expression de VCAM-1 mais augmente l'expression de ICAM-1 de 4 fois

(Figures III.9. A1 et B1). La stimulation à l'IL-1 $\beta$  provoque une forte augmentation de l'expression de ces deux gènes. Les deux agonistes en combinaison avec l'IL-1 $\beta$  ne semblent pas avoir d'effet additif sur l'expression d'ICAM-1 (Figure III.9.B2). Par contre, l'U46619 induit une diminution de l'expression de l'ARNm de VCAM-1 : 867 fois comparé à 2826 fois pour l'IL-1 $\beta$  (Figures III.9.A2). Le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  induit également une diminution de l'expression de VCAM-1 mais de façon moindre que celle induite par le U46619. La pré-incubation avec les antagonistes du récepteur TP ne modifie pas l'effet des agonistes et ne permet pas de retrouver un niveau d'expression similaire à celui induit par l'IL-1 $\beta$ .

En résumé, cette analyse du niveau d'expression des gènes pro-inflammatoires indique que le U46619 augmente l'expression des gènes codant pour MCP-1, IL-8, IL-6, COX-2, VCAM-1 et ICAM-1. Le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  n'influence que l'expression de trois des ces gènes : MCP-1, IL-6 et COX-2. De manière générale, combinés à l'IL-1 $\beta$ , les deux agonistes du récepteur TP ont un effet additif voire synergique excepté pour les gènes codant pour les deux molécules d'adhérence. Les antagonistes du récepteur TP inhibent l'effet du U46619 et partiellement celui du 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .

## 8. Effets des agonistes seuls ou en combinaison avec l'IL1 $\beta$ sur la sécrétion de MCP-1

Comme les agonistes du récepteur TP induisent une augmentation du taux d'expression de l'ARNm de MCP-1, la sécrétion de cette protéine a été mesurée afin de confirmer si cette induction se produit également au niveau protéique. Le dosage de MCP-1 est réalisé à partir du milieu de culture récolté après stimulation à l'aide d'un kit ELISA.

Le U46619 induit une augmentation de la sécrétion de MCP-1 par les HVSMC (Figure III.10.A). La pré-incubation avec les deux antagonistes du récepteur TP diminue significativement la production de MCP-1 induite par le U46619. Le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  augmente également la sécrétion de cette protéine mais de façon moins importante que le U46619. La pré-incubation avec le SQ29548 ou le BM520 permet également de réduire la sécrétion de MCP-1 induite par le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> .

L'IL-1 $\beta$  induit une forte production de MCP-1 (Figure III.10.B). Cette induction est plus élevée que celle induite par les agonistes du récepteur TP. Combiné à l'IL-1 $\beta$ , le U46619 semble augmenter davantage la sécrétion de la protéine. Par contre le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  combiné à la cytokine pro-inflammatoire semble ne pas avoir d'effet additif. La pré-incubation avec les antagonistes du récepteur permet de réduire de manière partielle la sécrétion de MCP-1.

La comparaison entre le niveau d'expression et la sécrétion de MCP-1 révèle une similitude et une différence. La sécrétion de cette protéine est augmentée par les agonistes du récepteur TP et ce, de manière plus importante par le U46619, comme au niveau de l'ARN messager. Par contre, le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  combiné à l'IL-1 $\beta$  n'a pas d'effet additif sur la sécrétion de cette chemokine alors qu'au niveau de l'expression du gène, cet effet est présent.

## 9. Effets du U46619 et du BM520 sur l'agrégation plaquettaire

La rupture de la plaque athéromateuse provoque l'exposition des composants lipidiques de celle-ci au sang, initiant la coagulation, l'agrégation plaquettaire et la formation du thrombus qui sera responsable de l'apparition des symptômes.

Afin de déterminer l'effet du U46619 sur l'agrégation des plaquettes, une expérience a été réalisée sur du PRP (platelet-rich plasma) prélevé chez un individu sain. Le PRP a été pré-incubé avec différentes concentrations connues en BM520 pendant 2 minutes avant que l'acide arachidonique (600  $\mu\text{M}$ ) ou le U46619 (1 $\mu\text{M}$ ) ne soit ajouté. L'acide arachidonique pénètre dans la plaquette et est métabolisé en TXA<sub>2</sub> qui stimule de manière autocrine les récepteurs TP plaquettaires induisant l'agrégation. Il est utilisé comme inducteur endogène de production de TXA<sub>2</sub>.

Le U46619 et l'acide arachidonique induisent l'agrégation des plaquettes et celle-ci est inhibée par le BM520 (**Figure III.11.A. et B.**). Cette inhibition est dépendante de la concentration en antagoniste. La concentration à laquelle 50 % de l'agrégation plaquettaire est prévenue par le BM520 (EC<sub>50</sub>) a été déterminée, elle est de 1,7 et de 0,8  $\mu\text{M}$  en présence de l'acide arachidonique et du U46619, respectivement.

## IV. Discussion, perspectives et conclusions

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique des artères de moyen et gros calibres. A l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose est de loin la première cause de mortalité au niveau mondial. Cette maladie est influencée par un grand nombre de médiateurs biochimiques, des cytokines, des facteurs de croissance, et également par les dérivés de l'acide arachidonique issus des voies enzymatiques, tels que le thromboxane et des voies non enzymatiques, les isoprostanes. La production de ces deux médiateurs est anormalement élevée dans les plaques athéromateuses ainsi que dans le sang de patients atteints de cette maladie. Ces dérivés lipidiques, en agissant via le récepteur TP, favorisent la progression de l'athérosclérose en modulant la réponse inflammatoire, la prolifération des cellules musculaires lisses et l'activation des plaquettes. Une étude montre que les souris présentant un double knockout apoE<sup>-/-</sup>TP<sup>-/-</sup> développent des lésions significativement plus petites que celles des souris apoE<sup>-/-</sup>; confirmant l'implication du récepteur TP dans l'athérosclérose [40]. Différentes cibles ont été identifiées afin de réduire la biosynthèse et/ou l'action de ces médiateurs. Comme l'inhibition de la synthèse du thromboxane et des isoprostanes paraît difficile par un traitement unique, un intérêt particulier envers l'inhibition des effets de ces médiateurs par antagonisme du récepteur TP s'est développé. Cyrus et ses collaborateurs ont testé l'effet du BM573 sur le développement et la progression de l'athérosclérose chez des souris déficientes pour le récepteur aux LDL [47] et ont conclu que l'antagoniste du récepteur TP réduit de façon significative la progression des lésions athéromateuses et affecte également la composition de la plaque renforçant la stabilité de celle-ci. Le récepteur TP est exprimé par différents types cellulaires de la plaque athéromateuse. Zhuge et ses collaborateurs ont examiné le rôle du récepteur TP des cellules dérivées de la moelle dans le développement des lésions athéromateuses [48]. Ils en ont conclu que la diminution de taille des lésions athéromateuses chez les souris TP<sup>-/-</sup> n'est pas due à l'absence du récepteur TP sur les cellules dérivées de la moelle tels que les macrophages et les plaquettes mais à d'autres types cellulaires exprimant le récepteur TP. L'effet des agonistes du récepteur TP sur les cellules endothéliales a déjà été largement étudié. Ceux-ci ont pour principaux effets d'augmenter l'expression de molécules d'adhérence et ainsi l'adhérence de leucocytes et leur infiltration dans l'intima [49]. Par contre, peu de chose sont connues à propos de leurs effets sur les cellules musculaires lisses des artères touchées. Un certain nombre de publications traite de ce sujet mais ces travaux ont été réalisés sur des cellules animales ; ce qui est moins relevant du cadre de pathologie d'origine humain.

L'objectif principal de ce mémoire était donc d'étudier l'effet de deux agonistes du récepteur TP ; le U46619, un analogue du thromboxane, et l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sur différents paramètres impliqués dans le développement de l'athérosclérose, tels que la prolifération cellulaire et l'expression de gènes pro-inflammatoires, sur des cellules musculaires lisses d'artère humaine (HVSMC). Afin de mimer le contexte inflammatoire qui règne dans la plaque athéromateuse, ces deux agonistes du récepteur TP ont également été utilisés en combinaison avec la cytokine pro-inflammatoire IL-1β. L'étude des effets de deux

antagonistes, le SQ29548 et le BM520, sur l'inactivation du récepteur TP a également été menée en parallèle dans ce mémoire.

Des résultats précédents du laboratoire non publiés ont confirmé l'expression du récepteur TP par les cellules musculaires lisses d'aorte humaine par PCR en temps réel (mémoire de Christophe Copine, 2009). De plus, l'expression protéique du récepteur a été évaluée par western blot et comparée à celle de cellules endothéliales. Cette étude démontre que l'abondance du récepteur TP chez les cellules musculaires lisses est constitutivement plus élevée que dans les cellules endothéliales EAhy926. De plus, l'expression de l'isoforme  $\alpha$  du récepteur est supérieure à celle de l'isoforme  $\beta$  [31].

Afin de vérifier la fonctionnalité du récepteur TP sur les HVSMC, l'accumulation cytoplasmique de calcium a été mesurée à l'aide d'une sonde fluorescente après stimulation avec les deux agonistes du récepteur TP. Le U46619 et le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  induisent une augmentation de la fluorescence et donc, une libération de calcium. Ces agonistes sont donc capables d'activer le récepteur TP. Cependant, l'activation du récepteur est plus faible quand les cellules sont stimulées avec le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Cette différence peut s'expliquer par le fait que le récepteur TP a une plus grande affinité pour le U46619 que pour le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Cette observation a déjà été décrite antérieurement dans d'autres travaux [50-51]. En effet, le U46619 est une molécule synthétique dont la structure a été optimisée pour se lier spécifiquement au récepteur TP, alors que le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  est un agoniste non conventionnel de ce récepteur. Une autre explication peut être la présence d'un récepteur spécifique aux isoprostanes en membrane des HVSMC, cette hypothèse a déjà été émise par Fukunaga et ses collaborateurs [38]. La structure de ce récepteur serait proche de celle du récepteur TP mais son activation ne serait pas liée à une libération de calcium cytoplasmique. Ainsi, le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  ayant une plus grande affinité pour son récepteur propre, n'activerait que faiblement le récepteur TP.

L'activation du récepteur TP se caractérise également par le recrutement des PKC en membrane plasmique. Il existe 10 isoformes de PKC regroupées en trois classes d'après leur structure primaire et leur propriété biochimique. Les PKC conventionnelles (PKCc) rassemblent les isoformes  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$ . Leur activation par les phospholipides est dépendante du calcium. Les PKC nouvelles (PKCn) regroupent les isoformes  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  et  $\theta$ . Contrairement aux PKCc, leur activation ne dépend pas de la présence de calcium. La dernière classe des PKC est la classe des atypiques (PKCa) regroupant les isoformes  $\xi$  et  $\lambda$ . Ces isoformes sont insensibles au calcium et ne requièrent pas le diacylglycérol pour leur activation. Il existe également une isoforme  $\mu$  qui fait sujet de débat concernant sa classification. Les HVSMC expriment huit isoformes de PKC :  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\xi$ ,  $\lambda$  et  $\mu$  [52]. L'activation du récepteur TP devrait dans un premier temps induire le recrutement des PKC en membrane plasmique et leur activation par le diacylglycérol, et dans un second temps leur translocation dans le noyau. Dans ce mémoire, le recrutement en membrane plasmique et la translocation nucléaire des deux isoformes, les isoformes  $\alpha$  et  $\delta$ , ont été analysés par immunofluorescence. A des temps d'incubation court (15 minutes) ou long (24 heures) et à des concentrations allant de 1  $\mu$ M à 10  $\mu$ M en U46619, aucun recrutement ou translocation en membrane plasmique ou nucléaire

n'a été observé. Le 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, étant un agoniste plus faible, n'a pas été testé. Ces études devraient être poursuivies en suivant l'abondance, par western blot, de ces deux isoformes dans des fractions subcellulaires purifiées par centrifugation différentielle. Un kinase assay pourrait également être réalisé pour mesurer l'activité PKC dans les extraits cellulaires.

Certains effecteurs des PKC sont des intermédiaires des voies MAPK. Nous avons donc voulu vérifier si ces MAP Kinases étaient activées lorsque les HVSMC sont incubées en présence des agonistes du récepteur TP. Nous avons montré que seules les protéines ERK p42/p44 sont activées par les agonistes du récepteur TP et la pré-incubation avec les antagonistes ne permet d'inhiber cette activation. Les protéines JNK et p38 ne présentent aucune phosphorylation.

Etant donné l'activation des protéines ERK p42/p44, nous nous sommes intéressés à l'effet pro-prolifératif potentiel des agonistes du récepteur TP. La croissance et la migration des cellules musculaires lisses de la média est une étape clef dans la progression des lésions athéromateuses. Dans ce mémoire, nous avons démontré que le U46619 induit une augmentation de la prolifération des HVSMC. Cette observation est en accord avec plusieurs publications [53-55]. L'inhibition de la prolifération induite par cette molécule par les antagonistes du récepteur TP confirme que l'effet pro-prolifératif du U46619 passe via le récepteur TP. De plus, cette augmentation de prolifération semble indépendante de la libération de calcium. En effet, la pré-incubation avec le BAPTA-AM, un chélateur de calcium n'a aucune influence sur l'effet pro-prolifératif de l'agoniste. Cette observation est en contradiction avec plusieurs publications [56-58]. Le calcium libéré par stimulation du récepteur TP se complexe dans le cytoplasme avec la calmoduline, formant un complexe actif. Ce complexe est capable d'activer des kinases CaM (kinases calcium/calmoduline dépendante) impliquées dans l'activation d'intermédiaires des voies des MAPK et des facteurs de transcription responsables de la prolifération cellulaire. Une explication au fait que le BAPTA-AM n'influence pas la prolifération des HVSMC induite par le U46619, serait que la calmoduline ait une plus grande affinité pour le calcium que ce chélateur. Ainsi l'effet pro-prolifératif du U46619 ne serait pas inhibé. Une autre explication serait que la concentration utilisée ne serait pas assez élevées pour inhiber l'effet du U46619. Nous n'avons cependant pas pu l'augmenter car le BAPTA-AM induit alors une toxicité pour les cellules (résultats non montrés). Bien que l'augmentation de prolifération des HVSMC induite par le U46619 n'a pas été influencée par le BAPTA-AM, celle-ci est dépendante des PKC, puisque une pré-incubation avec la calphostine inhibe l'effet pro-prolifératif du U46619. Plus précisément, les isoformes de PKC impliquées semblent être les isoformes alpha et/ou gamma. En effet, le HBDDE inhibant les isoformes alpha et gamma engendre une inhibition semblable à celle obtenu en présence de calphostine. Cependant, d'après Itoh et al. [52], les HVSMC n'expriment pas l'isoforme gamma. L'effet pro-prolifératif du U46619 dépendrait donc uniquement de l'isoforme alpha. Cependant, le Go6976, inhibant certaines isoformes dont l'isoforme alpha, n'inhibe pas l'effet du U46619. Paradoxalement, cet inhibiteur amplifie l'effet pro-prolifératif de l'agoniste. Ce résultat pourrait être dû à un effet non spécifique de cette molécule.

Contrairement au U46619, le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> n'influence pas la prolifération des HVSMC, même si celui-ci permet l'activation des protéines ERK p42/p44. D'autres publications ont également démontré la capacité de cet isoprostane à phosphoryler ces MAPK [59]. Il serait donc intéressant de tester des concentrations supérieures.

L'athérosclérose étant une maladie caractérisée par une inflammation chronique, les effets du U46619 et du 8-iso-PGF<sub>2α</sub> sur l'expression de gènes impliqués dans ce processus ont été analysés. Nous avons démontré que le U46619 augmentait le niveau d'expression d'ARN messager des gènes MCP-1, IL-8, IL-6, COX-2, VCAM-1 et ICAM-1 avec des niveaux d'induction allant de 5 à 35 fois. Le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> n'influence que l'expression de trois des ces gènes : MCP-1, IL-6 et COX-2 avec des niveaux d'induction inférieurs à ceux du U46619, allant de 2 à 4 fois.

Etant donné l'augmentation d'expression de l'ARN messager du gène MCP-1 par les agonistes du récepteur TP, nous avons vérifié si cela se transposait en une sécrétion accrue de cette protéine. Nous avons observé que le U46619 augmente de façon importante la sécrétion de MCP-1. Le 8-iso-PGF<sub>2α</sub> est également capable d'augmenter la sécrétion de cette protéine mais de façon moins importante que le U46619. MCP-1 est une protéine chémoattractante jouant un rôle important dans le recrutement et la migration de monocytes aux sites de lésions et est ainsi considérée comme un facteur déterminant dans la progression de l'athérosclérose. La sécrétion MCP-1 est souvent associée aux étapes initiales de la formation de la plaque. En effet, certains phospholipides oxydés issus des LDL [60] ou le *shear stress* [61] induisent l'expression de cette protéine par les cellules endothéliales. Cependant, les macrophages et les cellules musculaires lisses de la plaque athéromateuse sont également capables d'exprimer et de sécréter la protéine MCP-1 [62]. L'expression de MCP-1 par ces deux types cellulaires résulte en un flux continu de monocytes dans la plaque athéromateuse. Une étude dans laquelle des cellules dérivées de moelle surexprimant MCP-1 ont été transplantées chez des souris apoE<sup>-/-</sup>, démontre que la surexpression de MCP-1 accélère la progression des lésions athéromateuses en augmentant le nombre de macrophages dans la lésion [63]. Le dosage de protéines libérées dans le milieu de culture aurait pu également être réalisé pour les interleukines IL-8 et IL-6. L'IL-8 est, comme MCP-1, une protéine chémoattractante mais d'une autre classe comportant les chemokines CXC. Peu d'importance est accordée à l'implication de ces protéines dans l'athérosclérose vu leur spécificité pour les neutrophiles. Cependant, il a été démontré que l'IL-8 pouvait agir comme chémoattractant pour les lymphocytes T [64]. L'IL-8 est également un facteur angiogénique [65] et est capable d'induire la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses [66]. L'IL-8 dont l'expression est augmentée par les agonistes du récepteur TP pourrait donc influencer le développement de l'athérosclérose en recrutant les lymphocytes T au site de lésion, ce qui accentuerait l'inflammation locale par interaction avec les macrophages infiltrés, en induisant la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses, et en induisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ce qui augmenterait davantage le recrutement de leucocytes et altérerait la stabilité de la plaque athéromateuse. Finalement, l'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle régulant divers aspects de la réponse immune. Une étude réalisée sur des

souris ApoE<sup>-/-</sup> dans lesquelles le gène codant pour l'IL-6 est mono- ou double-déficient démontre que ces souris présentent une tendance de réduction de la formation des stries lipidiques par rapport aux souris ApoE<sup>-/-</sup> [67]. Schieffer et ses collaborateurs ont également démontré la réduction du recrutement des cellules inflammatoires aux sites de lésions athéromateuses chez les souris ApoE<sup>-/-</sup> IL-6<sup>-/-</sup> [68]. Ces observations démontrent l'implication de l'IL-6 dans le développement des lésions athéromateuses. La stimulation du récepteur TP provoquant l'augmentation de l'expression de son gène, favorise ce processus.

Afin de mimer le contexte inflammatoire régnant dans la plaque athéromateuse, l'effet de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  seule ou en combinaison avec les agonistes du récepteur TP sur l'expression des gènes a été étudié. L'IL-1 $\beta$  semble jouer un rôle déterminant dans le développement de l'athérosclérose, puisque des souris knockout pour son gène présentent une diminution de la taille des lésions d'environ 30 % [18]. Une importante augmentation de l'expression de chaque gène étudié est observée quand les cellules ont été stimulées à l'IL-1 $\beta$ . Pour les gènes IL-8, IL-6 et COX-2, la combinaison du U46619 à l'IL-1 $\beta$  augmente davantage cette induction. Par contre, pour le gène MCP-1, aucun effet additif n'est observé. La pré-incubation avec les antagonistes SQ29548 et BM520 permet d'inhiber l'effet du U46619 et de restaurer le niveau d'induction de l'IL-1 $\beta$  seule. Nous avons également démontré que l'IL-1 $\beta$  augmente davantage la sécrétion de MCP-1 confirmant l'implication de l'inflammation régnant dans la plaque dans la progression de l'athérosclérose. Ainsi les agonistes du récepteur TP favorisent le développement de l'athérosclérose en augmentant le recrutement de monocytes, ce qui accentuera la réaction inflammatoire et fragilisera la plaque athéromateuse. La protéine MCP-1 favoriserait également la prolifération des cellules musculaires lisses [69] contribuant à la formation de cellules spumeuses et du corps nécrotique mais également à la formation d'une chape fibreuse. Le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  augmente également le niveau d'induction de la cytokine pro-inflammatoire mais dans une moindre mesure que le U46619, excepté pour les gènes IL-8 et MCP-1. La pré-incubation avec les antagonistes du récepteur TP permet d'inhiber l'effet du 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  sur l'expression de l'IL-8 de manière complète et sur l'expression de MCP-1 et de COX-2 de manière partielle. Par contre, les antagonistes ne permettent pas d'atténuer le niveau d'expression de l'IL-6 induit par le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> . Le fait que l'inhibition par inactivation du récepteur TP ne se fasse que de manière partielle ou n'ait pas lieu, suggère à nouveau que le 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  pourrait également agir par un autre récepteur qui lui serait spécifique, comme nous l'avons déjà mentionné précédemment. En observant des faits similaires, Fukunaga avait déjà émis cette hypothèse [38].

Une publication récente démontre que l'activation du récepteur TP par le U46619 accentue l'expression de VCAM-1 induite par l'IL-1 $\beta$  sur cellules musculaires lisses de rat et humaines [70]. De plus, cette étude démontre que le U46619 induit l'activation de JNK résultant en la phosphorylation et la translocation nucléaire de c-jun favorisant l'activation du facteur de transcription AP-1. Cependant dans notre étude, le U46619 seul ne semble pas avoir d'effet sur l'expression de VCAM-1. Les auteurs de cet article associent cette observation au fait que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B n'est pas activé par l'agoniste du

récepteur TP. Contrairement à cette publication, nous avons démontré que le U46619 seul avait un effet sur l'expression d'ARN messenger de VCAM-1. Combiné à l'IL-1 $\beta$  celui-ci n'avait pas d'effet additif. Cette combinaison induit même une diminution de l'expression induite par la cytokine. De plus, nous avons démontré que le U46619 n'induisait ni l'activation de la JNK, ni l'augmentation de liaison de AP-1 à sa séquence spécifique. Par contre, nous avons observé une augmentation d'activité de liaison du facteur NF- $\kappa$ B lorsque les cellules ont été stimulées avec le U46619. Il serait donc intéressant de confirmer l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B en suivant par western blot la dégradation de I $\kappa$ B $\alpha$ , protéine responsable de la séquestration cytoplasmique du facteur transcription. Il serait également intéressant de réinvestiguer la voie d'activation du facteur AP-1 en analysant la phosphorylation et la translocation nucléaire de c-jun et ce, sur une cinétique plus longue.

Comme les agonistes du récepteur TP sont capables d'augmenter le niveau d'expression de l'ARN messenger de la cyclooxygénase-2, nous avons tenté de vérifier si cet effet se répercute sur la libération de la prostaglandine E<sub>2</sub> dans le milieu extracellulaire. Le U46619 seul à de faibles concentrations ( $\leq 1 \mu\text{M}$ ) n'est pas capable d'induire une libération de ce médiateur. Par contre, des concentrations plus élevées augmentent la libération de cette prostaglandine par les HVSMC. De plus, lorsque le U46619 est combiné à la cytokine IL-1 $\beta$ , nous observons un effet additif sur la libération de la prostaglandine E<sub>2</sub>. Cette observation est en accord avec le niveau d'expression de l'ARN messenger de COX-2 induit par la combinaison IL-1 $\beta$ -U46619. Schönbeck et ses collaborateurs ont démontré par western blot que l'expression de la COX-2 est augmentée dans les lésions athéromateuses humaines par rapport aux artères saines [71]. Comme la libération de la prostaglandine E<sub>2</sub> par les cellules musculaires lisses fragilise la plaque athéromateuse en augmentant l'expression de métalloprotéinases par les macrophages [72], les effets que nous avons observé ici renforce l'hypothèse du rôle néfaste des agonistes du récepteur TP.

La rupture de la plaque induit le contact entre les différents composants de celle-ci et les cellules du sang ; ce qui provoque l'agrégation plaquettaire. Nous avons testé l'effet du U46619 en combinaison avec l'antagoniste BM-520 sur du plasma riche en plaquettes. Nous avons observé que le U46619 est un puissant agent agrégant plaquettaire et qu'une pré-incubation avec le BM-520 permet d'inhiber l'effet de l'agoniste de façon dépendante de la concentration, indiquant à nouveau que le BM520 est un puissant antagoniste du récepteur TP.

En conclusion, nous avons mis en évidence deux effets importants induits par les agonistes du récepteur TP sur les cellules musculaires lisses d'artères humaines. Premièrement, nous avons observé que le U46619 (TXA<sub>2</sub>) possédait un effet pro-prolifératif sur ces cellules. Ce phénomène semble dépendre de l'isoforme  $\alpha$  de la PKC, quoique sa translocation nucléaire n'a pas pu être visualisée dans ce mémoire, et de l'activation des MAPK ERK p42/p44. Dans la plaque athéromateuse, la prolifération des cellules musculaires est influencée par un grand nombre de médiateurs inflammatoires libérés par les macrophages. Par son effet pro-prolifératif, le TXA<sub>2</sub> renforce davantage ce processus. Une prolifération excessive mène à une obstruction progressive de l'artère qui sera responsable de

l'apparition de symptômes. Deuxièmement, nous avons démontré que les agonistes du récepteur TP augmentaient l'expression de différents gènes impliqués dans l'inflammation. De manière générale, le TXA<sub>2</sub> a un effet plus puissant que l'isoprostane 8-iso-PGF<sub>2α</sub>. Combinés à l'IL-1β, mimant le contexte inflammatoire qui règne dans la plaque athéromateuse, les agonistes du récepteur TP ont des effets additifs voire synergiques pour certains gènes, excepté pour VCAM-1 et ICAM-1. L'augmentation de l'expression des gènes COX-2 et MCP-1 est corrélée avec une augmentation de la libération de prostaglandine E<sub>2</sub> et de la sécrétion de MCP-1, respectivement. La sécrétion de ces médiateurs au sein de la plaque fragilise celle-ci en recrutant davantage des leucocytes, ce qui augmentera encore la réaction inflammatoire et la prolifération cellulaire, engendrant une boucle d'amplification positive de cet état inflammatoire.

Comme les agonistes du récepteur TP semblent fortement impliqués dans l'athérogenèse, la modulation de l'activation du récepteur TP est devenue une cible thérapeutique attractive afin de réduire la progression des lésions athéromateuses. En effet, nous avons démontré que la pré-incubation des HVSMC avec les antagonistes du récepteur TP permet d'inhiber la prolifération induite par le U46619. Les antagonistes permettent également de réduire l'expression des gènes impliqués dans l'inflammation et la sécrétion de MCP-1. Les antagonistes du récepteur TP pourraient non seulement abolir les effets du TXA<sub>2</sub> mais également inhiber la liaison des isoprostanes au récepteur TP. Un traitement avec ces antagonistes favoriserait la réduction de la réaction inflammatoire diminuant le recrutement de leucocytes et renforçant la stabilité de la plaque. Ces molécules permettraient également de freiner la progression de la lésion en inhibant la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses de la média, réduisant ainsi la taille de la lésion et l'inflammation locale. En plus de leurs effets anti-athérogènes, les antagonistes du récepteur TP possèdent une activité anti-thrombotique inhibant l'agrégation plaquettaire. Ainsi, un tel traitement permettra chez un patient dont les lésions sont encore précoces d'inhiber la progression de la pathologie; et chez un patient dont les lésions athéromateuses sont vulnérables de réduire le risque d'accidents vasculaires. Les antagonistes du récepteur TP possèdent donc un grand intérêt pour un développement pharmaceutique.

## V. Bibliographie

1. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-16.
2. Assmann, G., et al., *Coronary heart disease: reducing the risk: the scientific background to primary and secondary prevention of coronary heart disease. A worldwide view. International Task force for the Prevention of Coronary Heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(8): p. 1819-24.
3. Berg, K., A.L. Borresen, and G. Dahlen, *Effect of smoking on serum levels of HDL apoproteins*. Atherosclerosis, 1979. **34**(3): p. 339-43.
4. Yamaguchi, H., et al., *Chlamydia pneumoniae infection induces differentiation of monocytes into macrophages*. Infect Immun, 2002. **70**(5): p. 2392-8.
5. Feletou, M. and P.M. Vanhoutte, *Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture)*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H985-1002.
6. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis*. Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 1-5.
7. Boren, J., et al., *Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding*. J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2658-64.
8. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
9. Rajavashisth, T.B., H. Yamada, and N.K. Mishra, *Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factor-kappa B*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(10): p. 1591-8.
10. Shi, W., et al., *Endothelial responses to oxidized lipoproteins determine genetic susceptibility to atherosclerosis in mice*. Circulation, 2000. **102**(1): p. 75-81.
11. Dong, Z.M., et al., *The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis*. J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 145-52.
12. Johnson-Tidey, R.R., et al., *Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1*. Am J Pathol, 1994. **144**(5): p. 952-61.
13. Iiyama, K., et al., *Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation*. Circ Res, 1999. **85**(2): p. 199-207.
14. Collins, R.G., et al., *P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 189-94.

15. Gosling, J., et al., *MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B*. J Clin Invest, 1999. **103**(6): p. 773-8.
16. Sisson, S.D. and C.A. Dinarello, *Production of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor by human mononuclear cells stimulated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. Blood, 1988. **72**(4): p. 1368-74.
17. Dinarello, C.A., et al., *Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1*. J Exp Med, 1986. **163**(6): p. 1433-50.
18. Kirii, H., et al., *Lack of interleukin-1beta decreases the severity of atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(4): p. 656-60.
19. Colles, S.M., K.C. Irwin, and G.M. Chisolm, *Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury: dominance of 7 beta-hydroperoxycholesterol*. J Lipid Res, 1996. **37**(9): p. 2018-28.
20. Berliner, J.A., et al., *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics*. Circulation, 1995. **91**(9): p. 2488-96.
21. Sukhova, G.K., et al., *Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques*. Circulation, 1999. **99**(19): p. 2503-9.
22. Herman, M.P., et al., *Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling*. Circulation, 2001. **104**(16): p. 1899-904.
23. FitzGerald, G.A., et al., *Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation*. N Engl J Med, 1984. **310**(17): p. 1065-8.
24. Yamamoto, K., et al., *Thromboxane A2 receptor-mediated signal transduction in rabbit aortic smooth muscle cells*. Gen Pharmacol, 1995. **26**(7): p. 1489-98.
25. Ally, A.I. and D.F. Horrobin, *Thromboxane A2 in blood vessel walls and its physiological significance: relevance to thrombosis and hypertension*. Prostaglandins Med, 1980. **4**(6): p. 431-8.
26. Ishizuka, T., et al., *Thromboxane A2 receptor blockade suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression by stimulated vascular endothelial cells*. Eur J Pharmacol, 1996. **312**(3): p. 367-77.
27. Morrow, J.D., et al., *A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(23): p. 9383-7.
28. Patrono, C. and G.A. FitzGerald, *Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(11): p. 2309-15.
29. Pratico, D., et al., *Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F2alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 14916-24.
30. Raychowdhury, M.K., et al., *Alternative splicing produces a divergent cytoplasmic tail in the human endothelial thromboxane A2 receptor*. J Biol Chem, 1994. **269**(30): p. 19256-61.

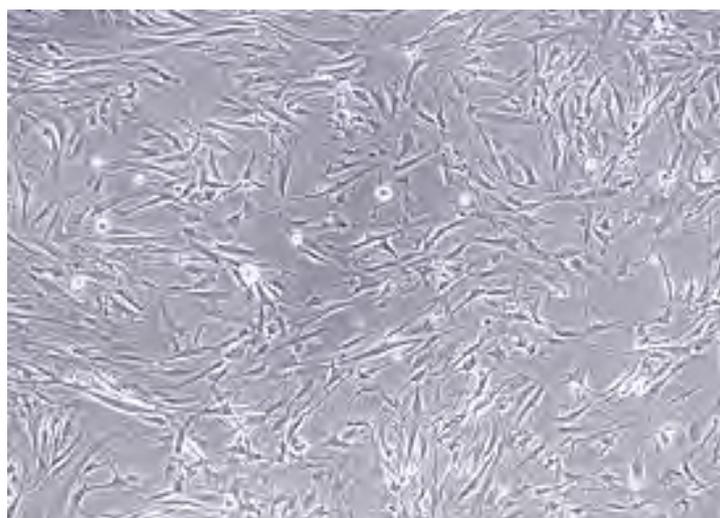
31. Miggin, S.M. and B.T. Kinsella, *Expression and tissue distribution of the mRNAs encoding the human thromboxane A2 receptor (TP) alpha and beta isoforms*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1425**(3): p. 543-59.
32. Hirata, M., et al., *Cloning and expression of cDNA for a human thromboxane A2 receptor*. *Nature*, 1991. **349**(6310): p. 617-20.
33. Nusing, R.M., et al., *Characterization and chromosomal mapping of the human thromboxane A2 receptor gene*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(33): p. 25253-9.
34. Shenker, A., et al., *The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(14): p. 9309-13.
35. Audoly, L.P., et al., *Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF(2alpha)-III and iPE(2)-III are mediated via the thromboxane A(2) receptor in vivo*. *Circulation*, 2000. **101**(24): p. 2833-40.
36. Tang, M., et al., *Involvement of thromboxane receptor in the proatherogenic effect of isoprostane F2alpha-III: evidence from apolipoprotein E- and LDL receptor-deficient mice*. *Circulation*, 2005. **112**(18): p. 2867-74.
37. Kumar, A., E. Kingdon, and J. Norman, *The isoprostane 8-iso-PGF2alpha suppresses monocyte adhesion to human microvascular endothelial cells via two independent mechanisms*. *FASEB J*, 2005. **19**(3): p. 443-5.
38. Fukunaga, M., et al., *Evidence for the existence of F2-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells*. *Am J Physiol*, 1993. **264**(6 Pt 1): p. C1619-24.
39. Cyrus, T., et al., *Stabilization of advanced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice by aspirin*. *Atherosclerosis*, 2006. **184**(1): p. 8-14.
40. Kobayashi, T., et al., *Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(6): p. 784-94.
41. Pratico, D., et al., *Localization of distinct F2-isoprostanes in human atherosclerotic lesions*. *J Clin Invest*, 1997. **100**(8): p. 2028-34.
42. Cracowski, J.L., O. Berdeaux, and T. Durand, *[Isoprostanes, biomarkers of lipid peroxidation in humans. Part 3: Biomarkers and mediators in vascular physiology and disease]*. *Pathol Biol (Paris)*, 2005. **53**(6): p. 364-8.
43. Cyrus, T., et al., *Vitamin E reduces progression of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice with established vascular lesions*. *Circulation*, 2003. **107**(4): p. 521-3.
44. Dogne, J.M., et al., *Pharmacological evaluation of the novel thromboxane modulator BM-567 (I/II). Effects of BM-567 on platelet function*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003. **68**(1): p. 49-54.
45. Rolin, S., et al., *Activity of a novel dual thromboxane A(2)receptor antagonist and thromboxane synthase inhibitor (BM-573) on platelet function and isolated smooth muscles*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2001. **65**(2): p. 67-72.

46. Rolin, S., et al., *BM-520, an original TXA2 modulator, inhibits the action of thromboxane A2 and 8-iso-prostaglandin F2alpha in vitro and in vivo on human and rodent platelets, and aortic vascular smooth muscles from rodents*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2007. **84**(1-2): p. 14-23.
47. Cyrus, T., et al., *A novel thromboxane receptor antagonist and synthase inhibitor, BM-573, reduces development and progression of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice*. Eur J Pharmacol, 2007. **561**(1-3): p. 105-11.
48. Zhuge, X., et al., *Protection of atherogenesis in thromboxane A2 receptor-deficient mice is not associated with thromboxane A2 receptor in bone marrow-derived cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2006. **351**(4): p. 865-71.
49. Leitinger, N., et al., *The isoprostane 8-iso-PGF(2alpha) stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation*. FASEB J, 2001. **15**(7): p. 1254-6.
50. Sametz, W., et al., *Characterization of prostanoid receptors mediating actions of the isoprostanes, 8-iso-PGE(2) and 8-iso-PGF(2alpha), in some isolated smooth muscle preparations*. Br J Pharmacol, 2000. **130**(8): p. 1903-10.
51. Morrow, J.D., T.A. Minton, and L.J. Roberts, 2nd, *The F2-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist*. Prostaglandins, 1992. **44**(2): p. 155-63.
52. Itoh, H., et al., *Differential effects of protein kinase C on human vascular smooth muscle cell proliferation and migration*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **281**(1): p. H359-70.
53. Sachinidis, A., et al., *Thromboxane A2 and vascular smooth muscle cell proliferation*. Hypertension, 1995. **26**(5): p. 771-80.
54. Hanasaki, K., T. Nakano, and H. Arita, *Receptor-mediated mitogenic effect of thromboxane A2 in vascular smooth muscle cells*. Biochem Pharmacol, 1990. **40**(11): p. 2535-42.
55. Ko, F.N., et al., *Characterization of the thromboxane (TP-) receptor subtype involved in proliferation in cultured vascular smooth muscle cells of rat*. Br J Pharmacol, 1995. **116**(2): p. 1801-8.
56. Landsberg, J.W. and J.X. Yuan, *Calcium and TRP channels in pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation*. News Physiol Sci, 2004. **19**: p. 44-50.
57. Short, A.D., et al., *Intracellular Ca2+ pool content is linked to control of cell growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 4986-90.
58. Golovina, V.A., et al., *Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca(2+) entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(2): p. H746-55.
59. Miggin, S.M. and B.T. Kinsella, *Thromboxane A(2) receptor mediated activation of the mitogen activated protein kinase cascades in human uterine smooth muscle cells*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1539**(1-2): p. 147-62.

60. Takahara, N., et al., *Lysophosphatidylcholine stimulates the expression and production of MCP-1 by human vascular endothelial cells*. *Metabolism*, 1996. **45**(5): p. 559-64.
61. Shyy, Y.J., et al., *Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(11): p. 4678-82.
62. Nelken, N.A., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques*. *J Clin Invest*, 1991. **88**(4): p. 1121-7.
63. Aiello, R.J., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999. **19**(6): p. 1518-25.
64. Xu, L., et al., *Modulation of IL-8 receptor expression on purified human T lymphocytes is associated with changed chemotactic responses to IL-8*. *J Leukoc Biol*, 1995. **57**(2): p. 335-42.
65. Koch, A.E., et al., *Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis*. *Science*, 1992. **258**(5089): p. 1798-801.
66. Yue, T.L., et al., *Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells*. *Circ Res*, 1994. **75**(1): p. 1-7.
67. Elhage, R., et al., *Involvement of interleukin-6 in atherosclerosis but not in the prevention of fatty streak formation by 17beta-estradiol in apolipoprotein E-deficient mice*. *Atherosclerosis*, 2001. **156**(2): p. 315-20.
68. Schieffer, B., et al., *Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis*. *Circulation*, 2004. **110**(22): p. 3493-500.
69. Viedt, C., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. **22**(6): p. 914-20.
70. Bayat, H., et al., *Activation of thromboxane receptor upregulates interleukin (IL)-1beta-induced VCAM-1 expression through JNK signaling*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008. **28**(1): p. 127-34.
71. Schonbeck, U., et al., *Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions*. *Am J Pathol*, 1999. **155**(4): p. 1281-91.
72. Corcoran, M.L., et al., *Interleukin 4 inhibition of prostaglandin E2 synthesis blocks interstitial collagenase and 92-kDa type IV collagenase/gelatinase production by human monocytes*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(1): p. 515-9.

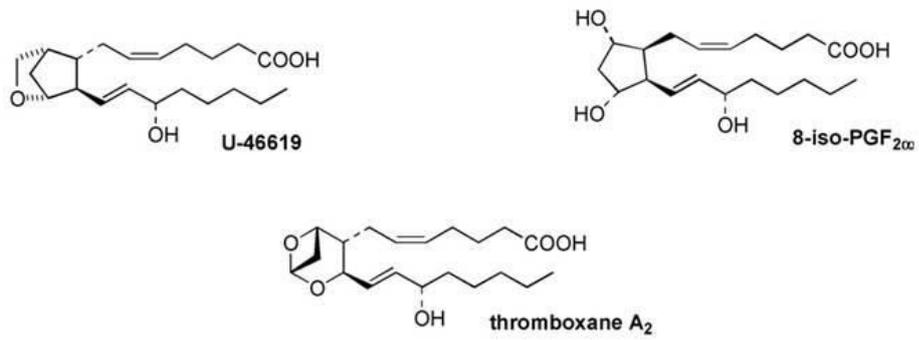
Compléments	Source	Concentration finale
L-glutamine	Gibco	2 mM
NEAA (No Essential Amino Acids)	Gibco	dilution 100 X
Hepes	Gibco	10 mM
TES	Gibco	10 mM
Acide ascorbique	Gibco	0,05 mg/ml
ITS (Insulin Transferin Sodium selenite)	Gibco	dilution 100 X
ECGS (Endothelial Cell Growth supplement)	Gibco	0,03 mg/ml

**Tableau II.1.** Compléments ajoutés au milieu de culture F12

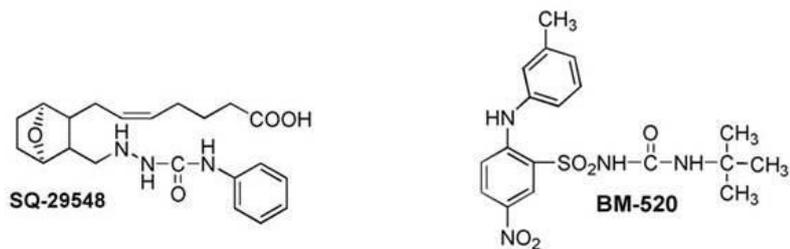


**Figure II.1.** Morphologie des cellules musculaires lisses d'artère humaine (HVSMC). (grossissement 10 X)

## Agonistes du récepteur TP



## Antagonistes du récepteur TP



**Figure II.2.** Structure des agonistes et des antagonistes du récepteur TP utilisés dans le cadre de ce mémoire. (Rolin *et al.*, 2007)

<b>Inhibiteurs</b>	<b>Référence</b>	<b>Concentration testée</b>
Calphostine	Biomol EI-198	2 mM
HBDDE	Enzo EI-273	50 mM
Go6976	Biomol EI-269	300 nM
BAPTA-AM	Molecular Probes B-1205	1 et 5 $\mu$ M

**Tableau II.2.** Inhibiteurs utilisés lors des tests de prolifération

<b>Composants</b>	<b>Détails</b>	<b>Quantité (2 ml)</b>
Tampon de lyse 2x pH 7,5	mM : Tris 80, KCl 300, EDTA 2	1 ml
H <sub>2</sub> O distillée	/	580 µl
Triton X100	/	20 µl
PIC ( <i>Phosphatase Inhibitor Cocktail</i> )	nM : Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 25, PNPP 250, β-glycérophosphate 250, NaF 125	200 µl
PIB ( <i>Protease Inhibitor Cocktail</i> )	1 tablette à dissoudre dans 1 ml H <sub>2</sub> O distillée	200 µl

**Tableau II.3.** Composition du tampon de lyse pour l'extraction protéique totale

Gel buffer (200 ml)	36,3 g de Tris 0,8 g de SDS pH 8,9
Spacer gel buffer (100 ml)	6,06 de Tris 0,4 g de SDS pH 6,8
Running buffer 10x (1l)	63,2 g de Tris 40 g de glycine 10 g de SDS
Bleu de charge 5x	10 ml de spacer buffer 10 ml de SDS 20 % 5 ml de $\beta$ - mercaptoéthanol 10 ml de glycérol 17,5 mg de bleu de bromophénol
Blotting buffer	24 g de Tris 115 g de glycine 1 l de méthanol
TBS 10x (1 l)	24,22 g de Tris 80,06 g de NaCl pH 7,6

**Tableau II.4.** Composition des solutions utilisées pour les analyses par western blot

Anticorps primaire	Référence	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Anti-p38	9212 ; cell signaling	1 .000 X	Anti-lapin couplé à la peroxydase	300.000 X
Anti-phospho-p38	9211 ; cell signaling	1.000 X	Anti-lapin couplé à la peroxydase	300.000 X
Anti-JNK	9252 ; cell signaling	1.000 X	Anti-lapin couplé à la peroxydase	300.000 X
Anti-phospho-JNK	9251 ; cell signaling	1.000 X	Anti-lapin couplé à la peroxydase	300.000 X
Anti-Hsp27	sc-1048 ; Santa Cruz Biotechnology	1.000 X	Anti-chèvre couplé à la peroxydase	300.000 X
Anti-phospho-Hsp27	P04792 Millipore	4.000 X	Anti-lapin couplé à la peroxydase	300.000 X
Anti-ERK p42/p44	9102 ; cell Signaling	5.000 X	Anti-lapin couplé à la peroxydase	300.000 X
Anti-phospho-ERK p42/p44	9101 ; cell Signaling	5.000 X	Anti-lapin couplé à la peroxydase	300.000 X
Anti-tubuline- $\alpha$	Neomarks	50.000 X	Anti-souris couplé à la peroxydase	300.000 X

**Tableau II.5.** Anticorps utilisés pour les analyses par western blot

HB (Hypotonic Buffer) 10x	50 mM NaF 10 mM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 200 mM HEPES 1 mM EDTA pH 7,9
Tampon de lyse 0,5 % NP-40 (100 ml)	10 ml de HB 10 X 500 µl de NP-40 100 % 89,5 ml H <sub>2</sub> O
Tampon RE (1 ml)	500 µl HB 2x 200 µl glycérol 300 µl H <sub>2</sub> O
Tampon SA (1 ml)	500 µl HB 2x 200 µl glycérol 200 µl NaCl 4 M 100 µl H <sub>2</sub> O
HB 2x (50 ml)	2 ml HEPES 1 M pH 7.9 1 ml NaF 0,5 M 1 ml Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 1 mM 20 µl EDTA 0,5 M Mettre à volume avec H <sub>2</sub> O

**Tableau II.6.** Composition des tampons utilisés pour l'extraction nucléaire

1.

<b>NF-kB</b>	
Tampon de binding concentré	Hepes 10 mM KCl 300 mM Glycérol 20 % H <sub>2</sub> O pH 7,5
Tampon de binding complet 1x	1 ml de tampon de binding concentré 500 µl de BSA 5 % 500 µl de DSS 0,05 mg/ml 500 µl d'H <sub>2</sub> O 5 µl de DTT 1 M
Tampon de lyse stock	Hepes 20 mM NaCl 350 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM EDTA 0,5 mM Glycérol 20 % NP-40 1 % pH 7,5
Tampon de lyse complet	2 ml de tampon de lyse stock 10 µl de DTT 1 M 80 µl de PIC

2.

<b>AP-1</b>	
Tampon de binding concentré	Hepes 6 mM EDTA 0,6 mM NaCl 24 mM Glycérol 36 % H <sub>2</sub> O pH 7,9
Tampon de binding complet 1x	800 µl de tampon de binding concentré 240 µl de DTT 10 mM 8 µl de PolydiC 0,05 µg/µl 24 µl de gloria 10 % 1352 µl d'H <sub>2</sub> O
Tampon de lyse	1 ml de tampon RE 1 ml de tampon SA 2 µl de DTT 1 M 80 µl de PIC 80 µl de PIB

**Tableau II.7.** Composition des tampons utilisés lors du Trans-AM

<b>Anticorps</b>	<b>Référence</b>	<b>Dilution</b>
Anti-PKC $\alpha$	610107 BD Transduction Laboratories	100 X
Anti-PKC $\delta$	Sc-937 Santa Cruz Biotechnology	100 X
Alexa Fluor 488 anti-mouse	Molecular Probes	1.000 X

**Tableau II.8.** Anticorps utilisés pour les marquages en immunofluorescence

Mix/tube	
Transcriptor reverse transcriptase reaction buffer	4 µl
Protector RNase inhibitor	0,5 µl
Deoxynucleotide mix	2 µl
Transcriptor reverse transcriptase	0,5 µl

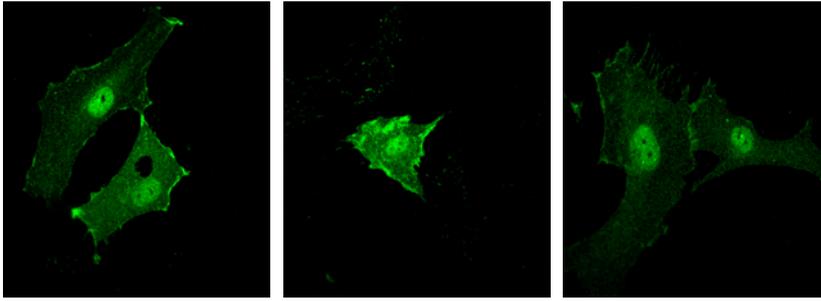
**Tableau II.9.** Composition du mix pour la reverse transcription

Gène	Amorce forward	Amorce reverse
MCP-1	CATTGTGGCCAAGGAGATCTG	AGTGAGTGTTCAAGTCTTCGGAGTT
IL-6	TGGCTGCAGGACATGACAA	CCATGCTACATTTGCCGAAGA
IL-8	TTGATACTCCCAGTCTTGTCATTGC	TGACTGCTGTGGAGTTTTGGCTGTTT
COX-2	ATTAGCCTGAATGTGCCA	ACCCACAGTGCTTGACAC
VCAM	TTGGCTCACAATTAAGAAGTTTAACAC	GCAGGTATTATTAAGGAGGATGCAA
ICAM-1	GGAGCTTCGTGTCCTGTATGG	ACATTGGAGTCTGCTGGGAATT
23 kDa	GCCTACAAGAAAGTTTGCCTA	TGAGCTGTTTCTTCTTCCGGTAGT

**Tableau II.10.** Amorces utilisées pour la PCR en temps réel

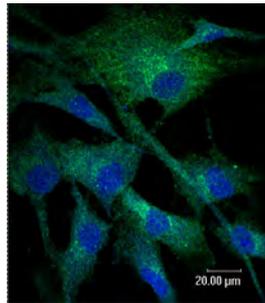
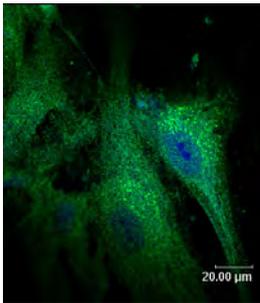
**A. PKC $\alpha$**

CTL + (PMA 15 minutes)



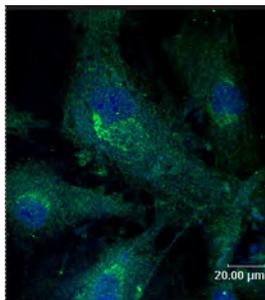
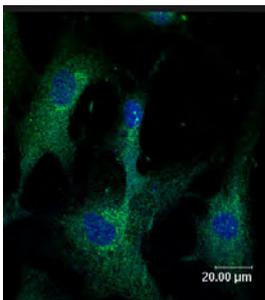
CTL - (non stimulé)

U46619 15 minutes



CTL - (non stimulé)

U46619 30 minutes

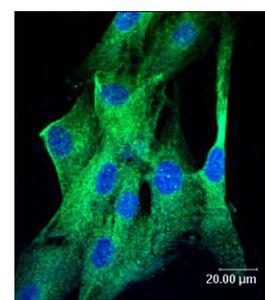
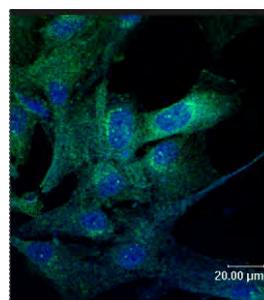
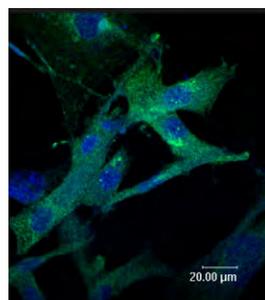
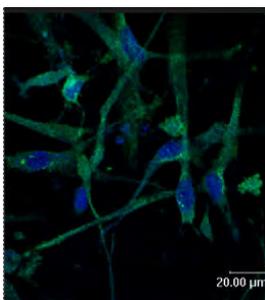


CTL - (non stimulé)

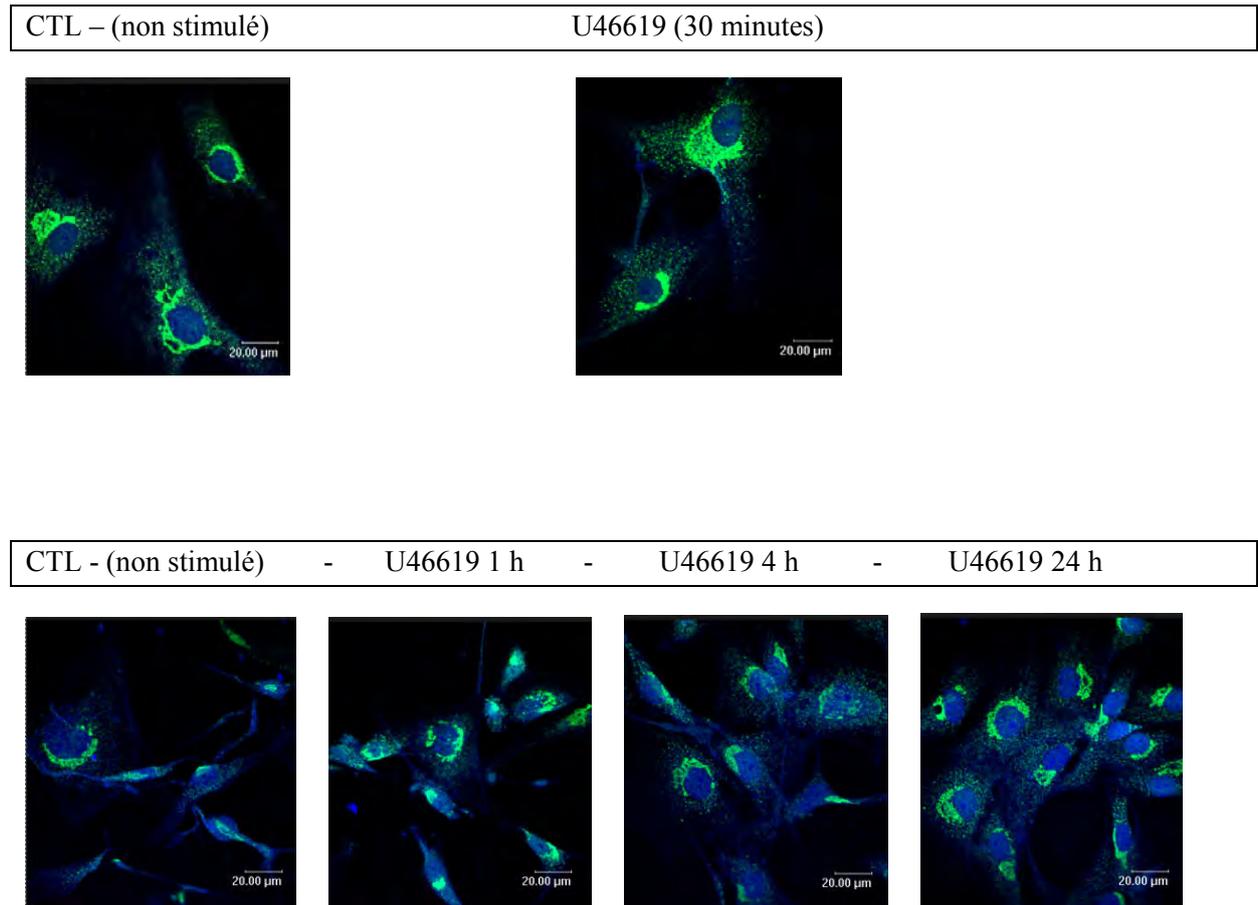
- U46619 1 h

- U46619 4 h

- U46619 24 h



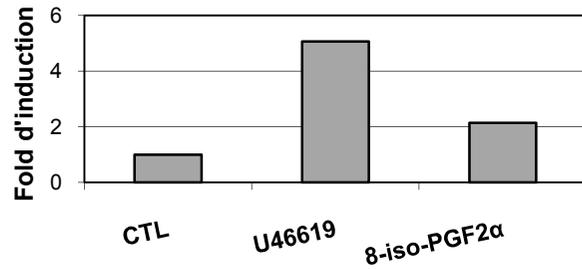
## B. PKC $\delta$



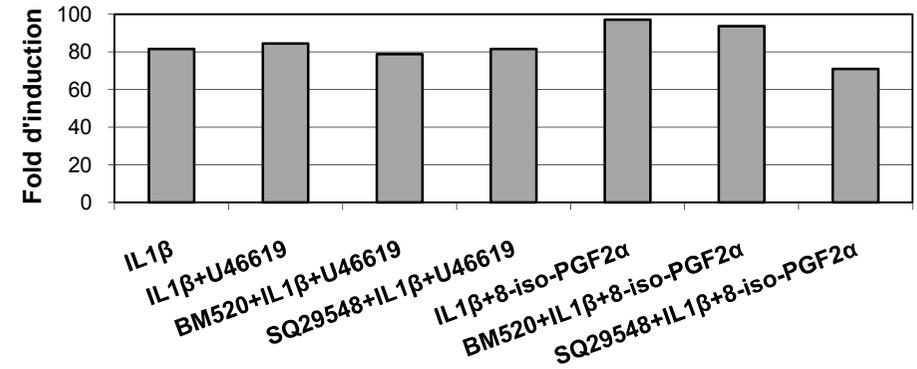
**Figure III.2. Effet du U46619 sur le recrutement et l'activation des isoformes de la PKC.** Les cellules ont été fixées et perméabilisées et l'isoforme de la PKC $\alpha$  (A) ou de la PKC $\delta$  (B) est marquée en vert grâce à un anticorps primaire spécifique et un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Les noyaux ont été marqués en bleu par un marquage au To-Pro. Les photographies ont été pris avec un PMT constant.

**A. MCP-1**

1.

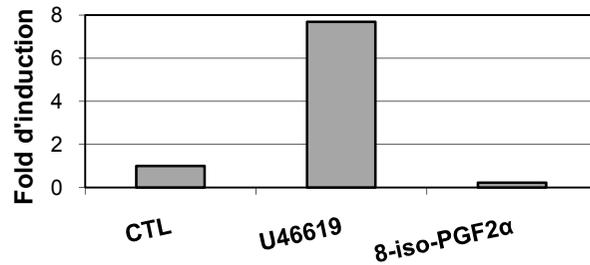


2.

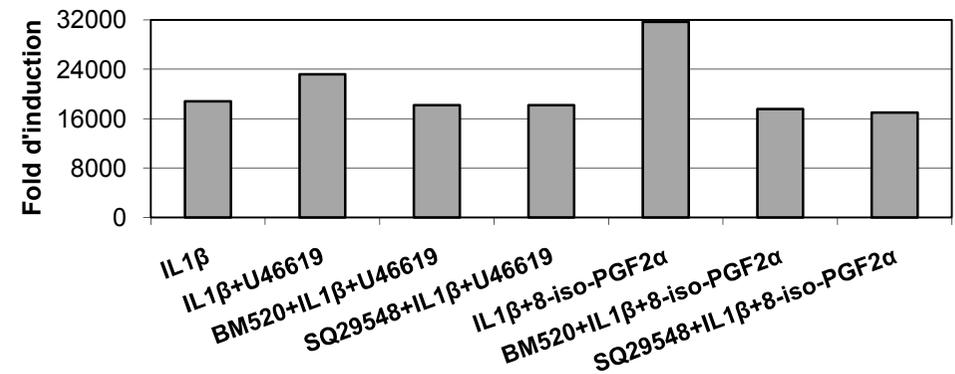


**B. IL-8**

1.



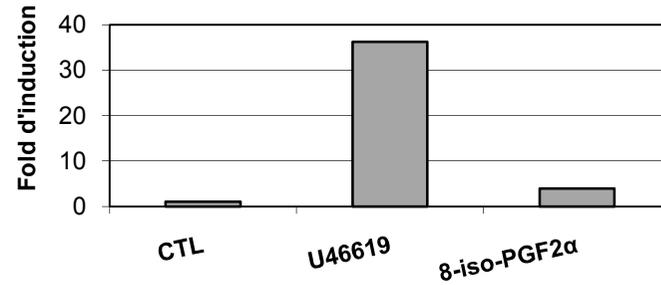
2.



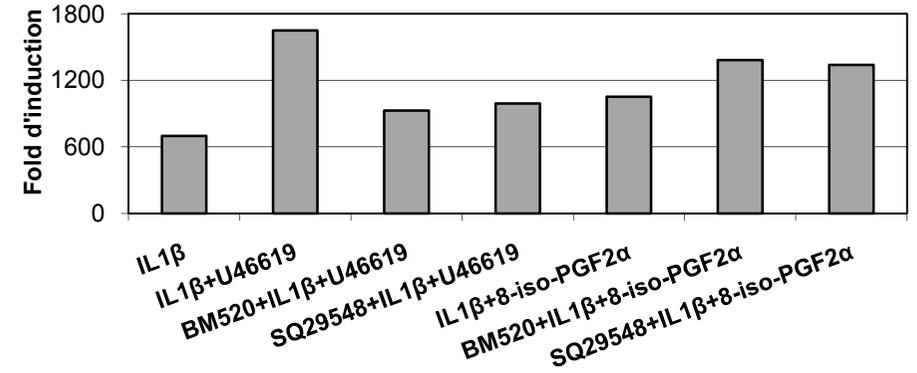
**Figures III.7. Effets des agonistes du récepteur TP seuls ou en combinaison avec l'IL1β sur l'abondance d'ARNm de gènes pro-inflammatoires.** Après une stimulation de 6 heures avec les agonistes combinés ou non à l'IL1β, précédée ou non d'une incubation d'1 avec les antagonistes, les ARNm des HVSMC ont été extraits et rétrotranscrits. L'ARNm des gènes IL-8 et MCP-1 a ensuite été amplifié et quantifié par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en fold d'induction, n=2.

### C. IL-6

1.

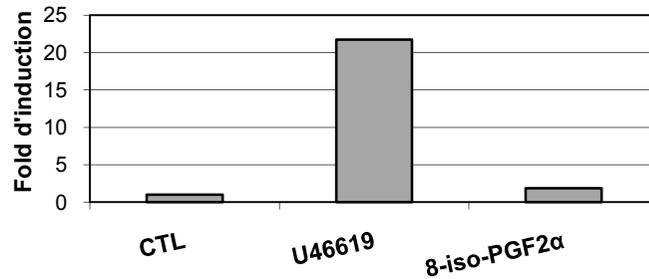


2.

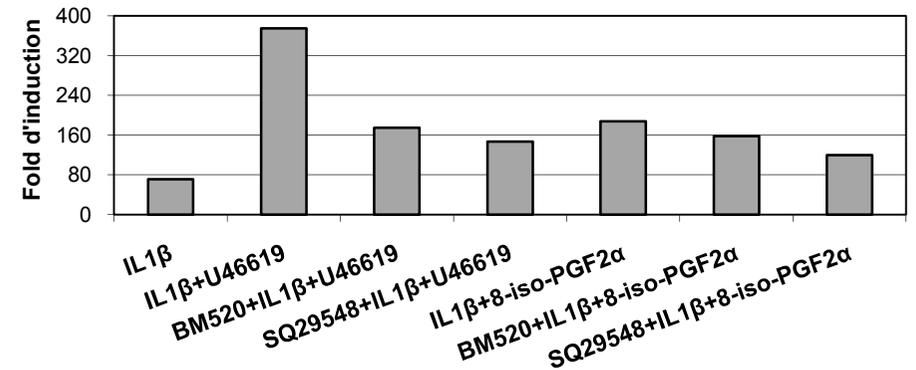


### D. COX-2

1.



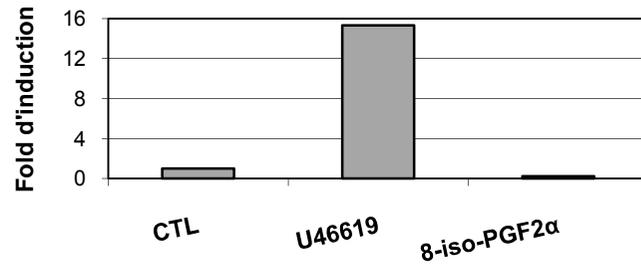
2.



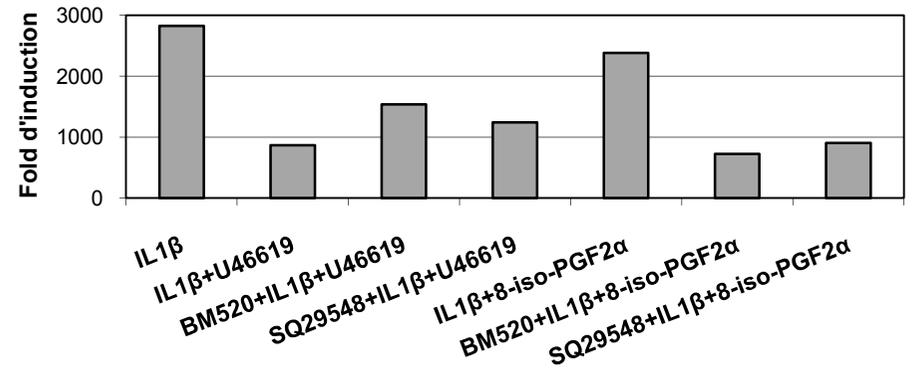
**Figures III.8. Effets des agonistes du récepteur TP seuls ou en combinaison avec l'IL1β sur l'abondance d'ARNm de gènes pro-inflammatoires.** Après une stimulation de 6 heures avec les agonistes combinés ou non à l'IL1β, précédée ou non d'une incubation d'une heure avec les antagonistes, les ARNm des HVSMC ont été extraits et rétrotranscrits. L'ARNm des gènes IL-6 et COX-2 a ensuite été amplifié et quantifié par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en fold d'induction, n=2.

### E. VCAM-1

1.

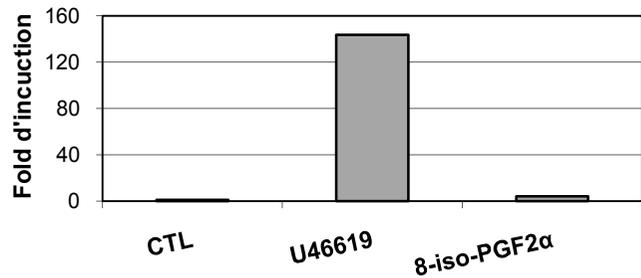


2.

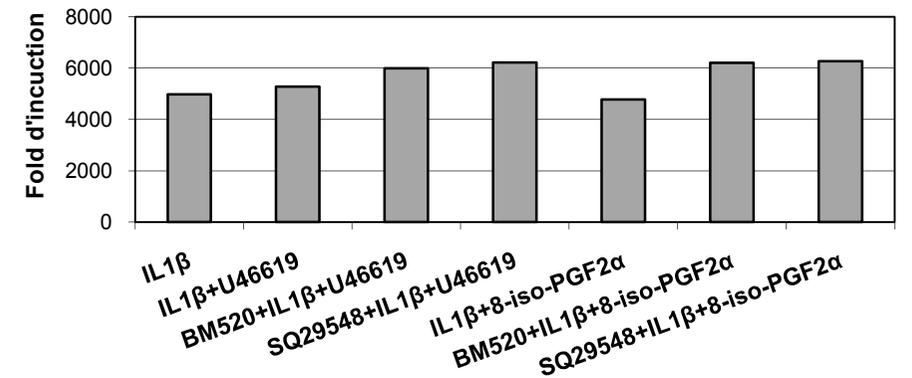


### F. ICAM-1

1.



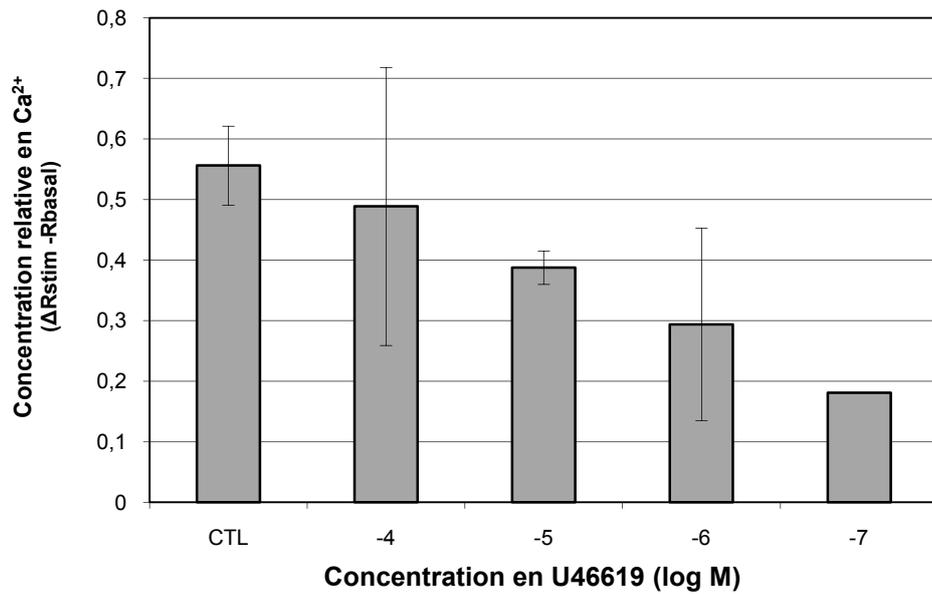
2.



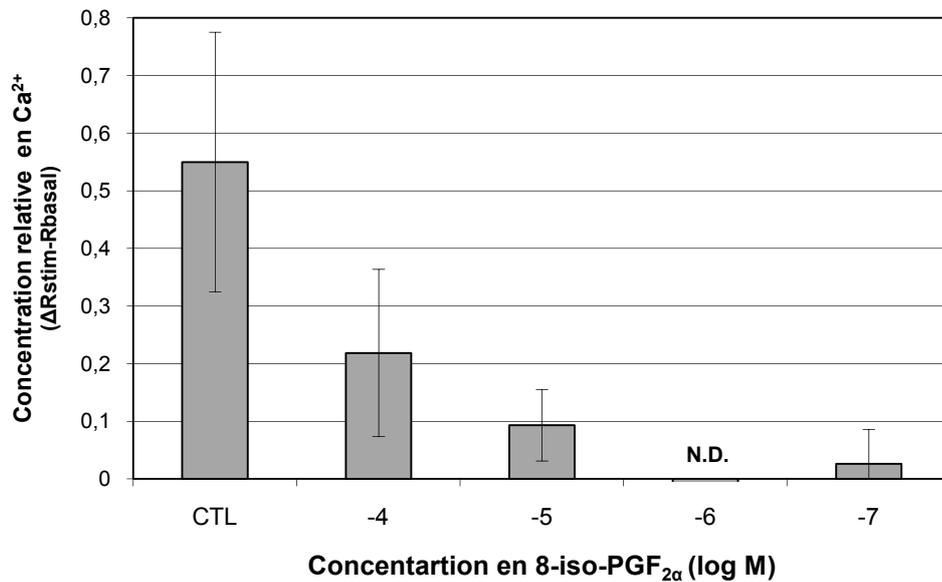
**Figures III.9. Effets des agonistes du récepteur TP seuls ou en combinaison avec l'IL1β sur l'abondance d'ARNm de gènes pro-inflammatoires.** Après une stimulation de 6 heures avec les agonistes combinés ou non à l'IL1β, précédée ou non d'une incubation d'une heure avec les antagonistes, les ARNm des HVSMC ont été extraits et rétro-transcrits. L'ARNm des gènes ICAM-1 et VCAM-1 a ensuite été amplifié et quantifié par PCR en temps réel. Les résultats sont exprimés en fold d'induction, n=2



**A.**



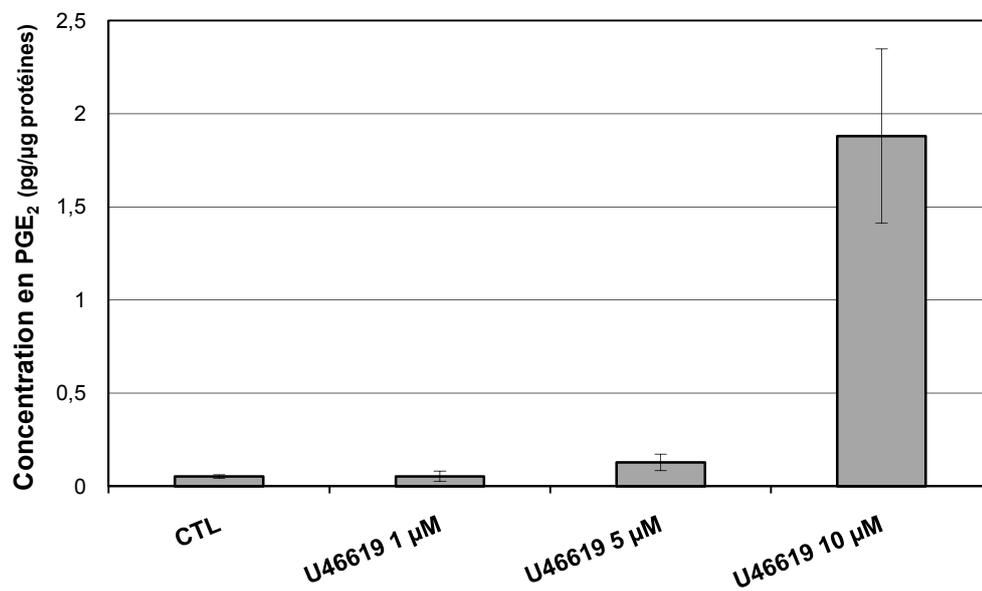
**B.**



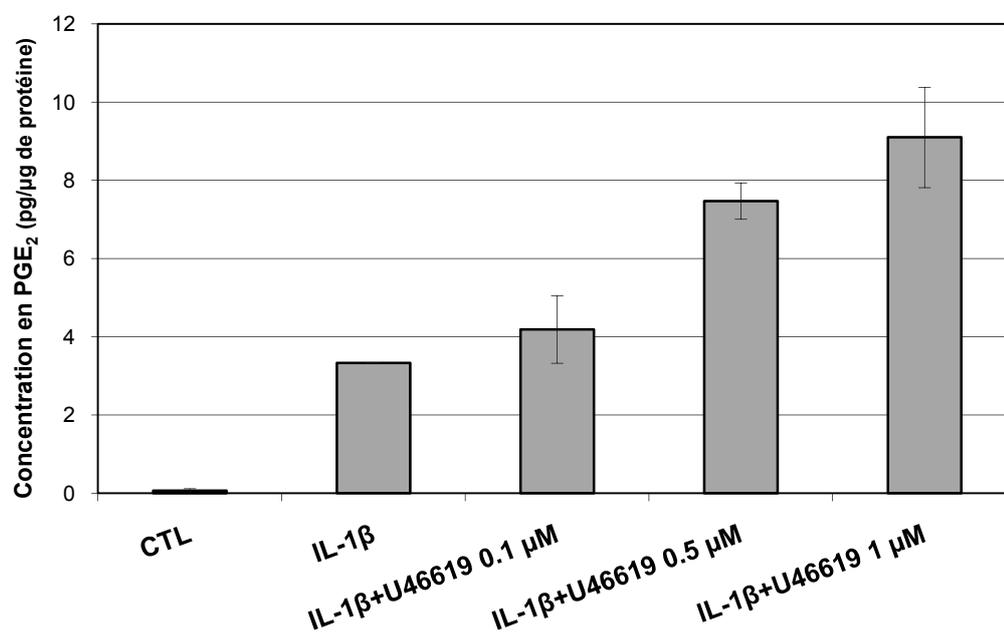
**Figure III.1. Effets des agonistes du récepteur TP sur la mobilisation du calcium intracellulaire.**

Les HVSMC chargées en sonde sont exposées à différentes concentrations en agonistes, en U46619 (A) et en 8-iso-PGF<sub>2α</sub> (B). La libération de calcium est visualisable par une augmentation de la fluorescence. Les ratios normalisés de la fluorescence basale et stimulée sont obtenus par la formule :  $R - R_{\min} / R_{\max} - R$ . Le contrôle positif (CTL) correspond à une stimulation à l'ionomycine (0,5 μM). Les résultats sont exprimés en moyenne ± 1 écart type, n ≥ 2 pour A. n=4 pour B. (N.D.= non déterminé)

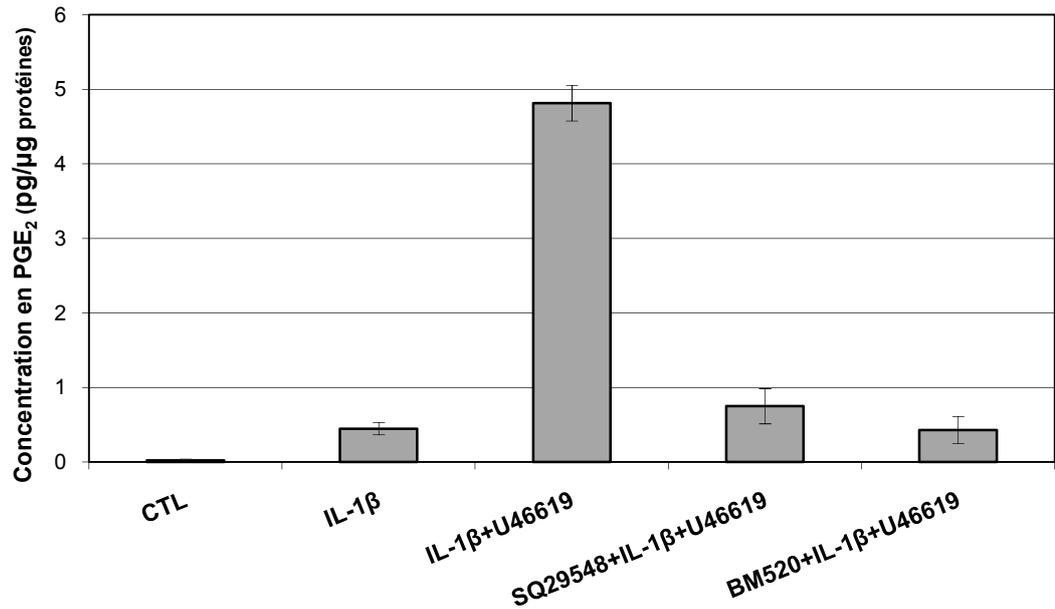
**A.**



**B.**



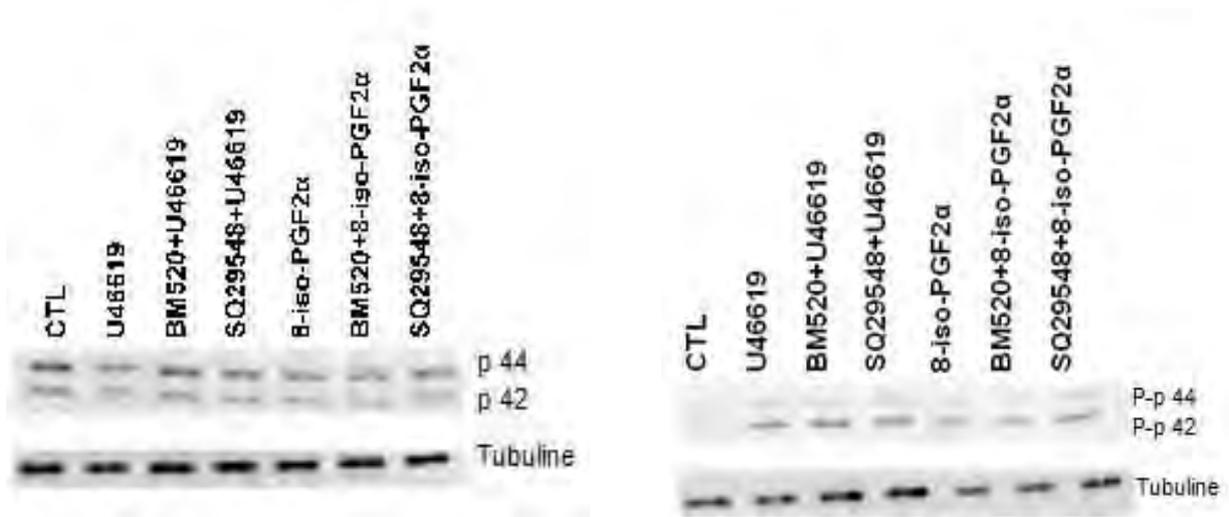
C.



**Figure III.3. Effets du U46619 et des antagonistes du récepteur TP seuls ou en combinaison avec l'IL1β sur la sécrétion de PGE<sub>2</sub>.** Après une stimulation de 6 heures avec le U46619 combiné ou non à l'IL-1β, précédée ou non d'une incubation d'une heure avec les antagonistes, le milieu de culture des HVSMC a été récupéré et la sécrétion de PGE<sub>2</sub> a été mesurée à l'aide d'un kit ELISA. Les résultats sont exprimés en pg par μg de protéines et représentent la moyenne ± 1 écart-type, n=5 (A) n=3 (B et C).

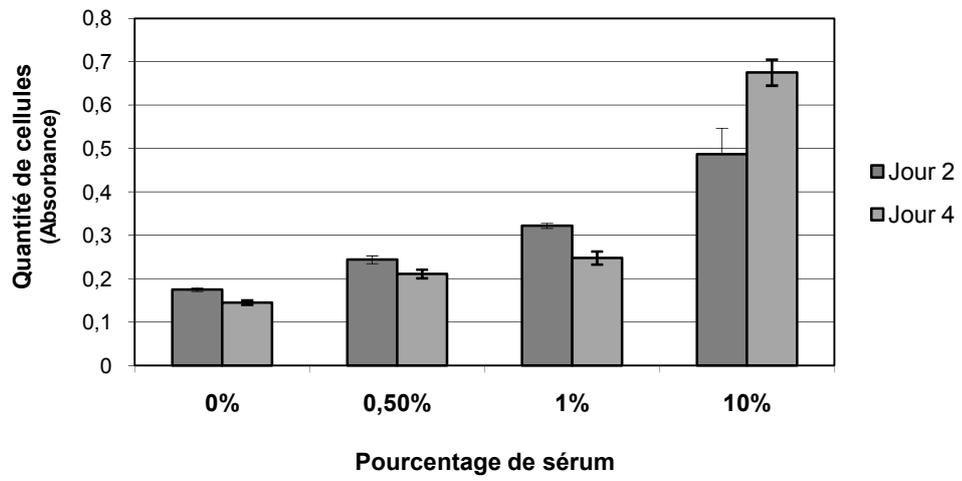
### 1. ERK p42/p44

### 2. Phospho-ERK p42/p44

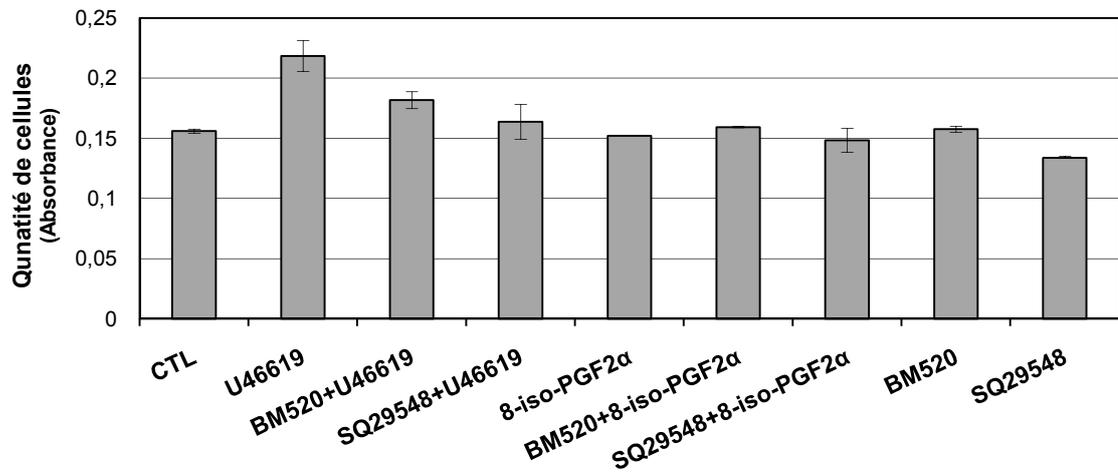


**Figure III.4. Effets des agonistes du récepteur TP sur l'activation des voies des MAPK.** Après une stimulation de 15 minutes des HVSMC avec les agonistes du récepteur TP, précédée ou non d'une incubation d'une heure avec les antagonistes, des extraits protéiques totaux ont été réalisés. Après électrophorèse et transfert des protéines sur membrane, les protéines ERK p42/p44 phosphorylées ou non ont été révélées à l'aide d'anticorps spécifiques. Le contrôle de charge correspond à la tubuline.

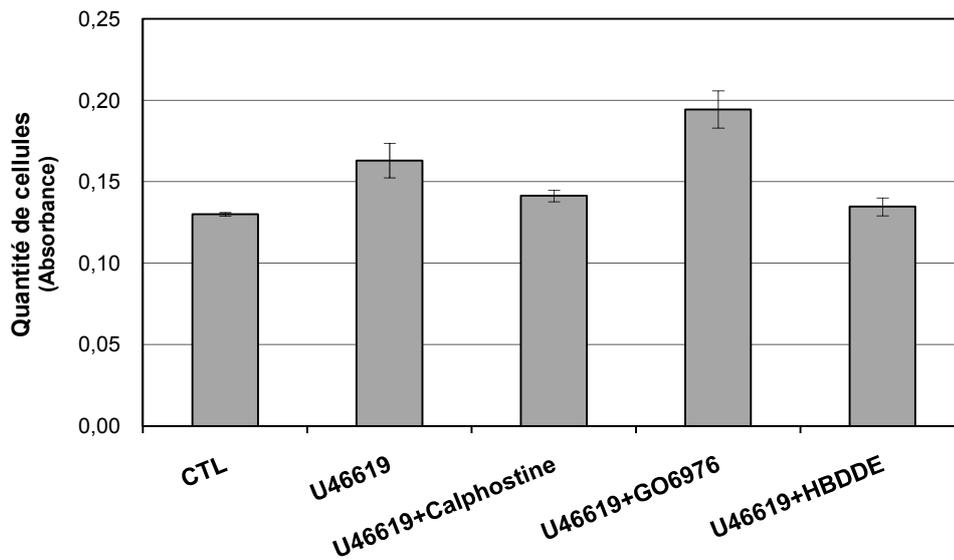
**A.**



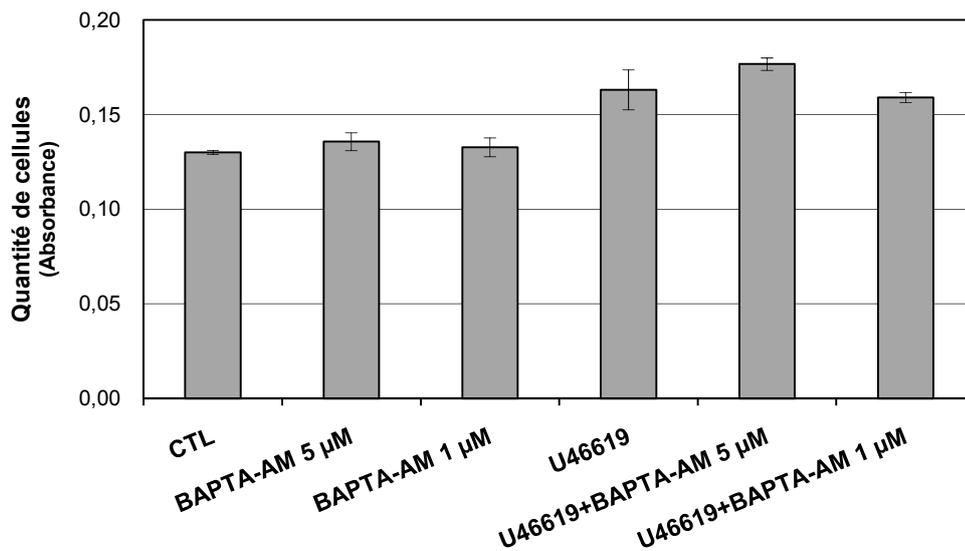
**B.**



C.



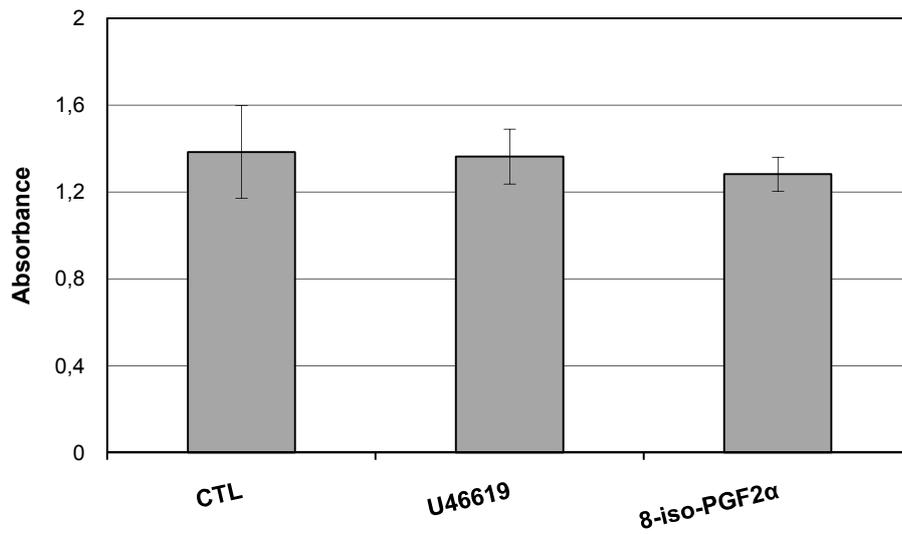
D.



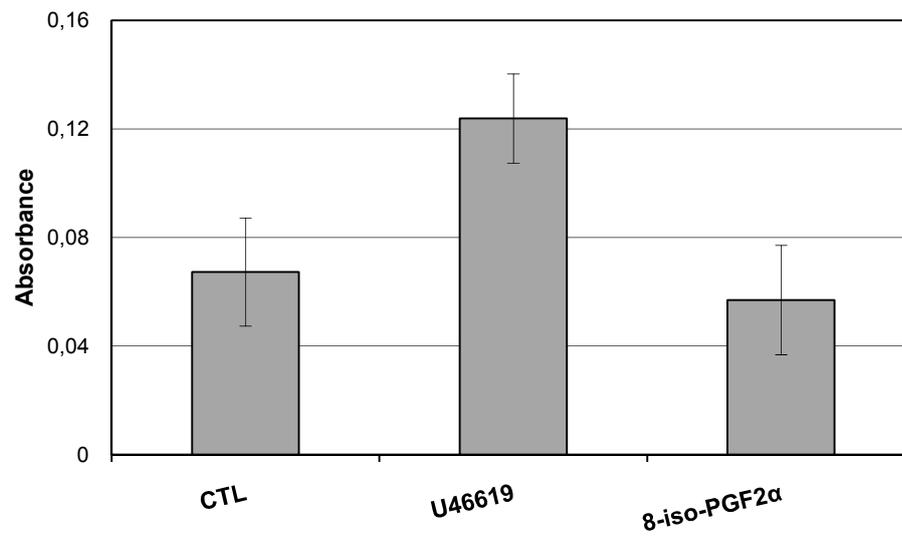
**Figure III.5. Effets des agonistes et des antagonistes du récepteur TP sur la prolifération cellulaire.** Les HVSMC ont été incubées pendant 2 (A) ou 4 jours (A,B,C,D) dans le milieu de culture contenant différents pourcentage de sérum (A) ou 0,5 % de sérum en présence ou non des agonistes du récepteur TP et/ou des antagonistes (B,C,D). Divers inhibiteurs ont également été utilisés, la calphostine (2 µM), le Go6976 (300 nM), le HBDDE (50 µM) et le BAPTAM-AM (1 et 5 µM). Après 4 jours, le nombre de cellules vivantes est déterminé par un test MTT. Les résultats correspondent à l'absorbance du MTT modifié et lysé et sont exprimés en moyenne  $\pm$  1 écart type, n=3.



### A. AP-1



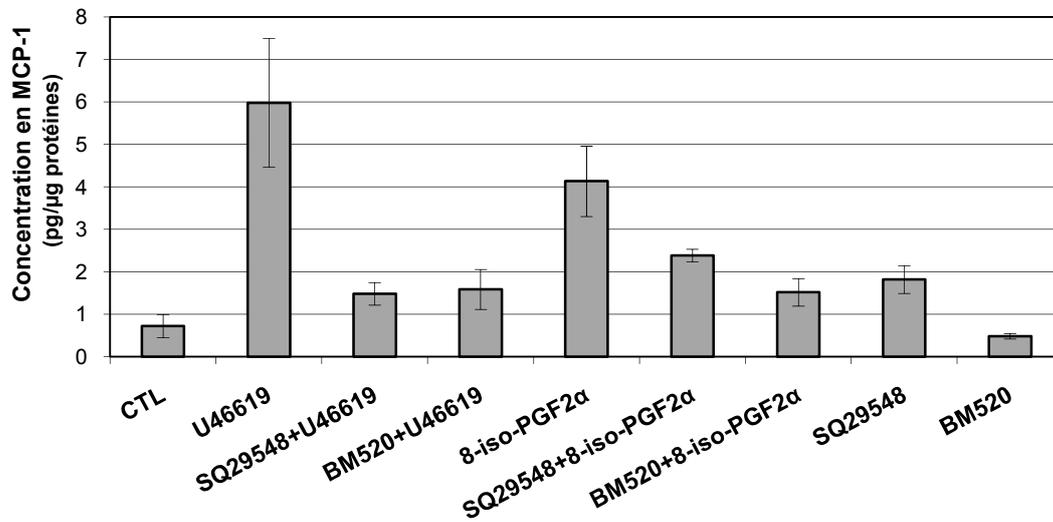
### B. NF-κB



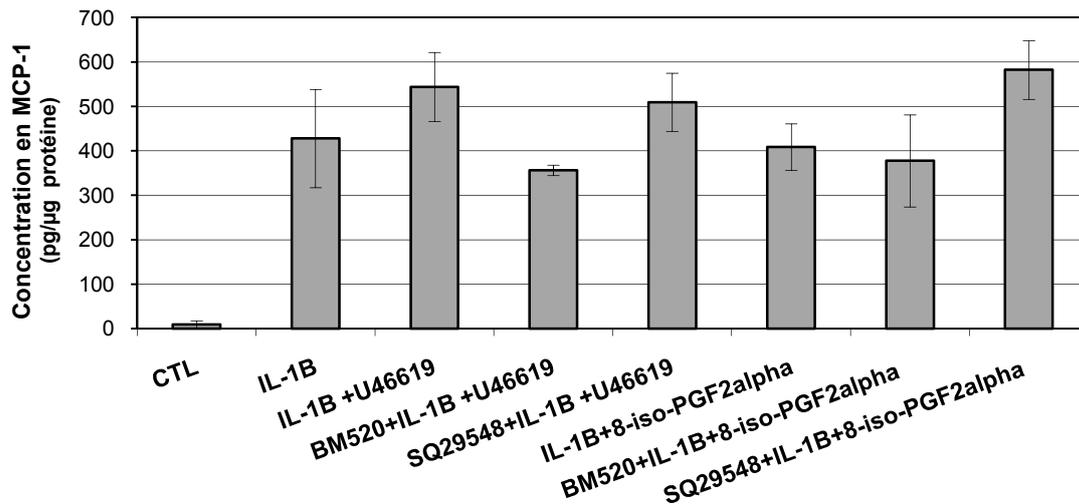
**Figure III.6. Effets des agonistes du récepteur TP sur la liaison de facteurs de transcription à leur séquence consensus.** Après une stimulation de 30 minutes avec les agonistes du récepteur TP, des extraits nucléaires ont été réalisés. L'activité de liaison de AP-1 (A) et NF-κB (B) a pu être déterminée par incubation des extraits dans des puits coâtés avec les séquences consensus de ces facteurs de transcription et détectée en présence d'anticorps anti-c-jun et p65 respectivement. Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  1 écart type, n=3.



A.

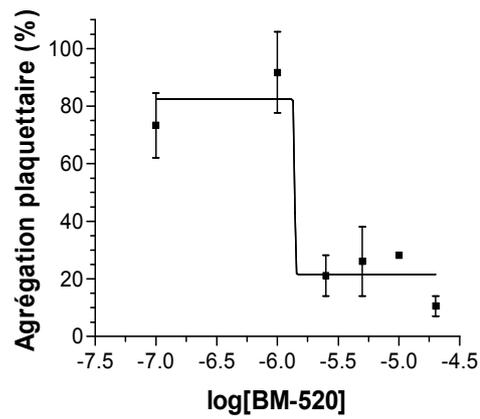


B.

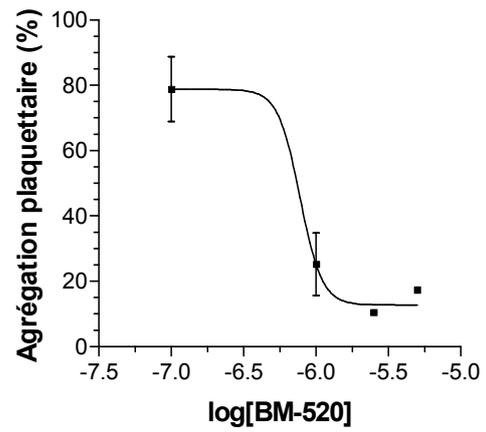


**Figure III.10. Effets des agonistes seuls ou en combinaison avec l'IL-1 $\beta$  sur la sécrétion de MCP-1.** Après une stimulation de 6 heures avec les agonistes sans (A) ou avec IL-1 $\beta$  (B), précédée ou non d'une incubation d'une heure avec les antagonistes, le milieu de culture des HVSMC a été récupéré et la sécrétion de MCP-1 a été mesurée à l'aide d'un kit ELISA. Les résultats sont exprimés en pg par  $\mu$ g de protéines et représentent la moyenne  $\pm$  1 écart-type, n=3.

A.



B.



**Figure III.11. Effet du BM520 sur l'agrégation plaquettaire induite par l'acide arachidonique (A) et le U46619 (B).** PRP (platelet-rich plasma) est incubé 2 minutes avec le BM520 avant que le U46619 (1  $\mu$ M) ou l'acide arachidonique (600  $\mu$ M) ne soit ajouté. Chaque point représente la moyenne  $\pm$  1 écart type, n=2 ou 3.