



**ACADEMIE ROUMAINE
INSTITUT DE BIOLOGIE ET PATHOLOGIE CELLULAIRE
„NICOLAE SIMIONESCU”**

**INTERVENTIONS MOLECULAIRES SUR
L'EXPRESSION DES PROTEINES PRO ET
ANTIATHEROGENES POUR L'AMELIORATION DE
L'ATHEROSCLEROSE**

Coordonnateur scientifique

Acad. Dr. Maya Simionescu

Doctorant

Ioana Mădălina Fenyo

BUCAREST

2013

SOMMAIRE

Avant lettre	3
Abréviations	4
INTRODUCTION	6
I. PARTIE I – L'état actuel des connaissances	8
I.1. Chapitre 1 - Les NADPH oxydases – promoteurs de stress oxydatif dans l'athérosclérose	9
I.1.1. Les changements induites par le stress oxydatif dans l'athérosclérose	9
I.1.2. Les sources générateurs des ERO au niveau vasculaires	11
I.1.3. La caractérisation structurale et fonctionnelle des NADPH oxydases vasculaires	14
I.1.4. La distribution des NADPH oxydases dans la paroi vasculaire	19
I.1.5. La régulation de l'expression et de l'activité des NADPH oxydases au niveau vasculaire	23
I.1.6. Méthodes d'inhibition de l'activité des NADPH oxydases pour réduire le stress oxydatif	27
I.2. Chapitre 2 - L'apolipoprotéine E – rôle et implications dans l'athérosclérose	33
I.2.1. La caractérisation structurale et fonctionnelle d'apoE	34
I.2.2. Le rôle d'apoE dans le métabolisme des lipoprotéines	41
I.2.3. Le rôle d'apoE dans l'athérosclérose	43
I.2.4. Modèles expérimentaux murins pour l'étude d'apoE	48
II. PARTIE II – Contributions originales	55
Hypothèses et objectives	56
II.1. Objectif I – Réduire le stress oxydatif dans l'athérosclérose en inhibant l'activité de la NADPH oxydase	58
II.1.1. Introduction	58
II.1.2. Matériaux et méthodes	59
II.1.3. Résultats et discussions	69
II.1.3.1. L'évaluation du stress oxydatif et de l'inflammation dans la paroi vasculaire des souris hypercholestérolémiques	69

II.1.3.2. L'effet de l'administration de la tyrphostine AG490 sur l'expression et l'activité de la NADPH oxydase dans l'aorte des souris ApoE ^{-/-} hypercholestérolémiques	76
II.1.3.3. L'effet du WP1066 sur l'expression et l'activité de la NADPH oxydase dans l'aorte des souris ApoE ^{-/-} hypercholestérolémiques	86
II.1.4. Conclusions et perspectives	90
II.2. Objectif 2 – Élaborer des stratégies pour augmenter l'expression de l'apolipoprotéine E dans des cellules impliquées dans la plaque	93
II.2.1. L'Étude de la modulation par les rétinoïdes de l'expression du gène d'apolipoprotéine E dans les macrophages	94
II.2.1.1. Introduction	94
II.2.1.2. Matériaux et méthodes	95
II.2.1.3. Résultats et discussions	101
II.2.1.4. Conclusions et perspectives	105
II.2.2. Génération d'un modèle murin transgénique de type conditionnel, dans lequel on puisse induire d'une manière contrôlé l'expression de l'isoforme E3 d'apoE humaine, spécifiquement dans l'endothélium vasculaire	106
II.2.2.1. Introduction	106
II.2.2.2. Matériaux et méthodes	110
II.2.2.3. Résultats et discussions	137
II.2.2.4. Conclusions et perspectives	160
C. CONCLUSIONS GENERALES	161
D. BIBLIOGRAPHIE	164
E. LISTE DES ARTICLES SCIENTIFIQUES PUBLIES	176

MOTS CLÉS : maladies cardio-vasculaires, athérosclérose, stress oxydatif, NADPH oxydases, AG490, WP1066, souris déficientes en ApoE, apolipoprotéine E, macrophages, rétinoïdes, transgénèse, thérapies alternatives

RESUME

L'athérosclérose est une maladie complexe, caractérisé par l'accumulation des dépôts de lipides dans la paroi artérielle, qui évoluent pour former des plaques avancées, avec une architecture et composition cellulaire et moléculaire complexes, qui interrompent l'écoulement normal du sang et peuvent conduire, suite à l'érosion ou à la rupture, à des syndromes coronariens aigus tels que l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral.

Avec le temps, des nombreuses théories ont été proposées pour expliquer la formation de plaques d'athérosclérose. Aujourd'hui, le lien de causalité entre l'hypercholestérolémie, le développement des lésions athérosclérotiques et les maladies cardiovasculaires, est universellement éprouvé et accepté. Cependant, la soi-disant «l'hypothèse de cholestérol» ne peut pas strictement illustrer la complexité de la pathologie de l'athérosclérose, qui comprend, entre autres, l'activation et le dysfonctionnement des cellules endothéliales (CE), aussi que l'inflammation qui joue un rôle dans toutes les étapes de la lésion (« l'hypothèse de la réponse à la lésion »), la rétention de lipoprotéines athérogènes dans l'espace sous-endothélial (« l'hypothèse de la réponse à la rétention») et leurs modifications oxydatives («hypothèse des modification oxydative»).

De plus, la multitude de données scientifiques accumulées à ce jour montre que l'athérosclérose est une maladie multifactorielle et qu'à son développement contribue aussi un certain nombre d'autres facteurs de risque tels que l'hypertension, l'hyperglycémie et le diabète sucré, l'obésité, le tabagisme et les antécédents familiaux.

Les approches utilisées actuellement dans le traitement de l'athérosclérose sont principalement dirigées vers la régulation du métabolisme du cholestérol et du métabolisme des lipoprotéines, la réduction de l'inflammation ou la prévention des complications thrombotiques. Cependant, ces thérapies ne fonctionnent pas chez tous les patients. Par conséquent, afin d'augmenter l'efficacité du traitement il est nécessaire de trouver des méthodes thérapeutiques alternatives.

Les différentes stratégies thérapeutiques utilisées jusqu'à présent pour lutter contre le stress oxydatif se sont appuyées principalement sur l'utilisation des

antioxydants sous forme des suppléments et des vitamines, ou ont essayé de trouver des inhibiteurs sélectifs de différentes sources enzymatiques d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Bien que prometteur au début, le traitement antioxydant n'a pas produit les résultats escomptés dans plusieurs essais cliniques randomisés, parce que ces composés agissent seulement comme pièges pour ERO et pas comme médiateurs des réactions de signalisation redox intracellulaires qui ont lieux dans la paroi vasculaire.

En raison de leur contribution importante à la génération des ERO et de leur implication dans la médiation de signaux induits par divers facteurs de risque cardio-vasculaires, l'inhibition pharmacologique des enzymes NADPH oxydases (Nox) vasculaires est considéré comme une stratégie potentiellement attrayante et efficace pour lutter contre le stress oxydatif associé à divers conditions pathologiques.

Comme alternative à l'inhibition directe des NADPH oxydases, on peut considérer comme options efficaces les effets pléiotropes des médicaments classiques utilisés dans les maladies cardio-vasculaires (par exemple, les statines, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II, les thiazolidinediones) ou cibler des voies de signalisation spécifiques impliqués dans la régulation de l'expression et de l'activité des NADPH oxydases.

Par conséquent, le premier objectif de cette thèse est *«Réduire le stress oxydatif dans l'athérosclérose en inhibant l'activité de la NADPH oxydase »*.

D'autre part, un processus profondément perturbé en athérosclérose est l'efflux des particules de lipoprotéines de l'espace sous-endothéliale et des cellules spumeuses formées dans les lésions athérosclérotiques. Une approche possible pour améliorer ce problème est *d'augmenter l'expression des certaines protéines impliquées dans le processus et qui ont une action bénéfique en athérosclérose, telle que l'apolipoprotéine E*.

Par conséquent, le deuxième objectif de cette thèse est *«Élaborer des stratégies pour augmenter l'expression de l'apolipoprotéine E dans des cellules impliquées dans la plaque »*.

La thèse est structurée en deux parties principales et un chapitre de conclusions générales.

PARTIE I - L'état actuel des connaissances, est un examen des données de la littérature sur les deux protéines étudiées et leur implication dans l'athérosclérose. La première partie comporte deux chapitres.

Chapitre 1 - Les NADPH oxydases – promoteurs de stress oxydatif dans l'athérosclérose, présente des données de la littérature sur: les changements induites par le stress oxydatif dans l'athérosclérose ; les sources générateurs des ERO au niveau vasculaires ; la caractérisation structurale et fonctionnelle des NADPH oxydases vasculaires ; la distribution des NADPH oxydases dans la paroi vasculaire ; la régulation de l'expression et de l'activité des NADPH oxydases au niveau vasculaire, et des méthodes d'inhibition de l'activité des NADPH oxydases pour réduire le stress oxydatif.

Chapitre 2 - L'apolipoprotéine E –rôle et implications dans l'athérosclérose, présente des données de la littérature concernant : la caractérisation structurale et fonctionnelle du gène et de la protéine apoE, les isoformes d'apoE, les récepteurs pour apoE ; le rôle d'apoE dans le métabolisme des lipoprotéines ; le rôle d'apoE dans l'athérosclérose; les caractéristiques de l'expression et de la sécrétion d'apoE par les macrophages, et des modèles expérimentaux murins pour l'étude d'apoE.

PARTIE II - Les contributions originales, réunisse les données expérimentales qui répondent à deux objectifs principaux.

Objectif I - Réduire le stress oxydatif dans l'athérosclérose en inhibant l'activité de la NADPH oxydase, visait à étudier le potentiel que deux inhibiteurs pharmacologiques de la voie de signalisation Jak2, AG490 et WP1066, l'ont de réduire les ERO générées par les NADPH oxydases et de réduire le développement des lésions athérosclérotiques dans souris déficientes en ApoE (ApoE^{-/-}) hypercholestérolémiques.

1. *L'évaluation du stress oxydatif et de l'inflammation dans la paroi vasculaire des souris hypercholestérolémiques.* Les expériences ont montré que l'hypercholestérolémie est associée à une augmentation du stress oxydatif et de l'inflammation dans les aortes des souris hypercholestérolémiques. Cela est démontré par une augmentation significative des niveaux d'expression génique et protéique de toutes les isoformes Nox, trait qui caractérise les premières étapes aussi que les stades plus avancés de l'athérosclérose. Cette augmentation se traduit par une production soutenue d'ERO dans la paroi vasculaire.

2. *L'effet de l'administration de tyrphostine AG490 sur l'expression et l'activité de la NADPH oxydase dans l'aorte des souris ApoE^{-/-} hypercholestérolémiques.* Les expériences ont montré que le traitement avec AG490 des souris ApoE^{-/-} nourries avec une diète riche en cholestérol a réduit considérablement l'activité des Nox et a déterminé la diminution des niveaux d'expression de l'ARNm et de protéines pour chaque isoforme Nox. Aussi, l'administration de AG490 à des souris ApoE^{-/-} hypercholestérolémiques a induit une réduction significative de l'infiltration des macrophages dans la paroi de l'aorte par rapport à des animaux injectés avec le véhicule. En accord avec cette observation, l'analyse morphométrique des lésions a montré une réduction significative des lésions naissantes dans les aortes entières et dans l'arche aortique des animaux traitées avec AG490 par rapport aux souris ApoE^{-/-} nourries avec un régime riche en cholestérol.

3. *L'effet du WP1066 sur l'expression et l'activité de la NADPH oxydase dans l'aorte des souris ApoE^{-/-} hypercholestérolémiques.* Les résultats ont montré que le traitement avec WP1066 réduit de manière significative l'activité des NOX et les niveaux d'expression d'ARNm des isoformes Nox1 et Nox4. De plus, l'inhibition pharmacologique de Jak2 par WP1066 a réduit légèrement la zone d'expansion des lésions athérosclérotiques, mais pas de façon significative.

Les résultats obtenus dans les expériences réalisées pour l'Objectif 1 représentent la première étude à démontrer qu'AG490 a des propriétés anti-athérosclérotiques et anti-oxydantes *in vivo* par le contrôle des enzymes Nox, mettant en évidence un nouveau mécanisme d'action des tyrphostines au niveau du système cardio-vasculaire. Ensemble, ces résultats suggèrent que la modulation des voies de signalisation activées par Jak peut représenter une nouvelle stratégie pharmacologique pour contrer les effets néfastes du stress oxydatif dans l'athérosclérose.

Objectif 2 - Élaborer des stratégies pour augmenter l'expression de l'apolipoprotéine E dans des cellules impliquées dans la plaque, était de trouver des moyens pour augmenter ou pour induire l'expression d'apoE dans la paroi artérielle. Pour cela, des expériences ont été portées sur deux types cellulaires impliqués dans le développement et la progression des lésions athérosclérotiques, à savoir les macrophages et les CE.

1. *L'Étude de la modulation par les rétinoïdes de l'expression du gène d'apolipoprotéine E dans les macrophages.* L'expression sélective d'apoE dans les macrophages a le potentiel de réduire le risque cardio-vasculaire. Le ciblage de l'expression et de la sécrétion d'apoE dans les macrophages, permet d'une part, d'étudier le rôle de l'apoE sécrétée par ces cellules dans l'économie de la plaque, et d'autre part peut être une stratégie thérapeutique dans l'athérosclérose. Cette étude visait à déterminer s'il existe un effet direct des rétinoïdes sur l'expression du gène apoE dans les macrophages et d'étudier le mécanisme impliqué. Les résultats démontrent que les rétinoïdes induisent l'augmentation de l'expression endogène du gène apoE dans les macrophages, à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, l'acide 9 -cis- rétinoïque induit la croissance du niveau de l'ARNm de l'apoE dans la lignée de macrophages murins RAW 264.7 et la vitamine A augmente l'expression du gène de l'apoE dans les macrophages péritonéaux de souris. L'acide 9 -cis- rétinoïque n'agit pas directement sur le promoteur du gène mais sur le multi-enhancer ME.2, en induisant une augmentation significative de l'activité du promoteur, augmentation mise en évidence par l'augmentation de l'activité de la luciférase dans des expériences de transfection. L'analyse d'une série de mutants de délétion de ME.2 indique l'existence d'un site reconnu par RXR dans la région 405-420 de ME.2. L'augmentation de l'expression d'apoE dans les macrophages est un nouveau effet bénéfique potentiel de rétinoïdes, ce qui suggère que ces composés peuvent avoir un usage thérapeutique pour la régulation du métabolisme lipidique et dans la prévention et / ou l'amélioration de l'athérosclérose.

2. *Génération d'un modèle murin transgénique de type conditionnel, dans lequel on puisse induire d'une manière contrôlée l'expression de l'isoforme E3 d'apoE humaine, spécifiquement dans l'endothélium vasculaire.* CE n'expriment pas apoE mais expriment des récepteurs de la famille LDLR qui reconnaissent et lient apoE. En outre, elles sont capables de faire de la transcytose, le transport des macromolécules entre le sang et l'espace sous-endothélial. Compte tenu de ces caractéristiques fonctionnelles des CE, l'induction de l'expression du gène d'apoE dans l'endothélium peut contribuer d'une part à l'augmentation des niveaux plasmatiques d'apoE, ce qui augmente ses effets bénéfiques sur le plan systémique, et d'autre part, à l'augmentation de la concentration

d'apoE dans la plaque, où elle pourrait participer activement à l'efflux des lipoprotéines de l'espace sous-endothélial.

Le principe qui a conduit à la génération de ce modèle est celui de la transactivation de la transcription dépendante de la tétracycline. Dans les expériences rapportées dans le présent document, nous avons utilisé le système l'expression binaire Tet-On 3G (Clontech) pour produire deux transgènes :

(i) le transgène Tek/Tie2promoter-Tet3G-Tek/Tie2enhancer (dénommé Tek Tet3G) (5200pb) contenant le gène de la protéine transactivatrice Tet-On3G sous le contrôle du promoteur spécifique endothélial Tek/Tie2 qui assure une expression spécifique dans l'endothélium. Le transgène contient aussi l'enhancer spécifique endothélial Tek/Tie2 qui régulent l'activité du promoteur assurant une expression soutenue.

(ii) le transgène TRE-hapoE3 (5523pb) contenant le gène d'intérêt ApoE3 humaine sous le contrôle du promoteur inducible P_{TRE3G} .

En présence de l'inducteur doxycycline (Dox), un dérivé synthétique de la tétracycline, Tet-On 3G se lie spécifiquement à P_{TRE3G} et active la transcription du gène d'intérêt. P_{TRE3G} ne contient pas de sites de liaison pour des facteurs de transcription endogènes des mammifères, de sorte qu'il est essentiellement inactif en l'absence d'inducteur Dox.

Chacun des deux transgènes a été utilisé pour créer un animal transgénique : une souris qui porte le transgène Tek-Tet3G, et une souris qui portent le transgène TRE-hapoE3. En croisant les deux animaux, on va obtenir une souris double transgénique qui aura les deux transgènes et qui exprimera l'isoforme ApoE3 humaine seulement lorsque le traitement avec Dox sera administré.

Pour obtenir l'expression de l'isoforme ApoE3 humaine en l'absence du gène apoE murine endogène, les souris double transgéniques seront accouplées avec des souris déficientes en ApoE ($ApoE^{-/-}$).

Dans cette thèse, sont présentées les trois premières étapes nécessaires pour l'obtention de ce modèle, à savoir :

A. Obtenir les transgènes – on a utilisé des techniques classiques de clonage moléculaire (transformation bactérienne, digestion avec des enzymes de restriction, déphosphorylation, ligation). Dans la présente étude, on a obtenu avec succès les

transgènes nécessaires pour générer le modèle murin transgénique de type conditionnel, dans lequel on puisse induire d'une manière contrôlée l'expression de l'isoforme E3 d'apoE humaine, en l'absence du gène apoE murine endogène. La fonctionnalité des cassettes de transgénèse a été montrée par les résultats obtenus après la transfection de plusieurs types de cellules avec des plasmides contenant les transgènes, suivie par la culture des cellules dans un milieu supplémenté avec ou sans Dox. La fonctionnalité et de la spécificité du promoteur endothélial Tek/Tie2 a également été démontrée par la mesure de sa capacité d'activer la transcription du gène de la luciférase spécifiquement dans des cellules endothéliales.

B. La transgénèse - procédure à suivre pour le transfert de transgènes dans l'animal. La méthode utilisée dans cette étude pour obtenir des animaux transgéniques a été la méthode classique de transgénèse impliquant la micro-injection pronucléaire de l'ADN.

Pour la procédure de transgénèse nous avons utilisé quatre types d'animaux : des femelles donateurs d'œufs fécondés ; des mâles fertiles pour obtenir des œufs fécondés ; des femelles utilisées comme mères porteuses pseudo-gestantes ; des mâles vasectomisés utilisés pour obtenir les femelles pseudo-gestantes. La procédure de transgénèse a impliqué : la collection d'œufs fécondés après l'induction de la superovulation avec des hormones placentaires dans des femelles FVB donateurs ; le transfert de l'ADN (deux transgènes linéarisés et purifiés) a été fait par micro-injection dans le pronucleus mâle d'un ovule fécondé. Le volume de solution d'ADN qui a été injecté a été de l'ordre des picolitres, et la concentration de l'ADN utilisée a varié de 1 à 5ng/μl ; la réimplantation des œufs viables dans des femelles B6CBAF1 pseudo-gestantes. Des mâles B6CBA ont été utilisés afin d'obtenir des mâles vasectomisés.

Dans la thèse on a réalisé trois procédures de transgénèse - deux pour le transgène TRE-hapoE3 et une pour le transgène de Tek-Tet On.

C. Identification des fondateurs – le génotypage par PCR des progénitures de la première génération et l'identification des animaux positifs pour les transgènes d'intérêt. Dans les expériences de transgénèse on a réussi d'obtenir un fondateur qui sera utilisé pour créer une lignée des souris transgéniques pour TRE-hapoE3 qui peut être utilisée pour obtenir des souris double transgéniques exprimant l'ApoE3 humaine à la suite de l'induction par Dox .

CONCLUSIONS GENERALES. Cette thèse aborde un sujet d'actualité dans le domaine des sciences biomédicales, à savoir la recherche des nouvelles méthodes de prévention et de ralentir le processus d'athérosclérose.

La thèse propose une nouvelle stratégie pour cibler l'activité de la NADPH oxydase pour améliorer la production des ERO vasculaires dans des conditions d'hypercholestérolémie. Les résultats ont montré qu'une telle approche, dans ce cas, le ciblage des voies de signalisation qui contrôlent la fonction de la NADPH oxydase, fournit une thérapie valable. Plus précisément, la modulation des voies de signalisation activées par Jak peut représenter une nouvelle stratégie pharmacologique pour contrer les effets nuisibles du stress oxydatif dans l'athérosclérose.

Le document propose également deux stratégies pour investiguer la manière dont on peut moduler l'efflux des particules de lipoprotéines accumulées dans les cellules spumeuses dans la plaque et dans l'espace sous-endothélial, en augmentant l'expression de la protéine apoE, dont les fonctions anti-athérogènes sont bien connues. La première stratégie identifie les rétinoïdes et la vitamine A comme médiateurs de l'expression du gène de l'apolipoprotéine E dans les macrophages, et montre que ces composés peuvent induire une expression accrue du gène apoE endogène dans les macrophages à la fois *in vitro* et *in vivo*. Les résultats suggèrent que ces composés peuvent avoir un usage thérapeutique pour la régulation du métabolisme lipidique et dans la prévention et / ou l'amélioration de l'athérosclérose.

La seconde stratégie fait référence à l'induction de l'expression du gène de l'apoE dans les cellules endothéliales, et propose la génération d'un modèle murin transgénique de type conditionnel, dans lequel on puisse induire d'une manière contrôlée l'expression de l'isoforme E3 d'apoE humaine, en l'absence de gène apoE murine endogène. Dans la présente étude on a parcouru les trois premières étapes de l'élaboration d'un tel modèle, et on a obtenu et testé avec succès les transgènes nécessaires. Dans les expériences de transgénèse a réussi à obtenir un fondateur qui sera utilisé pour fonder une lignée de souris transgéniques pour TRE- hapoE3 qui peut être utilisée pour obtenir des souris double transgéniques exprimant l'ApoE3 humain induite par Dox. La création de ce modèle permettra l'investigation de la fonction d'apoE dans l'athérosclérose et la façon dont une augmentation de la concentration de

cette protéine dans la plaque, aussi que dans la circulation, peut améliorer le processus pathologique.