



Université Claude Bernard



## DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **6 avril 2018**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **ROSZKOWSKA Monika**

Titre de la thèse : « Mécanismes moléculaires de la trans-différenciation des cellules musculaires lisses et calcification dans l'athérosclérose »



### Résumé

En conditions physiologiques, la formation de cristaux de phosphate de calcium est restreinte au squelette. D'autre part, plusieurs conditions pathologiques, en particulier associées au vieillissement, sont associées à des calcifications ectopiques, qui peuvent affecter les tissus vasculaires. Les calcifications vasculaires ont un fort impact sur la structure et les propriétés des artères affectées. Chez les patients atteints d'athérosclérose, les calcifications vasculaires sont une caractéristique des plaques d'athérome. La calcification de la plaque d'athérosclérose varie de microcalcifications diffuses à des macrocalcifications formées par un processus ressemblant à une ossification endochondrale, qui fait intervenir un tissu intermédiaire cartilagineux. Très probablement, ces macrocalcifications résultent de la trans-différenciation des cellules musculaires lisses (CMLs) en cellules de type ostéoblastique et/ou chondrocytaire. Alors que les macrocalcifications semblent stabiliser la plaque, les microcalcifications sont très probablement nuisibles. Le fait que les microcalcifications précoces ont été rapportées comme étant des structures particulièrement dangereuses pour la stabilité de la plaque, la résolution des mécanismes responsables de leur formation nécessite une attention particulière.

En outre, il n'existe pas aujourd'hui de thérapie permettant de freiner significativement le développement des calcifications vasculaires. Nous nous intéressons particulièrement au rôle de la phosphatase alcaline non spécifique du tissu (TNAP) dans la calcification vasculaire, puisqu'il s'agit de la seule enzyme connue à ce jour pour être absolument nécessaire à la minéralisation physiologique. L'absence d'origine génétique d'activité TNAP cause l'hypophosphatasie, qui dans les cas sévères, se manifeste en effet par la mort *in utero* de fœtus complètement dépourvus de cristaux osseux. Il a été montré que la TNAP induit la minéralisation tissulaire en hydrolysant un inhibiteur constitutif de la minéralisation, le pyrophosphate inorganique (PP<sub>i</sub>). Il est probable que la phosphatase alcaline doive être ancrée à la membrane plasmique par son ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) pour être pleinement active.

Des découvertes récentes suggèrent que la TNAP peut être activée dans les CMLs par les cytokines pro-inflammatoires, le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine 1 bêta (IL-1 $\beta$ ). Des travaux précédents de l'équipe ont montré que l'ajout de phosphatase alcaline ou la surexpression de TNAP dans les CMLs suffit à stimuler l'accumulation de calcium de façon significative. A la lumière de ces résultats, nous avons émis l'hypothèse que la TNAP induite dans les CMLs en conditions inflammatoires, suffit à induire la minéralisation et la trans-différenciation des CMLs. Nos objectifs étaient donc de déterminer l'effet de la TNAP dans la trans-différenciation des CMLs, et d'étudier les mécanismes impliqués dans son induction.

Nous avons observé par PCR quantitative que l'ajout de phosphatase alcaline purifiée dans les CMLs de souris MOVAS, en l'absence de donneurs de phosphate, augmente les niveaux de transcrits de marqueurs chondrocytaires et ostéoblastiques, tels que l'agrécan et l'ostéocalcine, mais aussi de la protéine morphogénétique osseuse BMP-2. L'agrécan est le protéoglycane le plus abondant dans le cartilage et un marqueur précoce de la différenciation des chondrocytes. L'ostéocalcine est une protéine carboxylée abondante associée aux cristaux osseux, et est un marqueur de la différenciation des ostéoblastes et des chondrocytes hypertrophiques. Puisque l'ostéocalcine peut être exprimée par les ostéoblastes et les chondrocytes, nous avons mesuré l'expression du facteur de transcription plus spécifique des ostéoblastes, osterix, qui n'augmentait pas mais diminuait en présence de phosphatase alcaline exogène, suggérant que les CMLs ont trans-différencié en chondrocytes et non en ostéoblastes.

Cependant, notre résultat le plus intéressant est probablement que le traitement des CMLs par des cristaux seuls ou associés à une matrice collagénique a reproduit les effets de la TNAP. La culture de cellules MOVAS en présence de cristaux de phosphate de calcium, ou sur une matrice de collagène de type I, a en effet permis de mesurer une augmentation significative de l'expression de l'aggrécan et de BMP-2, qui est un facteur de croissance ostéogénique puissant.

Nous suspectons que la TNAP agit en hydrolysant le pyrophosphate inorganique (PP<sub>i</sub>) et en générant des cristaux d'apatite. Ces cristaux ensuite induisent l'expression du facteur ostéogénique BMP-2 qui stimule la trans-différenciation des CMLs. Nous avons en effet observé que et l'inhibition des effets de la BMP-2 par ajout de Noggin annule les effets de la TNAP. Ces résultats suggèrent que l'induction de la TNAP en conditions inflammatoires pourrait suffire à induire des microcalcifications.

L'inflammation et l'IL-1 $\beta$  en particulier jouent des rôles importants dans le développement de l'athérosclérose. L'IL-1 $\beta$  est sécrétée par les cellules par un mécanisme qui nécessite l'activation de l'inflammasome NLRP3. Plusieurs structures cristallines sont connues pour activer l'inflammasome. Il est donc possible que les cristaux d'apatite puissent produire leurs effets par activation de l'inflammasome NLRP-3 et sécrétion de l'IL-1 $\beta$ . Ce mécanisme est au centre des derniers travaux du laboratoire.

De plus, nous étions intéressés par les mécanismes gouvernant la localisation et la fonction de la TNAP avec un intérêt particulier pour les annexines. Nous avons tout d'abord localisé la TNAP à la membrane des CMLs cultivées dans les conditions de minéralisation. Nous avons ensuite observé que l'activité TNAP des CMLs induit la minéralisation sans doute en grande partie quand la TNAP est associée aux vésicules matricielles et aux fibres de collagène. Donc, de la même manière que dans le cas des cellules minéralisantes classiques, l'association avec le collagène semble importante pour l'activité de TNAP dans les vésicules matricielles des CMLs et la minéralisation.

Dans les plaques d'athérosclérose, la localisation précise des microcalcifications et leur association possible avec le collagène sont des questions qui sont encore discutées. Cependant, il semble que la quantité de collagène est un facteur critique pour la stabilité de la plaque. Les lésions athérosclérotiques vulnérables contiennent généralement un bouchon fibreux mince et pauvre en collagène. Certains résultats suggèrent que les microcalcifications sont particulièrement dangereuses lorsqu'elles sont situées dans un tel bouchon fibreux.

Sur la base de nos observations, nous proposons un mécanisme de stimulation par la TNAP de la calcification des plaques d'athérosclérose. Nos résultats sont cohérents avec le modèle récemment proposé par Chatrou et ses collaborateurs (Chatrou *et al.*, Plos One, 2015). Ils ont observé que des microcalcifications étaient présentes avant les "ostéochondrocytes" dans les plaques athérosclérotiques humaines et ont émis l'hypothèse qu'ils sont la cause et non la conséquence de la trans-différenciation des CMLs. En outre, nous proposons que l'activation de la TNAP par des cytokines inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  dans les CMLs, l'hydrolyse subséquente de PP<sub>i</sub> et la génération de cristaux d'apatite est un mécanisme central lors de la formation de microcalcifications. Nos résultats suggèrent que les cristaux stimulent la BMP-2 qui peut initier la trans-différenciation des CMLs.

En résumé, nos expériences déjà effectuées, et celles en cours, permettront de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'expression et la fonction de la TNAP dans les artères affectées. D'un point de vue thérapeutique, ces études font de la TNAP une cible prometteuse pour inhiber la formation de microcalcifications.

**Mots-clé:** cellule musculaire lisse, phosphatase alcaline, calcification vasculaire, chondrocyte.