



HAL
open science

Rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'athérosclérose et le diabète de type 2

Amna Abderrazak

► To cite this version:

Amna Abderrazak. Rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'athérosclérose et le diabète de type 2. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI; Institut supérieur de biotechnologie (Monastir, Tunisie), 2015. Français. NNT : 2015PA066735 . tel-01630298

HAL Id: tel-01630298

<https://theses.hal.science/tel-01630298>

Submitted on 7 Nov 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
Spécialité Physiologie et Physiopathologie

UMR-8256/INSERM ERL U-1164, Adaptation Biologique et Vieillesse

&

L'INSTITUT SUPÉRIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR
Spécialité Sciences Biologiques et Biotechnologie

UR : 12ES09, Dyslipoprotéïnémie et Athérosclérose

Présentée par

Mme Abderrazak Epouse Mhenni Amna

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

&

DOCTEUR de L'INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR

ROLE DE L'INFLAMMASOME NLRP3

DANS L'ATHEROSCLEROSE & LE DIABETE DE TYPE 2

Soutenue le : 21 Septembre 2015

Devant le jury composé de :

Pr. SAAD Ali

Dr. NEGRE SALVAYRE Anne

Pr. HELAL Ahmed Nouredine

Pr. RAYMONDJEAN Michel

Dr. EL HADRI Khadija

Pr. SLIMANE Mohamed Naceur

Dr. ROUIS Mustapha

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Membre invité

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
Spécialité Physiologie et Physiopathologie
UMR-8256/INSERM ERL U-1164, Adaptation Biologique et Vieillessement

&

L'INSTITUT SUPÉRIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR
Spécialité Sciences Biologiques et Biotechnologie
UR : 12ES09, Dyslipoprotéïnémie et Athérosclérose

Présentée par
Mme Abderrazak Epouse Mhenni Amna

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
&
DOCTEUR de L'INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR

ROLE DE L'INFLAMMASOME NLRP3

DANS L'ATHEROSCLEROSE & LE DIABETE DE TYPE 2

Soutenue le : 21 Septembre 2015

Devant le jury composé de :

Pr. SAAD Ali

Dr. NEGRE SALVAYRE Anne

Pr. HELAL Ahmed Nouredine

Pr. RAYMONDJEAN Michel

Dr. EL HADRI Khadija

Pr. SLIMANE Mohamed Naceur

Dr. ROUIS Mustapha

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

Membre invité



R

emerciements

A Mr le président du Jury,

Monsieur SAAD Ali,

Professeur de cytogénétique et biologie de la reproduction,

Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ma thèse.

Soyez assuré de mon profond respect et de ma reconnaissance.

A Madame NEGRE SALVAYRE Anne,

Docteur CNRS,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse. J'en suis très honorée. Je vous prie de trouver ici l'expression de ma respectueuse gratitude.

A Monsieur HELAL Ahmed Nouredine,

Professeur de biologie cellulaire,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

A Monsieur RAYMONDJEAN Michel,

Professeur Emérite,

Vous m'avez fait le grand plaisir d'accepter d'être examinateur et membre du jury de ma thèse. Par la présente, je vous assure de mon profond respect et de ma profonde gratitude. Je n'oublierai jamais votre soutien, vos encouragements et la bonne humeur que vous diffusiez dans notre laboratoire à chaque fois que vous veniez demander de mes nouvelles. Vous voir dans notre laboratoire me faisait chaud au coeur, un GRAND MERCI.

A Madame EL HADRI Khadija,

Maître de Conférence,

Vous m'avez fait l'honneur de superviser ce travail. Merci beaucoup pour votre implication, votre disponibilité et votre sympathie. Merci pour tous les efforts que vous avez fournis pour la réalisation de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

A Monsieur SLIMANE Mohamed Naceur,

Professeur de Biochimie,

Vous m'avez fait l'honneur de superviser ce travail. Merci de m'avoir offert la chance de passer ma thèse en cotutelle, merci beaucoup. Merci pour tous les efforts que vous avez fournis pour la réalisation de cette thèse.

J'aimerais remercier mes deux directeurs de thèse d'avoir été un soutien dans les épreuves difficiles traversées durant mon doctorat.

A Monsieur ROUIS Mustapha,

Docteur INSERM,

Tout d'abord, je vous remercie de m'avoir donné l'opportunité de passer ma thèse au sein de votre unité de recherche malgré les obstacles et les difficultés administratives rencontrés.

Vous avez veillé d'un oeil bienveillant à ce que ma thèse se déroule dans les meilleures conditions. Je vous remercie de m'avoir encadrée du début à la fin, formée techniquement comme scientifiquement. Un GRAND MERCI pour votre gentillesse, votre aide, votre disponibilité, votre efficacité et surtout pour votre compréhension. Merci pour tous les efforts que vous avez fournis pour mener à bien cette thèse. Vous avez

toujours été un soutien dans les épreuves difficiles traversées durant mon doctorat. Je vous en suis vraiment reconnaissante, MERCI!!!

A Madame COUCHIE Dominique,

Docteur INSERM,

Je tiens à t'adresser mes plus sincères remerciements pour ton aide, ton encadrement technique et scientifique, tes compliments et ton encouragement inoubliable. Tu étais tout le temps à côté de moi avec ta gentillesse, ton sourire, ton calme et ta sympathie. Je n'oublierai jamais ton soutien de chaque instant. Un soutien qui a beaucoup compté et a bien contribué à l'avancement de mes travaux de recherche. Je n'oublierai jamais les soirs et les nuits que nous avons passés ensemble au sein de notre laboratoire au détriment de ta vie personnelle. UN GRAND MERCI pour tout ce que tu as fait pour moi, tout simplement tu es magnifique. Je suis très honorée d'avoir travaillé avec toi au sein du même laboratoire. Sois assurée de mon profond respect, de ma reconnaissance et de ma profonde gratitude.

A Madame DIDEROT Vimala,

Assistante Ingénieur,

Je te remercie infiniment de m'avoir accueillie et formée techniquement durant ma première année de thèse. Tu étais également un soutien de tous les jours qui a participé à rendre si plaisant le quotidien de l'équipe par ta personnalité positive et ta bonne humeur qui remonte automatiquement le moral. Merci pour les moments partagés au travail ainsi qu'en dehors du laboratoire. Merci pour ta disponibilité, tes encouragements et ton aide qui ont beaucoup favorisé l'avancement de mes recherches. Sois assurée de l'expression de ma gratitude et de mon plus profond respect.

J'aimerais également remercier toutes les équipes de l'UMR 8256, en particulier les équipes de Mr Friguet Bertrand, de Mr Li Zhenlin et de Mme Limon Isabelle. Je remercie tous ceux qui ont participé à ma réussite et à la finalisation de cette thèse, plus particulièrement Mahmood Diler Faieeq, El Mhiri Ghada, Slimani Afef et Mhenni Soumaya.



Dédicaces

Je dédie cette thèse :

À mon père et à ma mère,

À mon amour éternel, mon mari,

À mon futur petit cœur, mon fils

&

À toute personne qui a fait un jour confiance en moi. . .



Sommaire

Remerciements.....	- 3 -
Dédicaces	- 8 -
Sommaire	- 10 -
Valorisation.....	- 18 -
Liste des abréviations.....	- 21 -
Liste des figures	- 26 -
Liste des tableaux.....	- 29 -
Résumé.....	- 31 -
Abstract.....	- 34 -
Synthèse bibliographique.....	- 36 -
CHAPITRE I.....	- 39 -
L'INFLAMMASOME NLRP3.....	- 39 -
I. L'INFLAMMASOME.....	- 39 -
1. AIM2	- 40 -
2. NLRP1	- 41 -
3. NLRC4.....	- 41 -
II. L'INFLAMMASOME NLRP3.....	- 43 -
1. Expression, structure et oligomérisation	- 43 -
a. Nlrp3.....	- 44 -
b. ASC	- 45 -
c. La caspase-1	- 45 -

2.	Activation de l'inflammasome NLRP3	46 -
a.	Le signal «1»	46 -
b.	Le signal «2»	46 -
3.	Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3	46 -
4.	Les maladies associées à l'activation de l'inflammasome NLRP3	49 -
CHAPITRE II		52 -
L'INFLAMMASOME NLRP3 & L'ATHEROSCLEROSE.....		52 -
I.	GENERALITES	52 -
1.	Définition.....	52 -
2.	Manifestations cliniques	52 -
3.	Epidémiologie.....	53 -
II.	PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ATHEROSCLEROSE : DE L'ARTERE SAINES A LA PLAQUE D'ATHEROME	53 -
1.	La paroi artérielle saine	53 -
a.	L'intima	54 -
b.	La média	54 -
c.	L'adventice	54 -
2.	Processus cellulaires et développement de plaque d'athérome	55 -
a.	Initiation.....	55 -
b.	Progression	58 -
3.	L'athérosclérose: rôle de l'inflammasome NLRP3	59 -
CHAPITRE III		62 -

L'INFLAMMASOME NLRP3 & LE DIABETE DE TYPE 2	62 -
I. GENERALITES	62 -
1. Définition.....	62 -
2. Manifestations cliniques	62 -
3. Epidémiologie.....	63 -
II. RAPPEL SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABETE DE TYPE 2.....	63 -
1. Inflammation des cellules β -pancréatiques.....	64 -
2. Apoptose des cellules pancréatiques	67 -
a. La glucotoxicité.....	67 -
b. La lipotoxicité.....	67 -
Matériels & Méthodes.....	71 -
I. L'ARGLABINE	73 -
1. Matière végétale et extraction.....	73 -
2. Séparation chromatographique	73 -
II. ETUDE <i>IN VITRO</i>	74 -
1. Culture cellulaire et conditions de culture.....	74 -
a. Macrophages péritonéaux de souris	74 -
b. La lignée de cellules β -pancréatique, INS-1.....	75 -
2. Culture des ilots de langerhans.....	76 -
a. Prélèvement	76 -
b. Mise en culture	76 -

3.	Test de viabilité cellulaire.....	- 76 -
4.	Dosage des cytokines pro-inflammatoires, ELISA	- 77 -
a.	Dosage de l'IL-1 β	- 77 -
b.	Dosage de l'IL-18.....	- 78 -
5.	Immuno-détection par Western blot	- 78 -
a.	Extraction et dosage de protéines	- 78 -
b.	Western blot.....	- 78 -
III.	ETUDE <i>IN VIVO</i>	- 80 -
1.	Modèles transgéniques	- 80 -
a.	Souris ApoE ₂ .Ki	- 80 -
b.	Souris NLRP3 ^{-/-}	- 81 -
c.	Souris ApoE ₂ .Ki/NLRP3 ^{-/-}	- 82 -
2.	Traitement des souris.....	- 83 -
3.	Caractérisation des lésions athéroscléreuses	- 84 -
a.	Dissection des souris	- 84 -
b.	Coloration histologique des aortes	- 84 -
c.	Inclusion du cœur de souris par congélation	- 84 -
d.	Coupes au cryostat.....	- 85 -
e.	Coloration à l'Hématoxyline/ Eosine (H&E)	- 85 -
f.	Histomorphométrie et évaluation quantitative des lésions	- 85 -
4.	Dosages sériques.....	- 86 -
a.	Dosage des cytokines.....	- 86 -
b.	Dosage des paramètres lipidiques.....	- 86 -

c.	Dosage des anticorps anti-LDL oxydées	88 -
d.	Dosage de la glycémie et de l'insulinémie	89 -
5.	Cytométrie de flux	89 -
IV.	ETUDE DE L'APOPTOSE DES CELLULES B-PANCREATIQUES.....	90 -
V.	ETUDE DE L'AUTOPHAGIE	91 -
VI.	ANALYSES STATISTIQUES	91 -
	Résultats	92 -
	CHAPITRE I.....	93 -
	IDENTIFICATION DE LA MOLECULE D'ARGLABINE.....	93 -
I.	L'ARGLABINE	93 -
II.	PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES	93 -
	CHAPITRE II	95 -
	EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES ET ANTI-ATHEROGENES DE LA MOLECULE D'ARGLABINE CHEZ DES SOURIS APOE ₂ .KI SUSCEPTIBLES A L'ATHEROSCLEROSE.....	95 -
I.	PUBLICATION.....	95 -
II.	RESULTATS DES ETUDES <i>IN VITRO</i>	95 -
1.	L'Arglabine : une molécule anti-inflammatoire	95 -
-	L'Arglabine inhibe l'expression de l'IL-1 β , de l'IL-18 et de la caspase-1 au niveau des macrophages péritonéaux de souris	95 -
2.	L'Arglabine : une molécule spécifique de l'inflammasome NLRP3	99 -
a.	Les cristaux de cholestérol, activateurs spécifiques de l'inflammasome NLRP3 ..	99 -

b.	L'Arglabine, une molécule spécifique de l'inflammasome NLRP3	- 100 -
3.	L'Arglabine : une molécule inductrice de l'autophagie	- 102 -
III.	RESULTATS DES ETUDES <i>IN VIVO</i>	- 104 -
1.	L'Arglabine : une molécule anti-inflammatoire qui induit l'expression de l'IL-10.....	- 104 -
2.	L'Arglabine : une molécule hypolipidémiante	- 106 -
3.	L'Arglabine : une molécule antioxydante	- 108 -
4.	L'Arglabine oriente les cellules immunitaires vers un phénotype anti-inflammatoire	- 110 -
a.	L'Arglabine réduit le nombre des monocytes Ly-6C ^{high} et augmente le nombre des monocytes Ly-6C ^{low}	- 110 -
b.	L'Arglabine oriente les macrophages lésionnels d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire	- 111 -
5.	L'Arglabine : une molécule athéro-protectrice	- 112 -
	CHAPITRE III	- 114 -
	EFFETS DE L'ARGLABINE SUR LE DEVELOPPEMENT DU DIABETE DE TYPE 2 CHEZ LES SOURIS APOE ₂ .KI.....	- 114 -
I.	PUBLICATION.....	- 114 -
II.	RESULTATS	- 114 -
1.	L'Arglabine : une molécule anti-inflammatoire	- 114 -
2.	L'Arglabine : une molécule normoglycémiante et normoinsulinémiante	- 115 -
3.	L'Arglabine : une molécule anti-apoptotique.....	- 117 -
III.	RESULTATS DES ETUDES <i>IN VITRO</i>	- 118 -

1. L'Arglabine augmente l'expression de Bcl-2 et réduit l'expression de Bax.....	- 118 -
2. L'Arglabine : une molécule anti-inflammatoire	- 119 -
3. L'Arglabine : une molécule inductrice d'autophagie	- 121 -
4. L'Arglabine et les voies de régulation de l'autophagie	- 122 -
Discussion	- 123 -
Conclusion	- 123 -
Perspectives.....	- 123 -
Bibliographie.....	- 123 -
Annexes.....	- 123 -



V alorisation

COMMUNICATION ORALE :

- ✚ **Abderrazak Amna et al.** *Anti-Inflammatory and anti-atherogenic effects of the inflammasome NLRP3 inhibitor, Argabin, in ApoE₂.Ki mice fed a High Fat Diet.* Nouvelle Société Francophone d'Athérosclérose, le 19 Juin 2014, Biarritz, France.

COMMUNICATIONS AFFICHÉES :

- ✚ **Abderrazak Amna, et al.** *L'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par l'Arglabine, réduit l'inflammation, protège les cellules β -pancréatiques de l'apoptose et inhibe le développement d'un diabète de type 2 chez les souris ApoE₂.Ki.* Forum Annuel Scientifique du DIM Biothérapies, le 24 Novembre 2014 à Paris, France.
- ✚ **Abderrazak Amna, et al.** *Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of the inflammasome NLRP3 inhibitor, Argabin, in ApoE₂.Ki mice fed a high fat diet.* Printemps de la Cardiologie, Recherche Fondamentale & Clinique, le 24 et 25 Avril 2014, Strasbourg, France.
- ✚ **Abderrazak Amna, et al.** *Inflammasome NLRP3 and atherosclerosis: Potential beneficial effect of inhibitory molecules.* 5th International Symposium Nutrition, Oxygen Biology and Medicine, le 5, 6 et 7 Juin 2013, Paris, France.

PUBLICATIONS :

- ✚ **Amna Abderrazak.,** Dominique Couchie., Dler Faieeq Darweesh Mahmood., Rima El Hage., Cécile Vindis., Muriel Laffargue., Véronique Matéo., Berthold Büchele., Monica Rubio Ayala., Menna El Gaafary., Tatiana Syrovets., Mohamed-Naceur Slimane., Bertrand Friguet., Tamas Fulop., Thomas Simmet., Khadija El Hadri and Mustapha Rouis. *Anti-inflammatory and anti-atherogenic effects of the inflammasome NLRP3 inhibitor, argabin, in ApoE₂.Ki mice fed a high fat diet.* **Circulation**, 2015. 131(12): 1061-70.
- ✚ **Amna Abderrazak.,** Dler Faieeq Darweesh Mahmood., Vimala Diderot., Mohamed-Naceur Slimane., Bertrand Friguet., Berthold Büchele., Thomas Simmet., Khadija El Hadri., Dominique Couchie and Mustapha Rouis. *Inhibition of inflammasome NLRP3 by argabin attenuates inflammation, protects pancreatic β -cells from apoptosis, and prevents type 2 diabetes mellitus development in ApoE₂.Ki mice on a chronic high-fat diet.* **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, en révision favorable.
- ✚ **Amna Abderrazak.,** Tatiana Syrovets., Dominique Couchie., Khadija El Hadri., Bertrand Friguet., Thomas Simmet and Mustapha Rouis. *NLRP3 Inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and in inflammatory diseases.* **Redox Biology**. 2015. 4: 296-307.
- ✚ Mahmood DFD, **Abderrazak, A.**, Couchie, D., Lunov O., Vimala D., Syrovets T., Slimane MN., Rouis M., Simmet T., and El Hadri K. *Truncated Thioredoxin (Trx-80) Promotes Pro-inflammatory Macrophages of the M1 Phenotype and Enhances Atherosclerosis.* **J Cell Physiol**. 2013. 228 (7): 1577-83.
- ✚ Mahmood DFD., **Abderrazak A.**, El Hadri K., Simmet T. and Rouis M. *The Thioredoxin System as a Therapeutic Target in Human Health and Disease.* Comprehensive Invited Review. **Antioxid Redox and Signalling**. 2013. 19 (11): 1266-303.

- ✚ Messaoud MH., Chouchane A., **Abderrazek E.**, Debbabi H., Zaouali-Ajina M., Tabka Z et Ben-Jebria A. *Obesity-induced impairment of endothelium-dependent vasodilation in Tunisian women.* **Int J Obes (Lond)**. 2010. 34 (2): 273-9.

CONCOURS ET BOURSE:

- ✚ Réussite d'un concours (concours sur dossier + épreuve orale) d'Allocation de Recherche de la Nouvelle Société Française d'Athérosclérose (NSFA) pour une bourse sous forme d'un CDD de l'année universitaire 2014-2015.

Liste des abréviations

- 3-MA: 3-Methyladenine
- Acétyl-CoA: Acétyl coenzyme A
- AIM2: Absent in melanoma 2
- *A. glabella*: *Artemisia glabella*
- ApoE₂.Ki: ApoE₂ Knock in
- ASC: Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain
- Atg7: Autophagy-related 7
- ATP: Adénosine triphosphate
- AVC: Accident vasculaire cérébral
- Avidine-HRP: Avidin Horseradish Peroxidase
- Bcl-2: B-cell lymphoma 2
- Becline 1: Bcl2-interacting protein
- BSA: Albumine sérique bovine
- CARD: Caspase recruitment domain
- CDK: cyclin-dependent kinases
- CINCA: Syndrome chronique infantile neurologique, cutané et articulaire
- CIP/KIP: Cdk-interacting protein/kinase inhibitory protein
- CMLV: Cellules musculaires lisses vasculaires
- CPPD: Pyrophosphate de calcium dihydraté
- CuSO₄: Sulfate de Cuivre
- Cyp7a1: 7- α hydroxylase DIO: Diet-induced obese mice
- DS-DNA: ADN double brin
- DT2: Diabète de type 2
- EBSS: Earle's Balanced Salt Solution
- FAD⁺: Flavine adénine dinucléotide
- FAS: Fas cell surface death receptor

- FCU: Urticaire familiale au froid
- FIIND: Function to find domain
- FITC: Fluorescéine isothiocyanate
- FMF: Fièvre méditerranéenne familiale
- GSH: Glutathion
- HDL: Lipoprotéines de haute densité
- HFD: High Fat Diet
- HIN200: Hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats
- HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
- HPLC: Chromatographie analytique en phase liquide à haute performance
- IAPP: Islet amyloid polypeptide
- ICAM-1: Intracellular adhesion molecule-1
- IDL: Lipoprotéines de densité intermédiaire
- IFN- γ : Interféron gamma
- IL-18: Interleukin-18
- IL-1 β : Interleukin-1 β
- IL-1Ra: Récepteur IL-1
- IRS-1: Insulin receptor substrate-1
- K [ATP]: Canaux potassiques sensibles à l'ATP
- Kinase IRAK-4: Interleukin-1 receptor-associated kinase 4
- Kinase MEKK3: MEK kinase 3
- Kinase TAK1: TGF- β - activated kinase 1
- LAL: limulus amoebocyte lysate
- LC3: chaîne légère 3 des protéines associées aux microtubules
- LDH: Lactate déshydrogénase
- LDL: Lipoprotéines de basse densité

- LDLox: LDL oxydées
- LDLR: LDL récepteur
- LeTx: Toxine létale
- LIPA: Lipase acide lysosomale
- LPS: lipopolysaccharide
- LRR: Leucine-rich repeat domain
- M-CSF: Monocyte-colony stimulating factor
- MAPK kinases: Mitogen activate protein kinase
- MCP-1: Monocyte chemoattractant protein-1
- MCV: Maladies cardiovasculaires
- mmLDL: Minimally modified-LDL
- MMP: Matrix metalloproteases
- MODY: Maturity onset diabetes of the young
- MTOR: Mechanistic Target of Rapamycin
- MWS: Syndrome de Muckle-Wells
- MyD88: Myeloid differentiation primary response gene
- NAD⁺: Nicotinamide-adénine-dinucléotide
- NAIP5: Neuronal apoptosis inhibitory protein 5
- Neo: Néomycine
- NFκB: Nuclear factor kappa B
- NK: Natural killer cells
- NLR: Nucleotide-binding-oligomerization-domain-(NOD-) like receptors
- NLRC4: NLR family CARD domain-containing protein 4
- NLRP1: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1
- NLRP3^{-/-}: NLRP3 Knock out
- NLRP3: NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
- NO: Monoxyde d'azote

- OMS: Organisation mondiale de la santé
- OPD: ortho-phenylenediamine dichloride
- PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1
- PAMPs: Pathogen-Associated Molecular Patterns
- PCSK9: Proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9
- PI3K : Phosphatidylinositide 3-kinase
- PKB: Protein kinase B
- PRR: Pattern-Recognition Receptor
- PYD: Pyrin effector domain
- PYHIN: Pyrin and HIN200 domain-containing protein family
- ROS: Espèces réactives oxygénées
- SD: écart-type
- SiO₂: Silice
- SN: Surnageant
- SRA: Scavenger receptor A
- SVF: Sérum de veau fœtal
- TK: Thymidine kinase
- TLR: Toll Like Receptor
- TMB: tétraméthylbenzidine
- TNF: Tumor necrosis factor
- TNFR: Tumour necrosis factor receptor
- Trx-1: Thioredoxin-1
- TXNIP: Thioredoxin Interacting Protein
- VATPase: Vacuolar-type H⁺ -ATPase
- VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1
- VLDL: Lipoprotéines de très basse densité
- WT: Wild type

Liste des figures

Figure 1. Structure schématique des inflammasomes NLRP1, NLRC4 et AIM2	- 40 -
Figure 2. Activation des inflammasomes NLRP1, NLRC4 et AIM2.....	- 42 -
Figure 3. Structure schématique et oligomérisation de l'inflammasome NLRP3	- 43 -
Figure 4. Effet de la structure de l'inflammasome NLRP3 sur la fonction des domaines PYD-	44 -
Figure 5. Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3.....	- 48 -
Figure 6. Quelques mutations associées au gène qui code pour la protéine Nlrp3.....	- 50 -
Figure 7. Structure de la paroi artérielle saine.....	- 55 -
Figure 8. Processus cellulaires et développement de l'athérosclérose	- 57 -
Figure 9. Développement de la plaque d'athérome avec l'âge (81).....	- 59 -
Figure 10. Activation de l'inflammasome NLRP3 au cours de l'athérosclérose	- 61 -
Figure 11. Activation de l'inflammasome NLRP3 au cours du diabète de type 2	- 66 -
Figure 12. <i>Artemisia glabella</i>	- 72 -
Figure 13. Représentation schématique des conditions de traitement des macrophages péritonéaux	- 75 -
Figure 14. Principe du test de viabilité cellulaire de la lactate déshydrogénase.....	- 77 -
Figure 15. Remplacement du gène ApoE de souris par le gène ApoE ₂ humain.....	- 81 -
Figure 16. Génération de la lignée NLRP3 ^{-/-}	- 82 -
Figure 17. A. Molécule d'Arglabine. B. Fonction γ -butyrolactone.....	- 93 -
Figure 18. Effet de la molécule d'Arglabine sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages péritonéaux de souris C57Bl/6.....	- 96 -
Figure 19. L'Arglabine réduit l'expression de l'IL-1 β et de la caspase-1 au niveau des macrophages péritonéaux de souris C57Bl/6	- 98 -
Figure 20. Spécificité des cristaux de cholestérol pour l'inflammasome NLRP3	- 100 -
Figure 21. Spécificité de l'Arglabine pour l'inflammasome NLRP3 au niveau des macrophages péritonéaux des souris C57Bl/6.....	- 101 -
Figure 22. Spécificité de l'Arglabine pour l'inflammasome NLRP3 stimulé par l'ATP	- 102 -
Figure 23. L'Arglabine induit l'autophagie au niveau des macrophages péritonéaux de souris C57Bl/6	- 104 -
Figure 24. Effet de l'Arglabine sur la concentration plasmatique de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-10 chez des souris ApoE ₂ .Ki	- 105 -

Figure 25. Effet de l'Arglabine sur les concentrations plasmatiques de cholestérol total et des triglycérides chez les souris ApoE ₂ .Ki et ApoE ₂ .Ki/NLRP3 ^{-/-}	- 106 -
Figure 26. Effet de l'Arglabine sur l'oxydation des LDL chez les souris ApoE ₂ .Ki et les souris ApoE ₂ .Ki/NLRP3 ^{-/-}	- 109 -
Figure 27. Effet de l'Arglabine sur le phénotype des monocytes au niveau de la rate de souris ApoE ₂ .Ki.	- 110 -
Figure 28. Effet de l'Arglabine sur le phénotype des macrophages des plaques d'athérome de souris ApoE ₂ .Ki.....	- 111 -
Figure 29. Effet de l'Arglabine sur le développement des plaques d'athérome.....	- 113 -
Figure 30. Effet de l'Arglabine sur l'expression de l'IL-1β au niveau des îlots de Langerhans de souris ApoE ₂ .Ki et ApoE ₂ .Ki/NLRP3 ^{-/-}	- 115 -
Figure 31. Effet de l'Arglabine sur la glycémie et l'insulinémie chez des souris ApoE ₂ .Ki et ApoE ₂ .Ki/NLRP3 ^{-/-}	- 116 -
Figure 32. L'Arglabine inhibe l'apoptose des cellules β-pancréatiques chez des souris ApoE ₂ .Ki. -	117 -
Figure 33. L'Arglabine réduit la susceptibilité des cellules INS-1 à l'apoptose	- 119 -
Figure 34. Effet de l'Arglabine sur l'expression de l'IL-1β au niveau des cellules INS-1	- 120 -
Figure 35. Effet de la molécule d'Arglabine sur le processus de maturation de la pro-IL-1β au niveau des cellules INS-1	- 121 -
Figure 36. L'Arglabine augmente la susceptibilité des cellules INS-1 à l'autophagie.....	- 122 -
Figure 37. Le traitement des cellules INS-1 par le 3-Méthyladénine en présence de l'Arglabine réduit leur susceptibilité à l'apoptose	- 123 -
Figure 38. Le traitement des cellules INS-1 par la rapamycine en présence de l'Arglabine augmente leur susceptibilité à l'apoptose.....	- 123 -
Figure 39. Structure chimique de la molécule de Parthénolide (201)	- 123 -
Figure 40. Structure chimique de la molécule de Glyburide (206)	- 123 -



Liste des tableaux

Tableau I. Complications associées à l'athérosclérose.....	- 53 -
Tableau II. Anticorps utilisés et facteurs de dilution.....	- 79 -
Tableau III. Séquences des amorces utilisées pour le génotypage des souris	- 83 -
Tableau IV. Programme de PCR classique utilisé pour le génotypage de souris.....	- 83 -
Tableau V. Propriétés physico-chimiques de la molécule d'Arglabine	- 94 -
Tableau VI. Effet de l'Arglabine sur les différentes fractions des lipoprotéines	- 107 -



Résumé

L'inflammasome NLRP3, un complexe protéique pro-inflammatoire, joue un rôle essentiel dans le processus pathologique de l'athérosclérose et du diabète de type 2 (DT2). Il est responsable de la maturation de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 respectivement en IL-1 β et IL-18 biologiquement actives. L'objectif de cette étude consiste à identifier et caractériser un inhibiteur spécifique de l'inflammasome NLRP3 qui pourrait contribuer à limiter l'évolution des plaques d'athérome et l'installation du DT2. Au cours de cette thèse, nous avons isolé l'Arglabine d'une plante, *Artemisia glabella*, connue pour ses vertus anti-tumorales. L'effet de l'Arglabine a été étudié au niveau des macrophages et des cellules β -pancréatiques, et chez des souris ApoE₂.Ki et ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-} placées sous régime *High Fat Diet* (HFD). Les résultats *in vitro* montrent que l'Arglabine réduit, d'une façon dose-dépendante, l'activité de l'inflammasome NLRP3 et inhibe l'expression des protéines Nlrp3, IL-1 β et caspase-1. Elle induit l'autophagie en augmentant significativement l'expression de la LC3-II au niveau des macrophages murins en culture. L'injection intra-péritonéale de deux doses journalières d'Arglabine (2.5 ng/g de m.c.) à des souris ApoE₂.Ki placées sous régime HFD, normalise le profil lipidique et réduit l'oxydation des LDL au niveau du plasma des souris. Elle réduit le nombre des monocytes pro-inflammatoires (Ly-6C^{high}) et augmente le nombre des monocytes anti-inflammatoires (Ly-6C^{low}). Au niveau des lésions artérielles, l'Arglabine oriente les macrophages présents vers un phénotype anti-inflammatoire M2. L'ensemble de ces résultats montre un rôle athéroprotecteur de l'Arglabine : elle réduit la surface des lésions artérielles au niveau du sinus aortique ainsi qu'au niveau de la totalité de l'aorte des souris ApoE₂.Ki placées sous régime athérogène. De plus, le traitement par l'Arglabine normalise le profil glycémique et insulinémique des souris ApoE₂.Ki. Elle réduit également l'activité de la caspase 3 au niveau des îlots de Langerhans et augmente de manière dose-dépendante l'expression de la protéine Bcl-2 au niveau des cellules β -pancréatiques. Par ailleurs, nous avons montré une augmentation de l'expression de protéines impliquées dans l'autophagie telles que la Becline 1 et la LC3-II sous l'effet de l'Arglabine. Ainsi, l'Arglabine réduit non seulement l'activité de l'inflammasome NLRP3 mais améliore aussi la survie des cellules β -pancréatiques.

L'Arglabine constitue donc une molécule très prometteuse dans le traitement des maladies cardiovasculaires et le DT2.




A

bstract

The NLRP3 inflammasome activity is abnormally elevated in many human inflammatory diseases, including cardiovascular and metabolic diseases such as atherosclerosis and type 2 diabetes mellitus (T2DM) respectively. Therefore, there is considerable interest in the identification of effective therapeutics that selectively inhibit the NLRP3 inflammasome pathway. In this study, we have identified Arglabin as a potential small molecule inhibitor that targets the NLRP3 inflammasome activity in cell culture and in an animal model, the ApoE₂.Ki mice fed a high-fat Western-type diet (HFD). Arglabin, a plant sesquiterpene lactone, has been used extensively as an herbal remedy that proved effective in treating cancer of the liver, lungs and breast at early stages. Arglabin inhibited, in a concentration-dependent manner, IL-1 β and IL-18 production in lipopolysaccharide and cholesterol crystal-activated cultured mouse peritoneal macrophages. In addition, Arglabin activated autophagy as evidenced by the increase in LC3-II protein. Intraperitoneal injection of Arglabin (2.5 ng/g body weight twice daily for 13 weeks) into female ApoE₂.Ki mice fed a HFD resulted in a decreased IL-1 β plasma level and reduced plasma levels of total cholesterol and triglycerides. Treatment of ApoE₂.Ki mice fed a HFD with Arglabin significantly reduced the plasma concentration of anti-oxLDL antibodies. Moreover, Arglabin oriented the proinflammatory M1 macrophages into the anti-inflammatory M2 phenotype in spleen and arterial lesions. Consequently, a marked reduction in atherosclerotic lesions was observed in the median areas in the sinus and whole aorta. In comparison to vehicle-treated mice, Arglabin reduced plasma levels of glucose and insulin. Immunohistochemical analysis revealed the presence of active caspase 3 in Langerhans islets of ApoE₂.Ki mice fed a HFD that was significantly inhibited by Arglabin treatment. Moreover, Arglabin reduced susceptibility to apoptosis in cultured INS-1 cells by increasing concentration-dependently Bcl-2 levels, which led to concomitantly decreased Bax/Bcl-2 ratio. In cultured INS-1 cells, Arglabin increased the expression of the autophagic markers Becline 1 and LC3-II in a concentration-dependent manner. Consequently, our results indicate survival-promoting properties of the Arglabin molecule in pancreatic β -cells.

In conclusion, our findings demonstrate that Arglabin may represent a promising new drug to treat atherosclerosis and T2DM.



Synthèse bibliographique

AVANT-PROPOS

Le risque cardiovasculaire regroupe l'ensemble de tous les facteurs de risque qui sont associés au développement des maladies cardiovasculaires tels que l'obésité, l'hypertension artérielle, le diabète de type 2 (DT2) et la dyslipidémie. D'autres facteurs comme le mode de vie, les facteurs environnementaux et les facteurs génétiques (1) sont impliqués dans le processus pathologique des maladies cardiovasculaires. Le stress oxydant, causé par les espèces réactives oxygénées (ROS) est l'acteur initiateur de ce processus pathologique (2). Il existe de nombreuses protéines capables de générer les ROS, mais la NADPH oxydase (*NADPH oxidase (NOX)-derived ROS*) est la source intracellulaire majeure au niveau vasculaire (3). Les ROS sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que l'angiogenèse, la régulation de la croissance, la différenciation et la migration cellulaires (4). Néanmoins, la production excessive des ROS est responsable de plusieurs dommages cellulaires qui affectent les composés vitaux des cellules comme les lipides, les protéines, l'ADN ainsi que les membranes cellulaires, ce qui contribue à la mort des cellules par nécrose ou par apoptose (5). Ainsi, le stress oxydant participe à l'installation de nombreuses pathologies telles que l'athérosclérose et le DT2 (6). L'inflammation est étroitement corrélée à des désordres métaboliques et vasculaires, ce qui augmente le risque de la survenue de la maladie coronarienne, d'accident cérébro-vasculaire et d'insuffisance cardiaque. De nombreuses études épidémiologiques chez l'homme suggèrent que les interleukines pro-inflammatoires de la famille IL-1 jouent un rôle primordial dans le développement des maladies cardiovasculaires en général et dans l'athérosclérose et le DT2 en particulier. Les deux membres les plus étudiés de cette famille sont l'IL-1 β (*interleukin-1 β*) et l'IL-18 (*interleukin-18*). Ces deux cytokines sont exprimées par différents types cellulaires tels que les macrophages, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), les cellules dendritiques, les cellules β -pancréatiques des îlots de Langerhans (7, 8). Contrairement aux autres cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β (17 kDa) et l'IL-18 (18 kDa) sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, pro-IL-1 β

(31 kDa) et pro-IL-18 (24 kDa). Ces deux précurseurs cytosoliques sont activés au cours de la réaction inflammatoire suite à un clivage protéolytique de leurs pro-domaines. Cette activation se fait essentiellement par l'intermédiaire d'un système décrit en 2002 par l'équipe du Professeur Tschopp : l'inflammasome (9).

Historiquement, c'est l'inflammasome NLRP1 qui fut découvert en premier. Cependant, il s'avère aujourd'hui que c'est le système de l'inflammasome NLRP3 qui est au centre de la majorité des études. Néanmoins, le rôle et les mécanismes d'activation de ce système durant la formation des plaques d'athérome et l'installation du DT2 demeurent ambigus.

CHAPITRE I

L'INFLAMMASOME NLRP3

I. L'INFLAMMASOME

La formation de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 est déclenchée au niveau des récepteurs PRR (*Pattern-Recognition Receptors*) exprimés par les cellules de l'immunité innée (7, 8). Ces récepteurs ciblent les molécules PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) exprimées au niveau des microorganismes (10). L'activation des PRR par les PAMP est associée à une réponse inflammatoire qui induit l'activation des cytokines et l'expression des chémokines. Les PRR sont subdivisés en quatre classes, parmi lesquelles on peut citer la classe des récepteurs NLR (*nucleotide-binding-oligomerization-domain- (NOD-) like receptors*) (11).

Les récepteurs NLR sont des récepteurs cytosoliques impliqués dans la reconnaissance des composants bactériens anormalement présents dans le cytoplasme des cellules (12). Ils sont aussi capables de reconnaître des signaux et des composants non bactériens par l'assemblage de l'inflammasome (9). Il s'agit d'un complexe multi protéique constitué de trois protéines différentes: un récepteur NLR (dont le type dépend de l'activateur qui a déclenché la réaction inflammatoire), la protéine adaptatrice ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a Caspase-recruitment domain*) la pro-caspase-1 et/ou la pro-caspase-5 (9). L'assemblage de l'inflammasome, induit suite à son activation, est associé à un auto-clivage des pro-caspases. Les caspases-1 et -5 ainsi générées induisent à leur tour l'activation protéolytique de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18. Vingt inflammasomes ont été décrits chez l'homme, parmi lesquels on peut citer l'inflammasome AIM2 (*absent in melanoma 2*), NLRP1 (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 1*), NLRC4 (*NLR family CARD domain-containing protein 4*) et NLRP3 (*NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3*). Ces inflammasomes présentent des points communs et des différences.

1. AIM2

AIM2 appartient à la famille des PYHIN (*pyrin and HIN200 domain-containing protein family*). Il est constitué d'un domaine C-terminal HIN200 (*hematopoietic interferon-inducible nuclear antigens with 200 amino acid repeats*) et d'un domaine N-terminal, la protéine Pyrine, contenant le domaine PYD (*pyrin effector domain*) (13). Comme il est dépourvu d'un domaine NBD (*nucleotide-binding domain*), AIM2 interagit directement avec l'ADN double brin via son domaine HIN200, ce qui peut induire le recrutement d'ASC (14). L'oligomérisation d'AIM2 en heptamère contribue à l'activation des cytokines IL-1 β et IL-18 et à la production d'interféron- β (19). AIM2 joue un rôle important dans les réponses auto-immunes à l'ADN double brin (DS-DNA), caractéristique du lupus systémique érythémateux et des maladies qui lui sont associées (14, 15) (Figure 1).

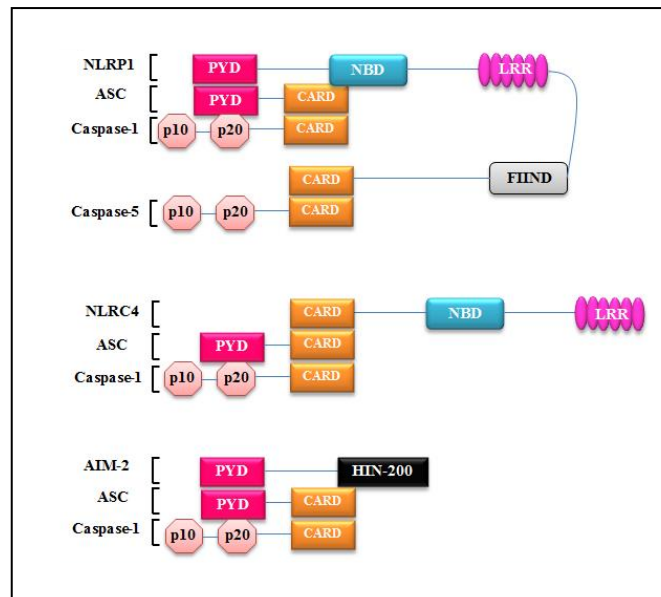


Figure 1. Structure schématique des inflammasomes NLRP1, NLRC4 et AIM2

Ces inflammasomes sont constitués principalement de trois domaines : un domaine CARD et/ou PYD, un domaine NBD et un domaine LRR, à l'exception de l'inflammasome AIM2 constitué d'un domaine HIN200 et d'un domaine PYD. La protéine adaptatrice ASC est constituée d'un domaine PYD et d'un domaine CARD. Les caspases sont constituées d'un pro-domaine CARD et de deux sous-unités, p20 et p10. L'inflammasome, l'ASC et la pro-caspase-1 ou 5 interagissent par des liaisons homéotypiques de type CARD-CARD et PYD-PYD.

2. NLRP1

L'inflammasome NLRP1 (NLRP1b chez la souris) est constitué de trois domaines: un domaine CARD (*caspase recruitment domain*), un domaine central NBD et un domaine riche en Leucine, LRR (*leucine-rich repeat domain*) (16, 9, 14). Contrairement aux autres inflammasomes, NLRP1 est le seul inflammasome qui présente avec le domaine CARD, un domaine PYD et un domaine FIIND (*function to find domain*) qui lui permet d'interagir avec une 2^{ème} protéase inflammatoire, la caspase-5 (Figure 1). Le domaine LRR constitue un domaine de reconnaissance de ligands pour d'autres récepteurs comme les récepteurs TLR (*Toll Like Receptors*). Il est impliqué dans la reconnaissance des ligands microbiens. Le domaine central NBD joue un rôle principal dans l'oligomérisation et l'activation de l'inflammasome. Alors que les domaines CARD et PYD sont impliqués dans les interactions avec les autres protéines constituant l'inflammasome, notamment les caspases et ASC. Chez la souris, NLRP1 est activé par la toxine létale (LeTx) du *Bacillus anthracis* (17). Chez l'homme, il est activé par le dipeptide muramyl (18). Le rôle d'ASC dans l'oligomérisation de NLRP1 est controversé. Comme il contient un domaine CARD, NLRP1 peut interagir avec ASC ou directement avec la pro-caspase-1 (18) et la pro-caspase-5, ce qui induit l'activation des cytokines pro-inflammatoires (14). Par contre, le NLRP1 murin interagit avec la pro-caspase-1 d'une manière ASC-indépendante, jouant ainsi un rôle important dans l'apoptose et l'inflammation (19) (Figure 2).

3. NLRC4

L'inflammasome NLRC4 est constitué de trois domaines: un domaine CARD, un domaine NBD et un domaine LRR (15, 9, 14) (Figure 1). L'oligomérisation de NLRC4 est induite en réponse à la flagelline bactérienne et aux systèmes de sécrétion de type III et IV des bactéries Gram-négatif comme la *Salmonella typhimurium*, *Burkholderia pseudomallei*, etc (20, 21). Le récepteur NAIP5 (*neuronal apoptosis inhibitory protein 5*) de la famille *Nod-like receptor* est indispensable à l'oligomérisation de l'inflammasome NLRC4 et à l'activation de la pro-caspase-1 (22). En effet, ce récepteur s'associe à la flagelline, ce qui induit la formation d'un complexe NAIP5-NLRC4 indispensable à l'activation de la pro-IL-1 β et la pro-IL-18. Par contre, le rôle d'ASC dans ce mécanisme

d'activation demeure controversé (23, 24). Cet inflammasome est principalement impliqué dans la défense de la barrière intestinale (25) (Figure 2).

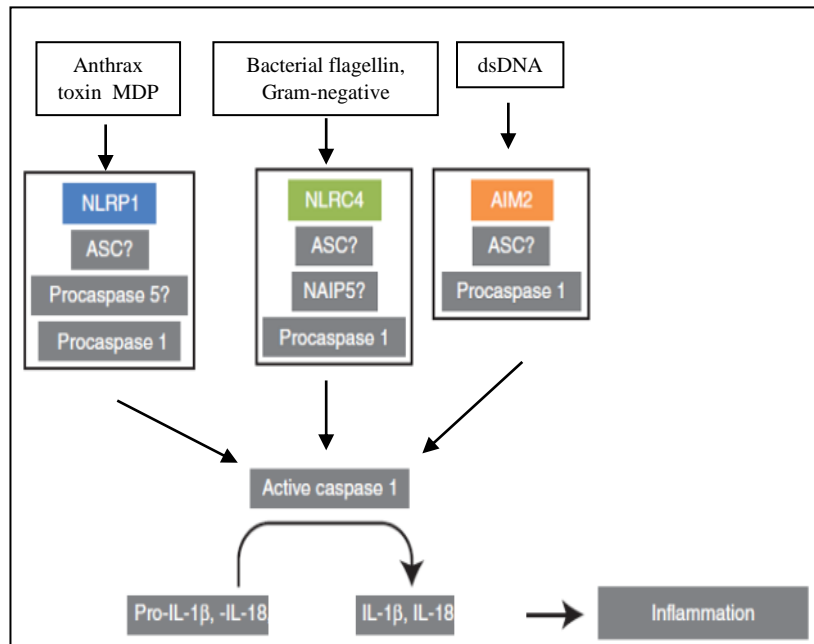


Figure 2. Activation des inflammasomes NLRP1, NLRC4 et AIM2

Différents types de stimuli sont impliqués dans l'activation spécifique de plusieurs inflammasomes comme NLRP1, NLRC4 et AIM2. Cette activation induit l'oligomérisation des inflammasomes en heptamère, ce qui induit l'activation des procaspases par auto-clivage. Quand elles sont activées, les caspases activent la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 respectivement en IL-1 β et IL-18 biologiquement actives. Le rôle de la protéine adaptatrice ASC dans l'activation de ces inflammasomes est mal élucidé. L'IL-1 β et l'IL-18 activées jouent un rôle essentiel dans l'installation de l'inflammation et le développement de nombreuses pathologies (26).

Dix ans après la découverte des inflammasomes, de nombreuses études se sont focalisées sur le rôle quasi ubiquitaire de l'inflammasome NLRP3 dans les pathologies humaines à composante inflammatoire. Une très grande panoplie de stimuli a été mise en évidence. Toutefois la compréhension de leurs mécanismes d'action, de la régulation de l'inflammasome NLRP3 et ses liens avec les cellules de l'immunité innée sont loin d'être bien décrits.

II. L'INFLAMMASOME NLRP3

1. Expression, structure et oligomérisation

L'inflammasome NLRP3 est exprimé par différentes cellules telles que les cellules immunitaires, en particulier les macrophages, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules β -pancréatiques des îlots de Langerhans, etc (27, 28). L'inflammasome NLRP3 est constitué de 3 protéines, la protéine Nlrp3, ASC et la pro-caspase-1. Le gène qui code pour la Nlrp3 a été identifié en 2001 par Hoffman et *al.* chez des patients présentant la pathologie de l'urticaire familiale au froid (FCU) et le syndrome de Muckle-Wells (MWS). Ce gène est localisé au niveau du chromosome 1q44. Il est constitué de 9 exons et il code pour une protéine de 1016 acides aminés (29). Une fois activé, l'inflammasome NLRP3 s'oligomérisé avec ASC via leurs domaines PYD. Ce complexe (NLRP3-ASC) se lie à la pro-caspase-1 via le domaine CARD d'ASC formant ainsi un complexe multi-protéique activé, l'inflammasome NLRP3 (30) (Figure 3).

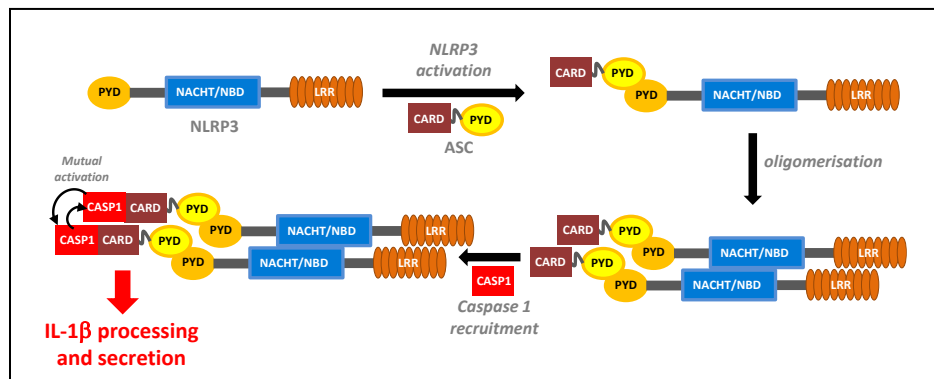


Figure 3. Structure schématique et oligomérisation de l'inflammasome NLRP3

Contrairement aux autres inflammasomes (NLRP1, NLRC4 et AIM2), ASC est indispensable à l'oligomérisation et à l'activation de l'inflammasome NLRP3 dont le domaine PYD est le facteur clé (31).

Les mécanismes impliqués dans l'inhibition de l'interaction PYD-PYD en conditions physiologiques (Figure 4A) ne sont pas encore élucidés. Il a été démontré que plus de 90 mutations localisées au niveau du domaine NBD sont associées à une activation constitutive de l'inflammasome NLRP3. Cette activation est induite en absence d'activateurs spécifiques de l'inflammasome NLRP3 (31, 32) (Figure 4B). Par ailleurs, la

délétion du domaine LRR induit l'oligomérisation NLRP3-ASC via les interactions PYD-PYD (Figure 4C) (31). En effet, en conditions physiologiques, l'activité de l'inflammasome NLRP3 est inhibée par la liaison du domaine LRR au domaine NBD (14). La détection des activateurs spécifiques de l'inflammasome NLRP3 est associée à une inhibition de l'auto-répression exercée par le domaine LRR. Par conséquent, l'adénosine triphosphate (ATP) se lie au domaine NBD caractérisé par une activité ATPase, ce qui contribue à l'oligomérisation et à la formation du complexe NLRP3 responsable de l'activation des cytokines pro-inflammatoires (30).

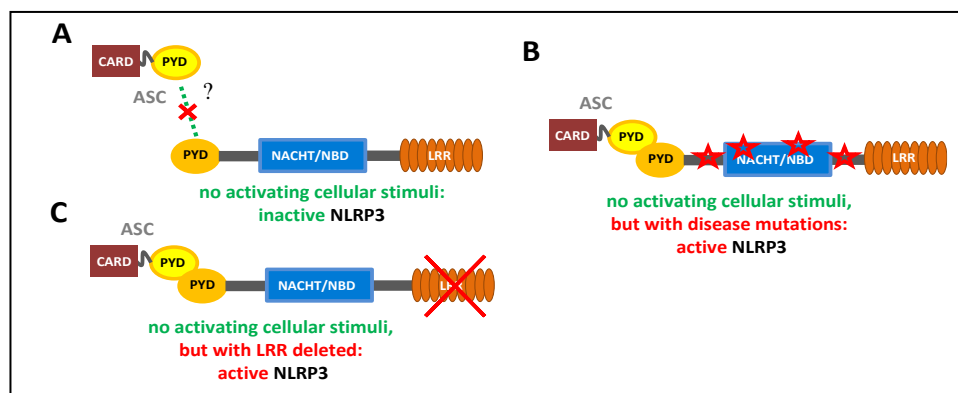


Figure 4. Effet de la structure de l'inflammasome NLRP3 sur la fonction des domaines PYD

A. En conditions physiologiques, l'inflammasome NLRP3 est inactivé. Cette inactivation résulte de l'inhibition de l'interaction PYD-PYD du complexe ASC-NLRP3. Le mécanisme responsable de cette inactivation est inconnu. **B.** Les mutations localisées au niveau du gène qui code pour le domaine NBD, appelé aussi NACHT, sont associées à une activation constitutive de l'inflammasome NLRP3, malgré l'absence d'activateurs. **C.** La délétion de l'extrémité C-terminale, LRR, démasque le domaine PYD de l'inflammasome NLRP3, facilitant l'interaction PYD-PYD avec ASC.

a. Nlrp3

La protéine Nlrp3 est constituée d'une protéine Pyrine, d'un domaine NBD et d'un motif LRR, organisés de l'extrémité N vers l'extrémité C terminale. En conditions physiologiques, le domaine PYD présente une conformation d'auto-agrégation. Il est caractérisé par une structure très conservée présentant des résidus hydrophobes et chargés, indispensables à l'oligomérisation des inflammasomes. La comparaison avec les autres complexes montre que le domaine PYD de l'inflammasome NLRP3 se caractérise par la présence de deux résidus cystéines, Cys-8 et Cys-108. En conditions

physiologiques, ces deux résidus exercent une auto-inhibition de l'interaction ASC-inflammasome NLRP3 (Figure 4A). Les résidus Cys-8 et Cys-108 sont fortement impliqués dans la régulation de l'activité de l'inflammasome NLRP3 par le potentiel redox (33). Les ROS générées par la NADPH oxydase, suite à l'activation de l'inflammasome NLRP3 (34), induisent un changement de conformation du domaine PYD qui consiste en une formation d'un pont disulfure entre les résidus Cys-8 et Cys-108 indispensable à l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3 (33).

b. ASC

Grâce à ses deux domaines CARD et PYD, ASC joue le rôle d'une molécule adaptatrice dans l'inflammation (9) et dans la pyroptose (31). Cette protéine est impliquée dans l'oligomérisation de plusieurs inflammasomes par le biais de son domaine PYD et dans le recrutement de plusieurs caspases par le biais de son domaine CARD, induisant ainsi l'activation des processus inflammatoires. Ces deux domaines sont reliés par 23 résidus semi-flexibles qui leur confèrent la facilité d'interagir avec leurs protéines partenaires (32). ASC interagit avec d'autres complexes multi-protéiques impliqués dans l'auto-clivage des caspases comme les pyroptosomes, ce qui induit la mort cellulaire par pyroptose (35).

c. La caspase-1

La caspase-1 est une protéase à cystéine qui joue un rôle essentiel dans l'inflammation, l'apoptose et la nécrose. Elle est exprimée au niveau du cytosol sous forme d'un zymogène inactif, la pro-caspase-1 (45 kDa), activé suite à un processus protéolytique. La caspase-1 possède un site de clivage catalytique très conservé, composé d'un résidu cystéine (36). Ce résidu lui confère une spécificité stricte de clivage de ses substrats : après un résidu d'acide aspartique. La caspase-1 est constituée d'un pro-domaine N-terminal, d'une grande sous-unité, p20 et d'une petite sous-unité, p10. Son domaine CARD possède une structure très conservée, responsable de son auto-clivage. Les résidus Asp-27 et Arg-45, présents au niveau de ce domaine, jouent un rôle clé respectivement dans l'interaction avec le domaine CARD d'ASC et dans l'auto-oligomérisation de la pro-caspase-1 (37).

2. Activation de l'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 est un PRR important dans l'immunité innée qui, par l'activation d'IL-1 β et d'IL-18, participe à l'installation des réactions inflammatoires et à l'élimination des signaux de danger (pathogènes, particules, ...). L'induction de l'immunité innée est associée à l'expression d'autres molécules comme les molécules d'adhésion, responsables du recrutement des cellules immunitaires et de l'induction des réponses immunitaires adaptatives. Toutefois, l'activation inappropriée de NLRP3 peut causer à l'organisme des dommages inflammatoires très délétères, d'où l'importance de la régulation de l'inflammasome NLRP3. Cette régulation commence au niveau de la transcription, signal «1» étroitement associé à un signal «2».

a. Le signal «1»

Le signal «1» consiste en une étape de "priming". Cette étape correspond à une activation des PRR, les TLRs ou les récepteurs de cytokines (TNFR [*tumour necrosis factor receptor*] et IL-1R). Le signal «1» est associé à l'activation du facteur de transcription NF κ B (*Nuclear factor kappa B*), ce qui induit la transcription et la traduction des formes inactives pro-IL-1 β et pro-IL-18 ainsi que la transcription et la traduction des trois protéines constituant l'inflammasome NLRP3 (38) (Figure 5).

b. Le signal «2»

Le signal «2» consiste en une activation du complexe NLRP3 qui conduit à un changement de conformation de la protéine Nlrp3, facilitant son interaction avec ASC, connecteur entre l'inflammasome NLRP3 et la procaspase-1. L'oligomérisation de cette plateforme (NLRP3-ASC-pro-caspase-1) en heptamère induit l'activation de la procaspase-1 par auto-clivage. Une fois activée, la caspase-1 active la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 en clivant leurs pro-domaines (9) (Figure 5).

3. Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3

Les activateurs de l'inflammasome NLRP3 sont subdivisés en trois classes :

- i) Activateurs endogènes tels que l'ATP (39), les cristaux de cholestérol (105), les cristaux d'acide urique (40) et l'acide hyaluronique (41).

ii) Activateurs exogènes tels que le LPS (lipopolysaccharide) (42), les acides nucléiques (43, 44, 45, 46) et le dipeptide muramyl (18).

iii) Activateurs environnementaux tels que la silice (47, 48), les nanoparticules (49) et l'hydroxyde d'aluminium (50).

La diversité des activateurs de l'inflammasome NLRP3, en termes de structure et de nature physico-chimique, est à l'origine de la grande incompréhension des mécanismes responsables de l'activation de cet inflammasome. Face à leur nombre élevé, l'inflammasome NLRP3 réagit plutôt indirectement à ces stimuli, via la reconnaissance de signaux de stress cellulaires tels que les ROS, la baisse de la concentration intracellulaire du potassium (K^+) et l'influx des ions Ca^{2+} et/ou *via* la déstabilisation lysosomale.

- La majorité des stimuli qui ciblent l'inflammasome NLRP3 induit la production des ROS (51, 52, 53). L'inhibition de cette production réduit l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-18, d'où l'importance des systèmes anti-oxydants. Des études ont démontré que l'inhibition de la production des mtROS (ROS d'origine mitochondriale) ou l'inhibition de leur activité oxydative inhibe non seulement l'expression des protéines de l'inflammasome NLRP3 mais aussi l'activité de l'inflammasome NLRP3. Ceci explique le rôle des mtROS en tant qu'activateurs endogènes, dans l'induction du signal «1» et du signal «2» (54, 55, 56).
- D'autres activateurs, comme les cristaux et les toxines porogènes, agissent sur l'inflammasome NLRP3 en induisant un déséquilibre ionique dans les cellules, en stimulant l'efflux des ions K^+ et l'influx des ions Ca^{2+} . Il a été démontré que le blocage de l'efflux de potassium inhibe totalement l'activation de l'inflammasome NLRP3 et la maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18 (57, 58) et que la faible concentration intracellulaire en potassium (inférieure à 70 mM) semble contribuer à l'auto-activation de la caspase-1. L'ATP active le récepteur purinergique P2X7 qui s'associe avec la pannexine-1 et induit l'ouverture des canaux non-sélectifs permettant l'efflux des ions K^+ et l'entrée des PAMP, responsables de l'activation de l'inflammasome NLRP3 (59, 60) (Figure 5).

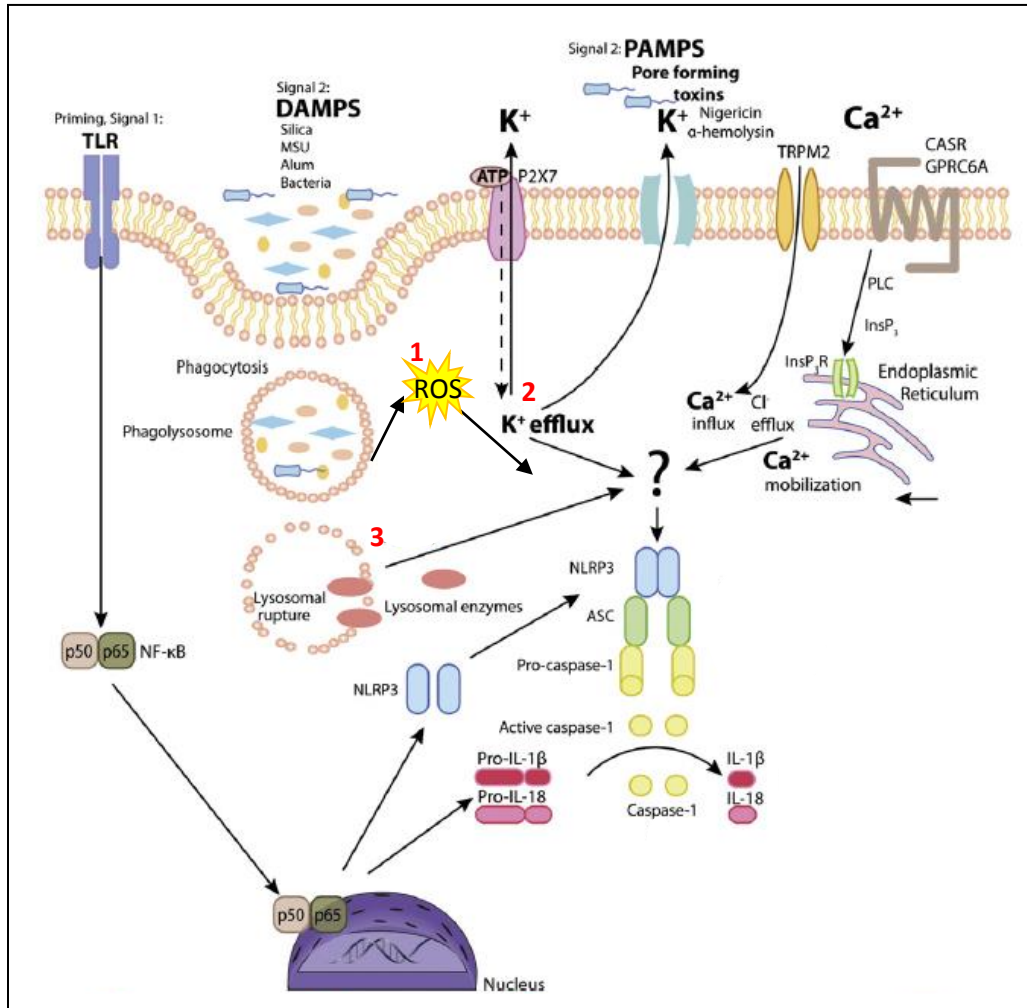


Figure 5. Mécanismes d'activation de l'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 peut être activé par trois mécanismes différents: (1) la production de ROS, (2) l'efflux des ions K⁺/l'influx des ions Ca²⁺ et (3) la déstabilisation lysosomale. (1) Les ROS présentent un activateur endogène essentiel à l'activation de l'inflammasome NLRP3 induite par de nombreux stimuli. (2) Cette activation peut être associée à un influx des ions Ca²⁺ à travers les récepteurs TRPM2 et CASR. Ce dernier active l'inflammasome NLRP3 à travers la phospholipase C (PLC) qui catalyse la production de l'inositol-1, 4, 5-trisphosphate et induit la libération des ions Ca²⁺ du réticulum endoplasmique. L'ATP active le récepteur P2X7 qui s'associe avec la pannexine-1 et induit l'efflux des ions K⁺. (3) Certains stimuli sont phagocytés en formant des phagosomes fusionnés avec des lysosomes. Les divers enzymes des phagolysosomes, en particulier la cathépsine B, se déversent dans le cytoplasme, ce qui induit l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3 et le clivage de la pro-IL-1β et de la pro-IL-18 (61).

En outre, les stimuli de l'inflammasome NLRP3 induisent l'influx des ions Ca²⁺ à travers le récepteur TRPM2 (*transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 2*) et le récepteur CASR (*calcium sensing receptor*) (62, 63). Ainsi l'augmentation intracellulaire en Ca²⁺ et la baisse en ions K⁺ induisent l'oligomérisation et l'activation des cytokines pro-inflammatoires. Néanmoins, le

mécanisme responsable de cette activation demeure non élucidé. Par ailleurs, la production des ROS est étroitement associée à l'efflux des ions K^+ ; toutefois, d'autres études seront nécessaires pour mieux étudier l'interaction entre ces deux mécanismes d'action (64).

- Certains cristaux (tels que les cristaux de cholestérol) et agents pathogènes sont phagocytés par les cellules immunitaires. Cette phagocytose induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 à travers la déstabilisation lysosomale et la libération d'enzymes protéolytiques lysosomales comme la cathépsine B (65, 66). L'inhibition de l'acidification vacuolaire et l'inhibition de l'activité de la cathépsine-B par des inhibiteurs spécifiques empêchent l'activation de l'inflammasome en présence d'agents particuliers phagocytés (Figure 5) (66).

D'après Shimada et *al.* les trois mécanismes d'action cités ci-dessus convergent pour induire la libération de l'ADN mitochondrial oxydé qui active l'inflammasome NLRP3 (67).

Il est important de mentionner que, malgré les études effectuées ces dix dernières années sur l'inflammasome NLRP3, le(s) mécanisme(s) exact(s) par le(s) quel(s) l'inflammasome NLRP3 s'active intrinsèquement est (sont) encore au stade des spéculations.

4. Les maladies associées à l'activation de l'inflammasome NLRP3

L'inflammasome NLRP3 est l'inflammasome le plus connu par des mutations responsables de l'apparition de maladies inflammatoires graves. Les patients, ayant un syndrome de fièvres récurrentes héréditaires et des maladies inflammatoires chroniques, présentent des mutations au niveau de l'exon 3 du gène qui code pour la protéine Nlrp3. Les fièvres récurrentes héréditaires sont des maladies rares, caractérisées par la survenue d'épisodes fébriles récidivants sans cause infectieuse. Elles sont associées à la présence d'une inflammation héréditaire, générée spontanément par le corps (68). Parmi ces fièvres, on peut citer la fièvre méditerranéenne familiale (FMF), le syndrome MWS et le FCU appelé aussi FCAS. La FMF est une maladie autosomale récessive (69, 70) alors que le MWS (71) et le FCU sont deux maladies autosomales dominantes (72). Il existe

plusieurs mutations associées à la co-installation du MWS et du FCU (Figure 6). D'autres mutations sont associées à l'installation du syndrome chronique infantile neurologique cutané et articulaire (CINCA), syndrome plus rare que le MWS et le FCU. Ce syndrome se caractérise par une éruption cutanée, une atteinte articulaire, une méningite chronique à polynucléaires, parfois une surdité de perception et des manifestations oculaires (73). Le syndrome Blau une maladie autosomale dominante, est dû aussi à une mutation (R260W) localisée au niveau du domaine NBD. Les patients souffrant du syndrome Blau présentent une combinaison entre des éruptions cutanées, des arthrites et des uvéites (74) (Figure 6).

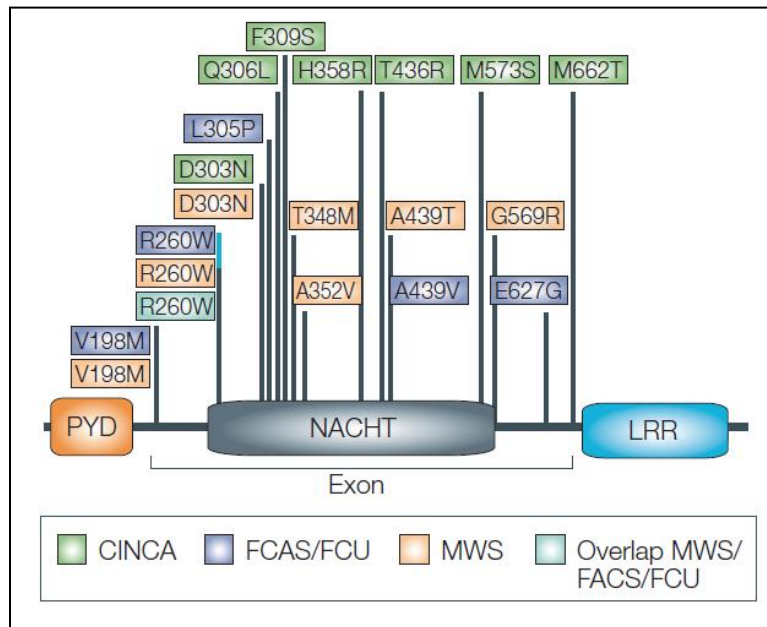


Figure 6. Quelques mutations associées au gène qui code pour la protéine Nlrp3

Toutes les mutations, associées à l'inflammasome NLRP3, et qui sont responsables de l'installation du syndrome de fièvres récurrentes héréditaires, sont localisées au niveau de l'exon 3. CINCA: syndrome chronique infantile neurologique cutané et articulaire. FCU/FCAS: urticaire familiale au froid. MWS: syndrome de Muckle-Wells (14).

Le FCAS, le MWS et le syndrome CINCA sont associés à une activation constitutive de l'inflammasome NLRP3 et à la maturation et l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-18 (75, 76). D'autres maladies comme la goutte, la pseudogoutte, la silicose, l'asbestose sont associées à une activation constitutive de l'inflammasome NLRP3. Cette activation est due à une exposition chronique à des activateurs tels que les cristaux d'acide urique responsables de l'installation de la goutte, le pyrophosphate de calcium dihydraté (CPPD)

responsable de la pseudo-goutte, les cristaux de silice responsables de la silicose et l'amiante ou l'asbeste responsables de l'asbestose (77). Malgré le nombre élevé de mutations (plus de 90 mutations) localisées au niveau du domaine NBD, une activation constitutive de l'inflammasome NLRP3 est induite. La majorité des mutations associées au syndrome de fièvres récurrentes héréditaires est localisée à proximité de la région de liaison au nucléotide et ne concerne pas les résidus essentiels pour l'activité NTPases du domaine NBD (78).

CHAPITRE II

L'INFLAMMASOME NLRP3 & L'ATHEROSCLEROSE

I. GENERALITES

1. Définition

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'athérosclérose se définit par 'une association variable de remaniements de la paroi vasculaire des artères de moyen et de grand calibre, due à l'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'. Le terme 'athérosclérose' est inventé en 1904 par le Dr Machand Félix. Ce terme reflète une dualité lésionnelle, athéromateuse (dépôts essentiellement lipidiques) et sclérose (enveloppé par un tissu scléreux, fibreux) (79).

L'athérosclérose est une pathologie multifactorielle déclenchée par de nombreux facteurs non-modifiables tels que l'âge et les antécédents familiaux de maladies cardiovasculaires, et des facteurs environnementaux modifiables tels que le mode de vie et le tabagisme. Ces facteurs de risque contribuent à l'installation d'une hypercholestérolémie (taux plasmatique élevé de LDL/VLDL et réduit de HDL) et d'une hyperhomocystéinémie. Ces désordres favorisent l'installation de l'hypertension artérielle, du DT2, de la dyslipidémie et de l'obésité, ce qui accélère la formation des plaques d'athérome (80).

2. Manifestations cliniques

La localisation, la fréquence et l'étendue des plaques d'athérome varient en fonction des facteurs de risque et peuvent être à l'origine d'évènements ischémiques aigus (81). Ces évènements dépendent de l'endroit où s'installe l'athérosclérose (Tableau I).

Site(s) affecté(s)	Complication(s) associée(s)
Artères cérébrales	Accidents vasculaires cérébraux (AVC)
Artères carotides	Maladie de l'artère carotide qui peut provoquer un accident ischémique transitoire ou un AVC
Aorte	Anévrisme
Artères coronaires	Angine de poitrine ou infarctus du myocarde
Artères rénales	Hypertension
Artères iliaques, fémorales et tibiales	Maladies vasculaires périphériques : artériopathies, gangrène, ...

Tableau I. Complications associées à l'athérosclérose

3. Epidémiologie

L'athérosclérose et les complications cardiovasculaires qui lui sont associées représentent la première cause de mortalité dans les pays industrialisés (82, 83). En 2005, la mortalité d'origine cardiovasculaire (principalement la maladie coronarienne, l'AVC et la cardiopathie rhumatismale) a touché 17,5 millions d'individus vs 14,4 millions en 1990. Parmi ces 17,5 millions, 7,6 millions succombaient à une maladie coronarienne et 5,7 millions à un AVC. 80% de cette mortalité concernent les populations à faible ou moyen revenu (84), ce qui montre l'importance des déterminants sociologiques et économiques en tant que facteurs de risque des maladies cardiovasculaires. Selon l'OMS, le nombre de décès provoqués par des maladies cardiovasculaires devrait atteindre 20 millions en 2015 (ce qui représentera 30% de la totalité des décès) (85) et en 2030 les maladies cardiovasculaires seront la première cause de décès au niveau des populations à faible revenu (86).

II. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ATHEROSCLEROSE : DE L'ARTERE SAINE A LA PLAQUE D'ATHEROME

1. La paroi artérielle saine

L'athérosclérose est une maladie de la paroi artérielle affectant les vaisseaux de gros et de moyen calibres. La paroi artérielle est composée de trois tuniques concentriques

morphologiquement distinctes. De la lumière vers l'extérieur du vaisseau, on distingue l'intima, la média et l'adventice.

a. L'intima

L'intima (tunique interne) est directement en contact avec le flux sanguin et est le lieu de formation de la plaque d'athérome. L'intima d'une paroi artérielle saine est très fine et à peine visible au microscope optique. Elle joue un rôle essentiel dans l'homéostasie des vaisseaux sanguins. Elle est constituée successivement d'une monocouche de cellules endothéliales étroitement jointes reposant sur une couche sous-endothéliale et de la limitante élastique interne.

La couche sous-endothéliale ou membrane basale correspond à un tissu conjonctif lâche d'épaisseur variable. Elle est composée de fibres de collagène, de quelques fibres élastiques, de CMLV, de nombreuses cellules du système immunitaire et de fibroblastes producteurs de protéoglycanes, de glycogène et d'élastine.

La limitante élastique interne correspond à une lame de fibres élastiques, riches en élastine, qui sépare l'intima de la média (87, 88) (Figure 7).

b. La média

La média (tunique moyenne) d'une paroi artérielle saine est la tunique la plus épaisse. Elle est constituée de CMLV orientées en hélices, formant des unités lamellaires. Ces unités sont entourées d'une matrice extracellulaire composée de quantités variables de collagène, de protéines fibreuses et élastiques et de protéoglycanes (89). La prédominance de fibres élastiques ou de CMLV détermine le type d'artère (élastique ou musculaire). La média est délimitée de chaque côté par une couche de tissu élastique (la limitante élastique interne et la limitante élastique externe) (Figure 7). Seuls les vaisseaux de gros calibres présentent la limitante élastique externe. Cette tunique fournit des forces hémodynamiques de contraction et de dilatation nécessaires aux vaisseaux sanguins (88).

c. L'adventice

L'adventice (tunique externe) est d'épaisseur variable, dépendante de la zone artérielle. C'est un tissu conjonctif lâche composé de fibroblastes orientés longitudinalement (90), de faisceaux de collagène fibrillaires, de fibres élastiques et de protéoglycanes (89).

Cette tunique est constituée de deux réseaux: un réseau de petits vaisseaux et un réseau de petits nerfs, *vasa vasorum* et *nervi vasorum*, qui participent respectivement à l'irrigation de l'adventice et de la partie externe de la média et à l'innervation des CMLV de la média. Cette tunique permet de fixer l'artère aux organes environnants (88, 90) (Figure 7).

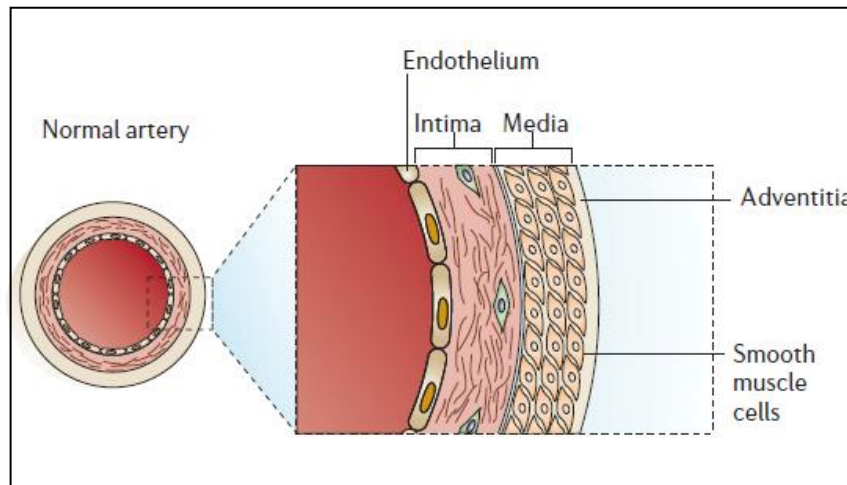


Figure 7. Structure de la paroi artérielle saine

De la lumière vers l'extérieur d'une paroi artérielle saine, on distingue l'intima, la média et l'adventice. L'intima est composée d'une monocouche de cellules endothéliales, d'une couche sous-endothéliale (tissu conjonctif) et d'une limitante élastique interne. La média est constituée d'une couche de cellules musculaires lisses délimitée par deux limitantes élastiques, une limitante interne et une limitante externe. L'adventice est la couche externe de la paroi artérielle qui fixe l'artère aux organes environnants (91).

2. Processus cellulaires et développement de plaque d'athérome

a. Initiation

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique et évolutive touchant essentiellement l'intima et la média. Cette inflammation est déclenchée par une anomalie structurelle et fonctionnelle de l'endothélium vasculaire, la dysfonction endothéliale. L'athérosclérose consiste en une série d'évènements complexes associant des mécanismes moléculaires (comme MCP-1 [*monocyte chemotactic protein-1*] (92), M-CSF [*monocyte-colony stimulating factor*] (93), SRA [*scavenger receptor A*], VCAM-1 [*vascular cell adhesion molecule-1*] (94) et ICAM-1 [*intracellular adhesion molecule-1*] (95) et des mécanismes cellulaires (comme les macrophages, les cellules endothéliales et les CMLV). Cette série d'évènements peut être résumée en une augmentation de la

perméabilité de l'endothélium vasculaire, un désordre du profil lipidique dû essentiellement à une baisse du niveau des HDL en faveur des LDL cholestérol, un recrutement de monocytes et de lymphocytes au niveau de la paroi artérielle et une prolifération des CMLV.

La première phase qui détermine la réponse endothéliale est la diffusion des LDL dans l'espace sous-endothélial selon un gradient de concentration. Comme elles sont retenues dans l'intima par la fixation de l'apolipoprotéine B présente à leur surface aux protéoglycanes de la matrice, les LDL infiltrées peuvent être oxydées par des enzymes telles que la myéloperoxydase ou la 15-lipoxygénase (96, 97). Les LDL oxydées (LDLox) déclenchent l'activation des cellules endothéliales en induisant l'expression et/ou la sécrétion de molécules permettant l'invasion de l'intima par les monocytes circulants. Ces molécules peuvent être des molécules d'adhésion (VCAM1, ICAM1) (94, 95), des sélectines E/P (98), des facteurs de croissance (M-CSF) (93) et des facteurs chimioattractants (MCP-1) (92). L'immobilisation des monocytes au niveau de la paroi vasculaire par les molécules d'adhésion est suivie par leur pénétration dans l'espace sous-endothélial où ils se différencient en macrophages pro-inflammatoires. La différenciation des monocytes en macrophages est associée à une augmentation de l'expression de récepteurs 'scavengers' (CD-36, LOX-1) qui permettent l'internalisation non-spécifique des LDLox et de leur contenu en cholestérol (99, 100). Ainsi, la voie dite 'scavenger' conduit à une accumulation non contrôlée de cholestérol au niveau des macrophages de la paroi vasculaire. L'accumulation des vésicules lipidiques transforme les macrophages en cellules spumeuses qui se regroupent en amas lipidiques sous-endothéliaux et forment ainsi les lésions précoces de l'athérosclérose, les stries lipidiques (101). Les macrophages amplifient l'inflammation de la paroi vasculaire (processus d'auto-amplification) à travers la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines pro-inflammatoires (tels que le TNF [*tumor necrosis factor*], l'IL-1 β et l'IL-18) et d'enzymes de digestion de la matrice extracellulaire (MMP : *matrix metalloproteases*) (Figure 8). L'environnement inflammatoire chronique au niveau des lésions artérielles et la persistance de l'hypercholestérolémie augmentent la production des ROS. L'ensemble de ces processus induit la mort des cellules spumeuses et la libération de corps apoptotiques et du contenu lipidique qui forment le corps lipidique, le centre nécrotique, caractéristique des lésions

avancées. De plus, l'ensemble de ces processus inflammatoires induit la différenciation, la prolifération et la migration des CMLV de la média vers l'intima (102). En effet, certaines CMLV acquièrent la capacité de capter les LDLox, se transforment en cellules spumeuses et participent à la formation du cœur lipidique (103) (Figure 8).

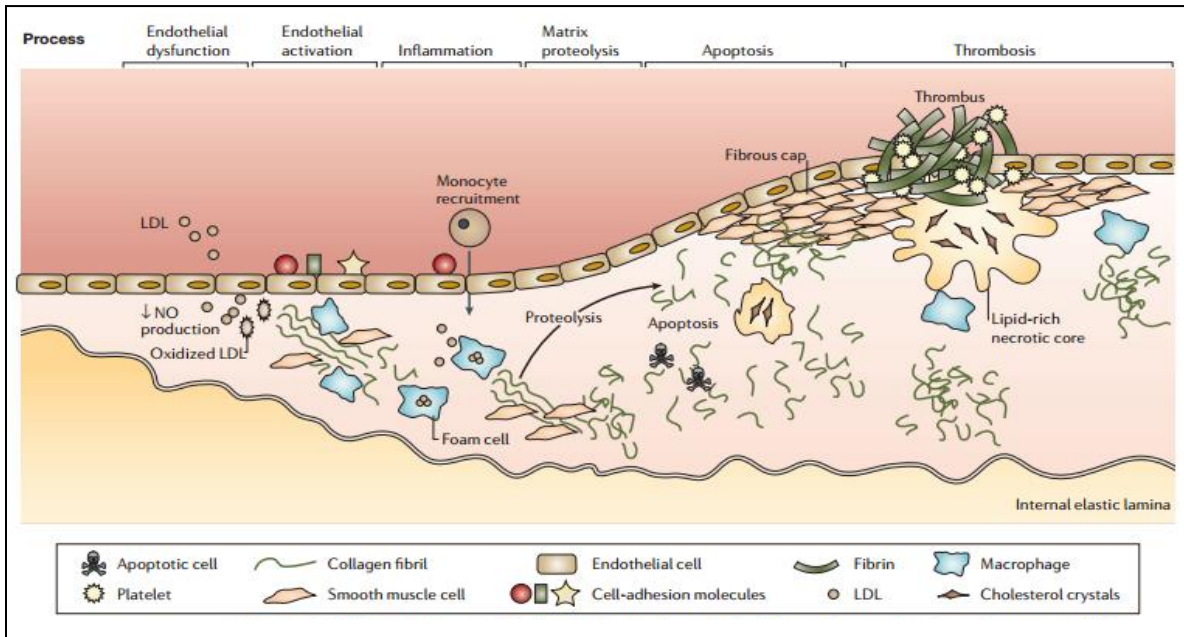


Figure 8. Processus cellulaires et développement de l'athérosclérose

L'altération de la fonction endothéliale est en partie causée par la diminution de la biodisponibilité du monoxyde d'azote (NO). Les LDL sont localisées dans l'espace sous-endothélial où elles s'oxydent et activent les cellules endothéliales. L'expression de molécules d'adhésion, de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires permet l'invasion de l'intima par les monocytes circulants qui se différencient en macrophages pro-inflammatoires. Ces macrophages internalisent les LDLox et se transforment en cellules spumeuses. La mort de ces cellules induit la formation du core nécrotique de la plaque d'athérome. L'infiltration de cellules inflammatoires, l'apoptose des CMLV et la dégradation de la matrice extracellulaire (par protéolyse par les MMP) génèrent une plaque vulnérable avec une chape fibreuse fine et un noyau nécrotique riche en lipides (91).

D'autres CMLV subissent un changement de phénotype et passent d'un état contractile/quiescent à un phénotype prolifératif/sécrétoire, à l'origine de la synthèse d'une matrice extracellulaire riche en éléments fibreux tels que le collagène et l'élastine (102). Ainsi, le cœur nécrotique est consolidé par une chape fibreuse dont l'intégrité est essentielle à la cohésion et à la stabilité de la plaque.

b. Progression

L'athérosclérose est une pathologie qui évolue à bas bruit dès le plus jeune âge et ses symptômes ne se révèlent que plusieurs années après l'apparition des premières lésions. L'évolution de la plaque en fonction de l'âge se fait par une progression parallèle du centre lipidique et de la chape fibreuse. D'après Stary et *al.* cette évolution peut être résumée en six stades, en fonction de critères histologiques, histochimiques, de la structure et de l'ultrastructure des cellules et des composants de la matrice.

- *Stade I ou lésion initiale* : ce stade, détectable macroscopiquement, est caractérisé par l'accumulation de petits groupes de macrophages spumeux dans l'intima. Ce type de lésion est réversible et il est le seul retrouvé chez les enfants de moins de dix ans.
- *Stade II ou strie lipidique* : ce stade apparaît durant l'enfance et il est détectable macroscopiquement. Il est caractérisé par la présence d'une couche de macrophages spumeux disposés en couches stratifiées et est caractérisé par la présence de dépôts lipidiques extracellulaires. Ce type de lésion est réversible.
- *Stade III ou pré-athérome (plaque jeune)* : le pré-athérome est irréversible et il est constitué légèrement avant 40 ans. Il se caractérise par de multiples petits dépôts lipidiques extracellulaires disséminés qui conduisent à une désorganisation de l'intima.

Les lésions de types I, II et III sont des lésions précoces qui se développent dès l'enfance jusqu'à environ 30 ans et qui peuvent évoluer et se transformer en lésions avancées de types IV, V et VI :

- *Stade IV ou plaque d'athérome fibro-lipidique* : ce stade est caractérisé par la présence de multiples dépôts lipidiques massifs et confluents, responsables de la formation du cœur lipidique, l'athérome.
- *Stade V ou fibro-athérome* : ce stade est caractérisé par une plaque calcifiée et il est associé à des dépôts importants de collagène, responsables de la formation de la chape fibreuse qui entoure le noyau lipidique.
- *Stade VI ou plaque compliquée* : c'est le stade le plus complexe qui peut être associé à de graves manifestations cliniques. La fragilisation de la chape fibreuse

induit une instabilité de la plaque d'athérome qui peut subir une érosion de son revêtement endothélial et induire une thrombose (81, 91, 104) (Figure 9).

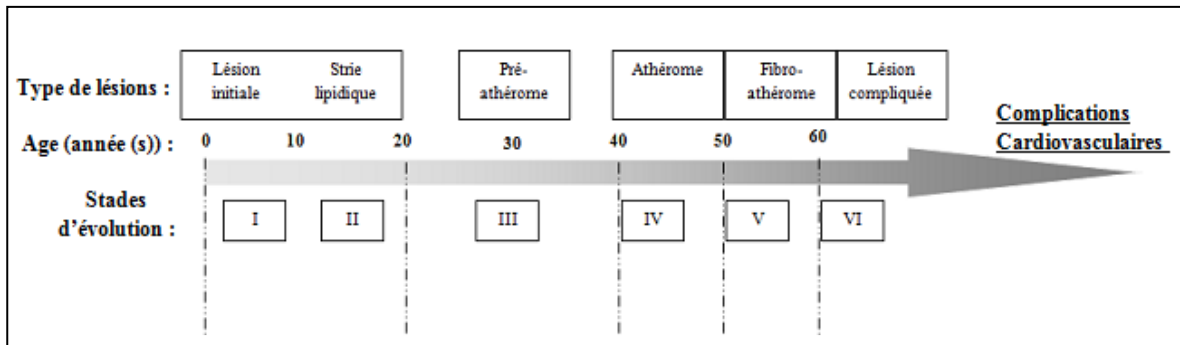


Figure 9. Développement de la plaque d'athérome avec l'âge (81)

3. L'athérosclérose: rôle de l'inflammasome NLRP3

L'internalisation non spécifique des LDLox par les macrophages présents au niveau de la paroi artérielle aboutit à la formation de dépôts de cholestérol sous forme de cristaux. Ces dépôts s'accumulent dès les premiers stades de l'athérosclérose et sont formés principalement de cholestérol monohydraté (105). Ces cristaux jouent un rôle critique dans les étapes initiales de la formation des plaques d'athérome et le développement du core nécrotique.

Il a été démontré que les cristaux de cholestérol activent l'inflammasome NLRP3 des macrophages présents au niveau de la paroi vasculaire et induisent la production de l'IL-1 β et de l'IL-18 (105). Cette activation est initiée par un 'priming' ou signal «1», déclenché par les mmLDL (*minimally modified-LDL*) (106) au niveau des récepteurs TLR, TLR4 et TLR6. Les mmLDL sont d'abord reconnues par le récepteur CD14 (106). La reconnaissance spécifique des mmLDL par ces récepteurs induit la formation du complexe hétérodimérique TLR4-TLR6. Une fois activé par les mmLDL, ce complexe recrute la molécule adaptatrice MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene*) (88) à travers le domaine 'Toll' du récepteur IL-1R (107, 108). La voie de signalisation MyD88-dépendante implique la kinase IRAK-4 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 4*), la famille des MAPK kinases (*Mitogen activate protein kinase*), comme la kinase TAK1 (*TGF- β -activated kinase 1*) et la kinase MEKK3 (*MEK kinase 3*). L'activation de ces kinases induit l'activation de la voie NF- κ B et la sécrétion de la pro-IL-1 β et de la

pro-IL-18 biologiquement inactives. La voie de signalisation MyD88-dépendante déclenchée par les mmLDL est associée à une production des ROS au niveau intracellulaire (109).

L'étape de '*priming*' est suivie par une activation de l'inflammasome NLRP3 des macrophages par les cristaux de cholestérol, le signal «2». Ces cristaux sont ingérés par phagocytose, ce qui induit un déséquilibre ionique dû essentiellement à un efflux des ions K⁺. La phagocytose est associée à une déstabilisation lysosomale, ce qui induit la rupture des lysosomes (110) et la libération des protéases lysosomales, la cathépsine B et la cathépsine L (106), au niveau du cytoplasme. L'augmentation intracellulaire des ROS, l'efflux ionique, la libération du contenu protéolytique mais aussi le pH acide des lysosomes induisent l'assemblage de l'inflammasome NLRP3 et l'activation de l'IL-1 β et de l'IL-18 par un mécanisme inconnu (109, 111).

L'hyperlipidémie et l'oxydation des LDL entraînent une inflammation de la paroi vasculaire, ce qui déclenche la phase initiale de l'athérosclérose. Celle-ci favorise l'accumulation des cristaux de cholestérol qui activent à leur tour l'inflammasome NLRP3 et induisent la sécrétion de l'IL-1 β et de l'IL-18 biologiquement actives, créant ainsi un véritable cercle vicieux (Figure 10). L'IL-1 β et l'IL-18 jouent un rôle majeur au cours de l'athérogenèse et agissent de façon autocrine et paracrine en modulant l'expression de nombreux gènes via leurs voies de signalisation. Elles exercent des effets pro-inflammatoires très importants par l'induction de la maturation des cellules T et des cellules NK (*natural killer*), par l'activation des macrophages et par la production d'autres cytokines, de chémokines et de molécules d'adhésion (112, 113). L'IL-1 β intervient dans l'amplification de la réaction inflammatoire en activant les enzymes de la voie de biosynthèse de la prostaglandine E2 dans les CMLV. Ces effets pro-inflammatoires sont fortement impliqués dans l'initiation, le développement et la progression de l'athérosclérose. Quand elles sont exprimées par les macrophages infiltrés au niveau de la paroi artérielle, l'IL-1 β et l'IL-18 exercent des effets pro-athérogènes et induisent la formation de la chape fibreuse en provoquant la migration et la prolifération des CMLV. En effet l'IL-1 β et l'IL-18 induisent (i) la production d'IFN- γ (Interféron gamma) qui amplifie l'inflammation et inhibe la fibroprolifération et le développement d'un fibroathérome (115, 116), (ii) une augmentation de l'activité collagénolytique des

CMLV et une inhibition de la synthèse du collagène, ce qui contribue à la résistance de la chape fibreuse et à la rupture de la plaque (117) et (iii) une augmentation de l'expression des métalloprotéases par les macrophages et les CMLV, ce qui contribue à la déstabilisation de la plaque et à la dysfonction cardiaque (115, 118).

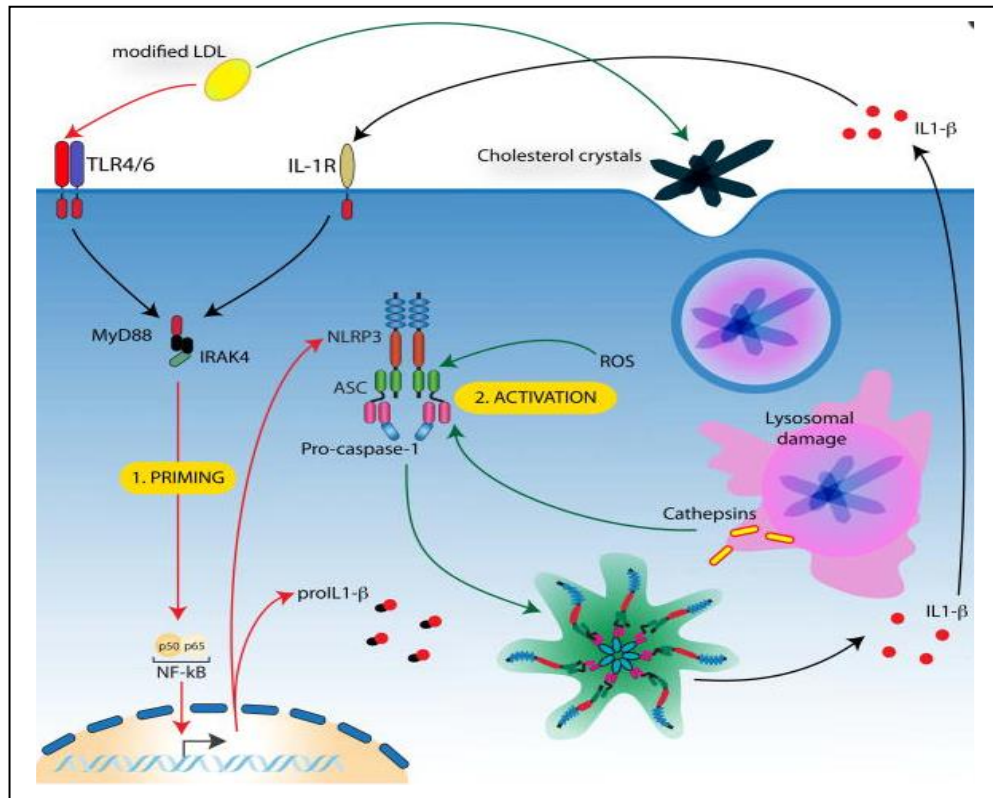


Figure 10. Activation de l'inflammasome NLRP3 au cours de l'athérosclérose

Les mmLDL s'accumulent au niveau des plaques d'athérome et induisent un 'priming' au niveau de l'hétérodimère TLR4/TLR6. Ce complexe recrute la molécule MyD88 à travers le domaine 'Toll' du récepteur IL-1R. La MyD88 recrute à son tour l'IRAK4 qui active la voie NF-κB et induit la sécrétion de la pro-IL-1β et de la pro-IL-18. La phagocytose des cristaux de cholestérol induit une libération des cathepsines B et L et une augmentation des ROS, ce qui induit l'activation de l'inflammasome NLRP3, de l'IL-1β et de l'IL-18. Ces deux cytokines jouent un rôle essentiel dans la régulation des protéines de l'inflammasome NLRP3, l'induction des réactions inflammatoires et la progression de la formation des plaques d'athérome (114).

Ainsi, l'IL-1β et l'IL-18 induisent la formation des plaques vulnérables qui sont associées le plus souvent à un syndrome coronarien aigu qui parfois culmine en mort subite.

CHAPITRE III

L'INFLAMMASOME NLRP3 & LE DIABETE DE TYPE 2

I. GENERALITES

1. Définition

Les maladies cardiovasculaires, notamment l'athérosclérose, sont associées à un DT2 auquel l'inflammasome NLRP3 est fortement impliqué. Le DT2 (précédemment appelé diabète non insulino-dépendant ou diabète de la maturité) est défini par un désordre chronique, caractérisé par une altération du métabolisme lipidique et glucidique liée à une déficience soit de la sécrétion d'insuline (dysfonction des cellules β -pancréatiques), soit de l'action de l'insuline (insulinorésistance) (119).

Le DT2 est une maladie multifactorielle, hétérogène et polygénique (119). Elle peut être déclenchée par l'interaction d'anomalies de plusieurs gènes intervenants dans le déterminisme du DT2 (tels les gènes de la glucokinase, du glucagon, etc) et qui s'expriment en présence de facteurs environnementaux comme l'obésité, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, etc (120).

2. Manifestations cliniques

Les patients atteints d'un DT2 présentent un risque accru de complications microangiopathiques (rétinopathie, néphropathie et neuropathie) et macroangiopathiques (athérosclérose, infarctus du myocarde). Les complications cardiovasculaires représentent la principale cause de mortalité et de morbidité dans le cas d'un DT2. Le risque de développement de maladie artérielle périphérique (121), de maladie coronarienne (122) et de maladie cérébrovasculaire (123) est multiplié par 2 ou 3 chez les diabétiques de type 2. Bien que les femmes connaissent une relative protection contre les maladies cardiovasculaires par rapport aux hommes, chez elles le DT2 multiplie ces risques cardiovasculaires par un facteur de 3 à 5 (124, 125, 126, 127). L'atteinte vasculaire chez

le diabétique, en particulier l'athérosclérose, se distingue par la précocité d'apparition, les localisations multiples (coronaires, artères cérébrales, artères périphériques) et la gravité évolutive. Cette précocité est due essentiellement à une altération des fonctions des artères, ce qui prédispose les diabétiques de type 2 à une athérosclérose sévère. L'hyperglycémie, l'hyperlipidémie et l'insulinorésistance sont les acteurs majeurs responsables de cette altération qui regroupe (i) l'altération de la fonction endothéliale (128, 129), (ii) le dysfonctionnement des CMLV (128), l'altération de la fonction plaquettaire (130) et (iii) l'induction d'une thrombose artérielle (131).

3. Epidémiologie

En 2010, 285 millions de personnes dans le monde étaient atteintes de diabète, parmi lesquelles 90% avait un DT2, l'équivalent d'environ 2,4 millions de sujets en France (132). D'après les prévisions de l'OMS, ce nombre devrait passer de 285 à 439 millions en 2030, ce qui représentera 7,7% de la population âgée de 20 à 79 ans (133).

L'Asie constitue l'épicentre mondial de l'épidémie de DT2 (134). L'accroissement de la prévalence du DT2 est particulièrement alarmant au sein de la population indienne et chinoise. Cet accroissement est dû à une démographie et une urbanisation croissantes. En 1980, la prévalence du DT2 en Chine était inférieure à 1%. En 2007, cette prévalence a atteint 92 millions d'adultes diabétiques (environ 9,7% de la population totale) et plus de 148,2 millions d'adultes pré-diabétiques (environ 15,5%) (135). Chez la population chinoise âgée de 35 à 74 ans, entre les années 2001/2002 et 2006 la prévalence du DT2 en milieu rural est passée de 5,3% à 14,2% chez les hommes et de 8,9% à 13,8% chez les femmes. Alors qu'en milieu urbain, cette prévalence est passée de 11,3% à 19,2% chez les hommes et de 11,3% à 16,1% chez les femmes (136). En Inde, la prévalence du DT2 est passée de 13,9% en 2000 à 18,2% en 2006 en milieu urbain et de 6,4% à 9,2% en milieu rural (137).

II. RAPPEL SUR LA PHYSIOPATHOLOGIE DU DIABETE DE TYPE 2

L'anomalie métabolique fondamentale responsable de l'installation du DT2 est l'insulinorésistance des tissus périphériques (le muscle, le foie et le tissu adipeux), ce qui entraîne une hypersécrétion insulinaire. Cette étape est suivie par une diminution de la sécrétion de l'insuline, l'insulinodéficiência, qui provoque une hyperglycémie responsable

de la glucotoxicité et de la mort des cellules β -pancréatiques par apoptose. Il s'agit d'une insulino-résistance essentiellement musculaire où la voie métabolique non-oxydative du glucose, la glycogénogenèse, est altérée. L'insulino-résistance est induite suite à un excès pondéral et suite à l'inflation du tissu adipeux viscéral qui libère une grande quantité d'acides gras libres. Au niveau musculaire, les acides gras libres sont préférentiellement oxydés, aboutissant à une élévation des taux cellulaires d'acétyl-CoA (acétyl coenzyme A). Par son action sur certains enzymes, l'acétyl-CoA augmente la néoglucogenèse et diminue la glycolyse et la glycogénogenèse. Le stockage et l'utilisation du glucose sont cependant diminués et le débit hépatique du glucose est augmenté.

Les anomalies génétiques jouent un rôle important dans la survenue d'un DT2. Cette part héréditaire est à l'origine de plusieurs formes de DT2 : les formes monogéniques telles que les diabètes MODY (*Maturity onset diabetes of the young*) et les formes communes ou polygéniques. La plupart des mutations responsables d'un DT2 influent sur la sécrétion de l'insuline.

Comme le DT2 est une pathologie multifactorielle dont le trouble du métabolisme glucidique et insulinique est fondé sur des mécanismes d'actions complexes, nous nous sommes focalisés sur l'inflammation et le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la physiopathologie du DT2 et l'apoptose des cellules β -pancréatiques.

1. Inflammation des cellules β -pancréatiques

Des données récentes proposent des mécanismes moléculaires communs entre les voies de signalisation inflammatoires et les voies de signalisation insuliniques aboutissant à une insulino-résistance et à une dysfonction endothéliale, ce qui prédispose à des désordres cardiovasculaires comme l'athérosclérose (138, 139). Les avancées dans la compréhension du mécanisme physiopathologique du DT2 montrent que l'inflammation chronique est le lien entre le dysfonctionnement du tissu adipeux, l'insulino-résistance, les pathologies métaboliques et vasculaires. Dans le DT2, le rôle des médiateurs pro-inflammatoires, l'IL-1 β et l'IL-18, est fortement suggéré dans la contribution de l'apoptose et dans l'altération progressive de la fonction et de la masse des cellules β -pancréatiques. Il a été démontré que le traitement des îlots de donneurs d'organes non-diabétiques par des concentrations élevées de glucose induit une augmentation de l'expression de l'IL-1 β , suivie par une activation de la voie NF-kB, l'activation du

récepteur FAS (*Fas cell surface death receptor*), la fragmentation de l'ADN et l'altération de la fonction des cellules β -pancréatiques. De plus, l'antagoniste du récepteur IL-1 (IL-1Ra) protège les îlots humains en culture de ces effets délétères (140). Il a été démontré que l'hyperlipidémie induite suite à la surcharge pondérale initie la production de l'IL-1 β dans le tissu adipeux via l'activation de l'inflammasome NLRP3, ce qui conduit à l'insulinorésistance et favorise l'hyperglycémie. Au niveau des cellules β -pancréatiques, l'hyperglycémie provoque une altération de la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale et un stress au niveau du réticulum endoplasmique. Ces dysfonctionnements induisent un stress oxydant dû à une accumulation des ROS au niveau intracellulaire (141, 142). Les ROS, à des taux élevés, induisent la libération du TXNIP (*Thioredoxin Interacting Protein*), l'inhibiteur endogène du système antioxydant, le système de la Trx-1 (*Thioredoxin-1*) (143). Le TXNIP est une protéine intracellulaire qui s'associe à la Trx-1 en formant le complexe Trx-1/TXNIP. L'accumulation intracellulaire des ROS dissocie ce complexe, ce qui permet à la Trx-1 d'exercer ses effets antioxydants et anti-inflammatoires alors que le TXNIP exerce des effets pro-inflammatoires en induisant la mort des cellules β -pancréatiques par l'inhibition du captage et du catabolisme du glucose (144). De plus, le TXNIP libéré joue le rôle d'un activateur endogène de l'inflammasome NLRP3 des cellules β -pancréatiques et induit le clivage et l'activation des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et l'IL-18 (145). Une fois activée, l'IL-1 β agit de manière autocrine et/ou paracrine en aggravant l'environnement inflammatoire généré au niveau des îlots de Langerhans. En effet, l'IL-1 β induit la sécrétion d'autres cytokines pro-inflammatoires et l'expression de chémokines et favorise ainsi l'infiltration des cellules β -pancréatiques par les macrophages pro-inflammatoires (146) (Figure 11).

Parallèlement à la sécrétion de l'insuline et en réponse à l'hyperglycémie chronique, les cellules β -pancréatiques sécrètent de l'amyline (appelé aussi IAPP [*islet amyloid polypeptide*]). L'amyline est déposée sous forme de fibrilles au niveau des îlots de Langerhans ; cependant l'amyloïdogénèse reste inconnue. Ce polypeptide de 37 acides aminés induit une déstabilisation lysosomale au niveau des macrophages infiltrés et active l'inflammasome NLRP3. Cette activation est précédée par un '*priming*' déclenché au niveau du récepteur TLR 4 par les mmLDL, ce qui active la voie NF- κ B et induit la

sécrétion de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 biologiquement inactives (147). L'expression des chémokines par les cellules β -pancréatiques et l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-18 par les macrophages infiltrés aggravent l'inflammation et altèrent la sécrétion et la sensibilité à l'insuline. L'environnement inflammatoire chronique ainsi que l'effet toxique du glucose et des lipides provoquent l'épuisement et la mort des cellules β -pancréatiques par apoptose. Ainsi, l'IL-1 β et l'IL-18 aggravent la progression du DT2 en induisant de nombreuses complications cardiovasculaires potentiellement graves (148) (Figure 11).

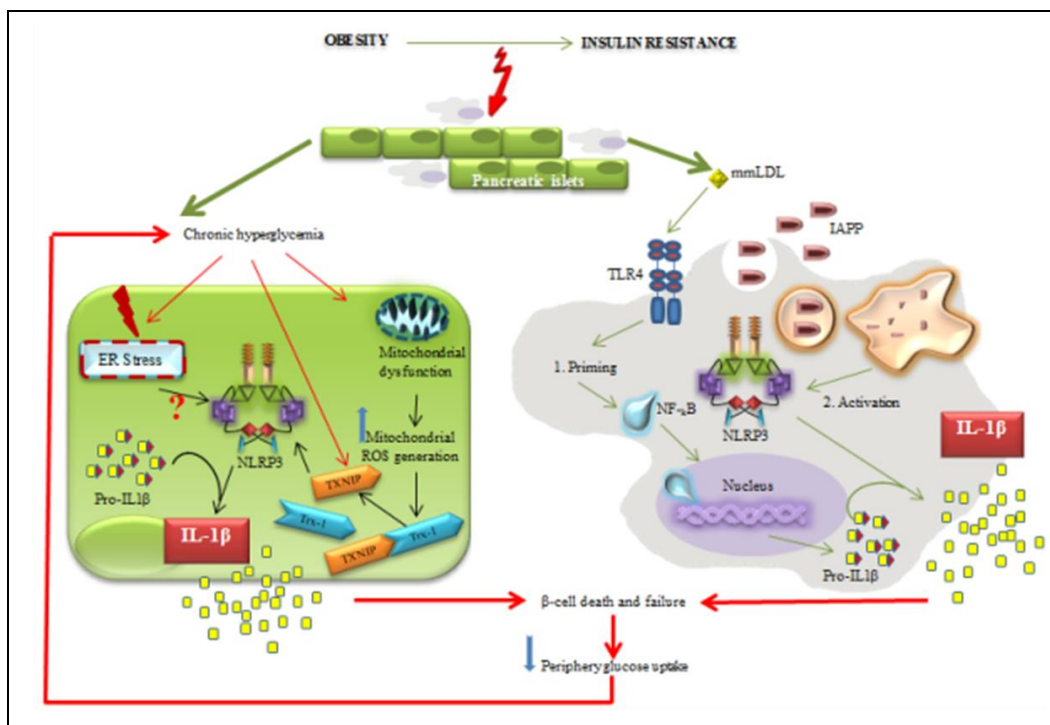


Figure 11. Activation de l'inflammasome NLRP3 au cours du diabète de type 2

Au niveau des cellules β -pancréatiques, l'hyperglycémie induit une dysfonction mitochondriale et un stress au niveau du réticulum endoplasmique. La dysfonction mitochondriale est associée à une augmentation intracellulaire des ROS, ce qui entraîne l'activation de l'inflammasome NLRP3 à travers un mécanisme TXNIP-dépendant. Par contre, le mécanisme d'activation de l'inflammasome NLRP3 induit par le stress du réticulum endoplasmique est inconnu. Le NLRP3 des macrophages infiltrés dans le pancréas est activé par les IAPP suite à un 'priming' induit par les mmLDL. L'activation de l'inflammasome NLRP3 induit l'activation de l'IL-1 β ce qui provoque le dysfonctionnement et la mort des cellules β -pancréatiques.

2. Apoptose des cellules pancréatiques

L'apoptose des îlots pancréatiques dans le DT2 peut être induite par les cytokines pro-inflammatoires, l'altération de la fonction mitochondriale et par le stress du réticulum endoplasmique. Ces trois mécanismes sont induits en réponse aux désordres métaboliques associés au développement du DT2 comme la glucotoxicité et la lipotoxicité.

a. La glucotoxicité

Une étude a démontré qu'une incubation d'îlots de Langerhans humains avec des concentrations élevées de glucose est associée à une augmentation de l'expression des marqueurs d'apoptose. L'hyperglycémie induite au niveau des îlots de Langerhans est associée à un excès de stress oxydant induit par la génération de ROS d'origine mitochondriale (149). Sachant que les cellules pancréatiques sont très sensibles au stress oxydant en raison de leur très faible expression d'enzymes anti-oxydantes, l'excès de ROS est associé à une induction de la mort des cellules β -pancréatiques par apoptose.

La signalisation de l'insuline joue un rôle important dans le maintien de la fonction et de la survie des cellules β -pancréatiques. Il a été démontré que l'hyperglycémie induit la synthèse d'hexosamine au niveau des îlots de Langerhans. Le traitement des cellules β -pancréatiques par la glucosamine, précurseur direct de la voie de synthèse d'hexosamine, induit une inhibition significative des premières étapes de la signalisation d'insuline incluant la phosphorylation des récepteurs IRS-1 (*Insulin receptor substrate-1*) et IRS-2 et réduit l'activité de la PI3-kinase (phosphatidylinositide 3-kinase). De plus, l'action inhibitrice de l'insuline sur l'expression de la protéine Bim, exerçant un effet pro-apoptotique en séquestrant les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) et Bcl-XL, est réduit d'environ 40% au niveau des cellules β -pancréatiques traitées par la glucosamine. Cette étude montre que l'hyperglycémie induit un déséquilibre entre l'expression de Bim et l'expression des protéines anti-apoptotiques telles que la Bcl-2 et la Bcl-XL. Ainsi, l'hyperglycémie induit l'apoptose des cellules β -pancréatiques à travers l'induction de la voie de synthèse d'hexosamine (150).

b. La lipotoxicité

Selon Poitout et Robertson, la glucotoxicité est strictement associée à une lipotoxicité. Ces deux complices sont impliqués dans le cercle vicieux du DT2 à travers leur effet

commun dans l'induction du stress oxydant au niveau des cellules β -pancréatiques (151). Les acides gras libres et les lipoprotéines exercent des effets pro-apoptotiques. L'exposition prolongée des îlots de Langerhans humains aux acides gras libres comme le palmitate est associé à des effets toxiques, alors que les acides gras monoinsaturés comme l'oléate protègent les cellules de l'apoptose induite par l'hyperglycémie et le palmitate (152, 153). Il a été démontré que l'activation de l'Akt (connue aussi sous le nom de *Protein kinase B* [PKB]) inhibe l'activité des composantes indispensables à l'installation de l'apoptose cellulaire comme le Bad, la synthèse du cytochrome c et la caspase-9 (154). Une étude a démontré qu'au niveau des îlots de Langerhans humains, les acides gras libres induisent l'apoptose de manière caspase-dépendante en inhibant à la fois l'expression de l'ARNm de Bcl-2 et la phosphorylation de l'Akt (153).

OBJECTIF DE LA THESE

L'inflammation est un élément clé dans l'installation et la progression d'un grand nombre de pathologies, allant du syndrome métabolique en passant par les maladies cardiovasculaires, les accidents cérébrovasculaires, les pathologies des articulations, la maladie d'Alzheimer et d'autres pathologies.

A l'origine d'une très forte morbi-mortalité et d'un coût socio-économique particulièrement lourd, l'athérosclérose, le DT2 et leurs complications font l'objet d'une attention soutenue de la part de la communauté scientifique. C'est dire l'importance d'une prévention précoce qui devrait être idéalement instaurée avant l'initiation de l'inflammation. Cette prévention nécessite l'identification d'un système pro-inflammatoire commun déclenchant l'athérosclérose et le DT2, l'inflammasome NLRP3. Plus de 90 mutations localisées sur le gène de CIAS codant pour la protéine Nlrp3 sont associées à des pathologies inflammatoires. L'inflammasome NLRP3 est aujourd'hui le système pro-inflammatoire le mieux caractérisé en termes de nombre de signaux activateurs, en termes de nombre de maladies associées mais aussi en termes d'implications physiopathologiques. Néanmoins, son implication dans la pathologie de l'athérosclérose et le DT2 demeure controversée et/ou mal élucidée.

L'objectif de cette thèse est d'identifier et de caractériser, dans le contexte de l'athérosclérose et du DT2, un inhibiteur spécifique de l'inflammasome NLRP3, afin de mettre au point une nouvelle approche thérapeutique fondée sur l'utilisation d'une molécule naturelle qui pourrait contribuer à limiter l'évolution des plaques d'athérosclérose, l'installation du DT2 et la survenue des complications qui leur sont associées.

Notre travail porte sur deux parties :

- Comme son rôle est controversé, nous avons étudié, dans un premier temps, l'implication de l'inflammasome NLRP3 dans l'installation de l'athérosclérose. Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de l'Arglabine, inhibiteur spécifique de l'inflammasome NLRP3, sur les paramètres métaboliques et vasculaires impliqués dans la formation des plaques d'athérome.

- Dans la deuxième partie, nous avons étudié l'effet de cet inhibiteur sur les paramètres métaboliques impliqués dans l'installation du DT2 ainsi que son effet sur la mort des cellules β -pancréatiques par apoptose.



Matériels & Méthodes

Les lactones sesquiterpéniques sont l'un des plus grands groupes de substances d'origine naturelle (155). Plus de 5000 structures ont été isolées. Leur structure particulière de 15 carbones qui se caractérise par l'enchaînement α -méthylène- γ -lactone leur confère des possibilités de réactivité biologique incontestables. Les lactones sesquiterpéniques sont connues depuis 1830. Elles sont subdivisées sur la base de leur squelette carbocyclique en plusieurs classes telles que les germacranolides, les guaianolides ou encore les eudesmanolides (155).

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la classe des guaianolides dont l'Arglabine est l'un des membres les plus éminents. Connue pour ses vertus cytotoxiques et anti-tumorales, la molécule d'Arglabine est un extrait d'une plante vivace du genre *Artemisia* (les armoises), espèce *glabella* (*A. glabella*) (Figure 12). Cette espèce de plante est endémique des collines des steppes sèches de la région de Karaganda, en république de Kazakhstan (156).



Figure 12. *Artemisia glabella*

En collaboration avec le laboratoire du Professeur Thomas Simmet (*Institute of Pharmacology of Natural Products & Clinical Pharmacology, Ulm University, Ulm, Germany*), nous avons extrait la molécule d'Arglabine de la plante *A. glabella*. Nous avons ensuite vérifié sa pureté par chromatographie analytique en phase liquide à haute performance (HPLC) et sa formule chimique a été confirmée par spectrométrie de masse.

I. L'ARGLABINE

1. Matière végétale et extraction

Les lactones sesquiterpéniques, y compris l'Arglabine, présentent une distribution assez sporadique et sont fréquemment localisées au niveau des poils sécréteurs situés au niveau des feuilles, des tiges et des bractées de l'inflorescence. Les parties aériennes de la plante *A. glabella* ont été récoltées en période de floraison (environ 7,7 kg) et, après séchage, ont été soumises à une extraction par le chloroforme à une température de 45-50°C. L'extrait a été précipité durant 24 h avec un mélange de méthanol et d'eau, à température ambiante. Après incubation, le précipité a été filtré et le résidu a été bien lavé. Nous avons ensuite procédé à une évaporation et une distillation sous vide du filtrat résiduel, conduisant à environ 286 g d'extrait brut.

2. Séparation chromatographique

L'extrait brut d'*A. glabella* a été dissout et séparé par HPLC en phase inverse permettant d'atteindre une pureté finale supérieure à 99,9%. En effet, la totalité de l'extrait brut a été déposée sur une colonne Reprosil PUR ODS-3 et a été ensuite éluée avec un mélange méthanol-eau. La fraction Arglabine a été détectée à l'aide d'un détecteur-intégrateur UV à barrette de photodiodes réglé à 210 et 250 nm. La pureté a été vérifiée par chromatographie sur couche mince de haute performance en utilisant une colonne Reprosil PUR ODS-3. La phase stationnaire utilisée est le gel de silice (SiO₂) sur lequel nous avons greffé des groupes octadécyles (18 atomes de carbone) et le mélange méthanol-eau a été utilisé comme phase mobile. L'Arglabine pure (99,9%) représente environ 11,7% de l'extrait brut. La formule chimique de la molécule d'Arglabine a été analysée sur un spectromètre de masse Finnigan MAT modèle TSQ 700, par ionisation chimique. La masse moléculaire a été déduite de la valeur m/z (masse/charge) du pic moléculaire 246 [M]⁺ (157, 158, 159). Une solution mère de 20 mM d'Arglabine a été préparée dans du DMSO pur et conservée sous argon à -20°C.

II. ETUDE *IN VITRO*

1. Culture cellulaire et conditions de culture

a. Macrophages péritonéaux de souris

- Prélèvement

Nous avons injecté 2 ml d'une solution de thioglycolate à 4% dans la cavité péritonéale de souris adultes C57BL/6. Le thioglycolate induit une inflammation au niveau péritonéal, ce qui attire les monocytes circulants qui se différencient alors en macrophages. Après 5 jours, les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale et les macrophages péritonéaux ont été prélevés dans des conditions stériles, selon la méthode décrite par Ray A. et Dittel B.N. en 2010 (voir vidéo: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3152216/>) (160). La cavité péritonéale de chaque souris a été lavée au moyen de 10 ml du PBS froid et le milieu récupéré a été centrifugé pendant 5 minutes à 800 rpm à 4°C. Le culot cellulaire a été resuspendu dans du RPMI 1640 contenant 2 mM de glutamine, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Invitrogen, Paris, France). Les cellules ont été ensuiteensemencées dans des boîtes de culture de douze puits (0,5 x 10⁶ cellules/puits) puis incubées à 37°C, sous atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. Après une heure d'incubation nécessaire à l'adhésion des macrophages, 3 lavages au PBS ont été effectués et les cellules ont été incubées dans du RPMI supplémenté en sérum de veau fœtal (10% SVF) (Invitrogen, Paris, France) pendant une nuit.

- Stimulation des macrophages péritonéaux

Dans un premier temps, les macrophages ont été stimulés par 10 ng/ml de LPS (*Lipopolysaccharide from Escherichia coli serotype, Sigma*) pendant 4 heures, afin de déclencher le signal «1» ou étape de '*priming*'. Les macrophages ont été ensuite traités avec différentes doses d'Arglabine (1, 10, 25 et 50 nM) durant 1 heure, avant la dernière étape d'activation de l'inflammasome NLRP3 (signal «2») induite par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol pendant 24 h (Figure 13). Les cristaux de cholestérol ont été obtenus en collaboration avec le laboratoire du Professeur Thomas Simmet, selon la méthode de DUEWELL et al. (161). Brièvement, cette méthode consiste en une recristallisation de cholestérol monohydraté (*Sigma*) suite à six cycles de solubilisation

dans de l'acétone chaud et de cristallisation par refroidissement. La pureté des cristaux de cholestérol a été vérifiée à l'aide d'un spectromètre de masse couplé à un chromatographe en phase gazeuse et les analyses ont été réalisées par impact électronique (161).

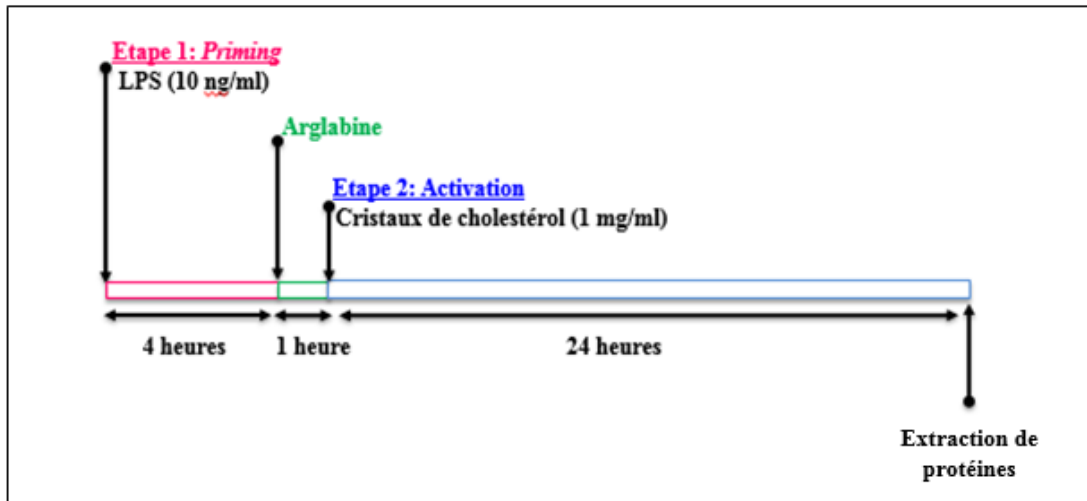


Figure 13. Représentation schématique des conditions de traitement des macrophages péritonéaux

Les cellules ont été d'abord stimulées par le LPS (10 ng/ml), traitées dans un 2^{ème} temps avec différentes doses d'Arglabine (1, 10, 25 et 50 nM) pendant 1 heure. L'inflammasome NLRP3 a été ensuite stimulé par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol. Après 24 heures de traitement, nous avons procédé à l'extraction des protéines totales.

b. La lignée de cellules β -pancréatique, INS-1

Les cellules INS-1 de rat ont été cultivées dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10 mM d'HEPES, 50 mM de β -mercaptoethanol, 1 mM de sodium pyruvate, 10% de SVF, 100 U/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine (*Invitrogen, Paris, France*) et incubées à 37°C, sous atmosphère humidifiée 5% CO₂.

Dans un premier temps, nous avons traité les INS-1 selon le protocole décrit dans la Figure 13 afin de tester l'impact de différentes doses d'Arglabine sur les cellules pancréatiques. Nous avons ensuite étudié cet effet en présence de 200 nM de Rapamycine et en présence de 10 mM de 3-Methyladenine (3-MA). Le traitement des cellules INS-1 par la Rapamycine induit un mécanisme cellulaire protecteur, l'autophagie, en favorisant la formation des autophagosomes et la fusion autophagosome-lysosome (162). Par contre, le traitement par le 3-MA inhibe la formation des autophagosomes en bloquant l'activité

de l'une des enzymes clés de la voie PKB/Akt, la kinase PI3K de type III (*Phosphatidylinositide 3-kinase*), enzyme essentielle à l'induction d'autophagie (163).

2. Culture des îlots de langerhans

a. Prélèvement

Les îlots de Langerhans ont été prélevés suite à une injection de 4 ml d'une solution de collagénase à 1 mg/ml (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO*) au niveau du canal cholédoque de souris ApoE₂.Ki. et de souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}. Les pancréas ont été ensuite digérés à 37°C durant 20 min. La digestion enzymatique a été arrêtée par l'ajout de sérum HBSS froid. Après une série de lavages à froid par le sérum, les îlots de Langerhans ont été triés et comptés sous microscope. Le nombre maximal d'îlots de Langerhans que nous avons prélevés a été estimé à 800 îlots par souris.

b. Mise en culture

Nous avons étudié l'impact des différentes doses d'Arglabine sur l'activité de l'inflammasome NLRP3 (Figure 13) au niveau des îlots de Langerhans de souris ApoE₂.Ki. La spécificité de l'effet d'Arglabine pour l'inflammasome NLRP3 a été testée en étudiant son effet sur les îlots de Langerhans de souris ApoE₂.Ki /NLRP3^{-/-}.

3. Test de viabilité cellulaire

L'Arglabine est une molécule dont l'effet n'a pas été encore élucidé. Dans un premier temps, il était donc indispensable de mettre en évidence l'effet de différentes concentrations d'Arglabine sur la viabilité cellulaire par le test de la lactate déshydrogénase (LDH). Les cellules mortes présentent une membrane perméabilisée qui libère leur contenu cytosolique, tel que la LDH, dans le milieu extracellulaire. La LDH est une enzyme glycolytique qui oxyde le lactate en pyruvate, en transférant des électrons vers le cofacteur nicotinamide-adénine-dinucléotide (NAD⁺) pour former le NADH. Ce dernier cède des électrons à la flavine adénine dinucléotide (FAD⁺) qui forme un complexe avec la diaphorase (Figure 14). Cette enzyme catalyse la réduction du sel de tétrazolium (jaune) en formazan (rouge).

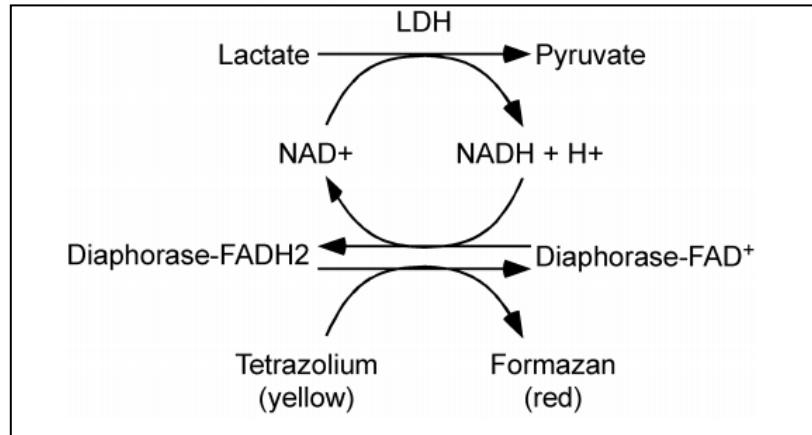


Figure 14. Principe du test de viabilité cellulaire de la lactate déshydrogénase

La LDH oxyde le lactate en pyruvate en réduisant le NAD⁺ en NADH. Ce dernier est oxydé en NAD⁺ et réduit le complexe diaphorase-FAD⁺ en diaphorase-FADH₂ qui réduit le tétrazolium en formazan.

L'activité de la LDH peut être dosée par deux méthodes. La méthode 1 reflète le nombre total de cellules vivantes et la méthode 2 évalue l'intégrité de la membrane cellulaire à travers l'évaluation de la quantité de LDH libérée dans le surnageant cellulaire. La lecture est faite par spectrophotométrie à 490 nm et les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au contrôle selon la formule suivante :

$$\%LDH \text{ release} = \frac{(\text{Sample} - \text{Media}) - (\text{Untreated Sample} - \text{Media})}{(\text{Lysis} - \text{Lysis Media}) - (\text{Untreated Sample} - \text{Media})} \times 100$$

4. Dosage des cytokines pro-inflammatoires, ELISA

Après 24 heures de traitement (Figure 13), le surnageant est conservé à -80°C afin de doser les cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et l'IL-18.

a. Dosage de l'IL-1 β

L'IL-1 β sécrétée par les cellules a été dosée par un kit ELISA, *Mouse ELISA Max Deluxe Set, Biolegend*, Paris, France. Une solution d'anticorps primaire polyclonal anti-IL-1 β de souris (100 μ l/puits, dilué au 1/200) a été incubée durant une nuit à 4°C dans une plaque de 96 puits. La plaque a été lavée à l'aide de 300 μ l de la solution de lavage par puits et ensuite incubée pendant 1 heure à température ambiante avec 200 μ l/puits d'une solution de blocage, suivi d'une série de trois lavages. Après le blocage, 100 μ l de chaque

échantillon ont été ajoutés et incubés pendant 2 heures à température ambiante. Après lavages, 100 µl d'anticorps secondaire anti-IL-1β (dilué au 1/200) ont été ajoutés. 1 heure après, la plaque a été lavée et 100 µl d'Avidine-HRP (*Avidin Horseradish Peroxidase*) ont été ajoutés dans tous les puits et la plaque a été incubée pendant 30 minutes à température ambiante. Après cinq lavages, un substrat de la peroxydase (100 µl/puits) a été ajouté. Après 15 minutes, une coloration bleue se développe suite à l'oxydation du substrat. Cette réaction a été arrêtée par l'ajout de 100 µl d'acide sulfurique et un produit de coloration jaune est apparu. L'absorbance de ce produit a été mesurée à 450 nm.

b. Dosage de l'IL-18

L'IL-18 sécrétée par les cellules a été dosée par le kit ELISA, *Mouse IL-18 ELISA kit*, MBL, Paris, France. 100 µl de chaque échantillon ou des dilutions de la gamme étalon ont été transférés dans les puits d'une plaque "précoatée" avec un anticorps monoclonal anti-IL-18 pour une incubation d'une heure à température ambiante. Après lavage, 100 µl d'anticorps monoclonal anti-IL-18 conjugué à la peroxydase ont été ajoutés dans les puits et incubés pendant 1 heure. Par la suite, les puits ont été lavés et incubés avec 100 µl du substrat de la peroxydase durant 30 minutes. La réaction a été arrêtée par l'ajout de 100 µl de la solution stop (acide sulfurique) et l'absorbance a été mesurée à 450 nm.

5. Immuno-détection par Western blot

a. Extraction et dosage de protéines

Après 24 heures de traitement, les cellules ont été récoltées dans un tampon de lyse (Annexe I). L'extrait cellulaire est lysé mécaniquement, pendant 60 minutes, sur une roue à 4°C, avant d'être centrifugé à 14000 rpm à 4°C pendant 10 minutes. Les protéines contenues dans le surnageant ont été dosées par la méthode colorimétrique de Bradford (kit *BCA Protein Assay*, Pierce, Paris, France) avec lecture de densité optique au spectrophotomètre à 570 nm. Une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : de 0 à 2 mg/ml) a été réalisée en parallèle.

b. Western blot

30 µg de lysat protéique ont été repris dans du tampon de dénaturation 4X (tampon de Laemmli, Annexe I). Après dénaturation (5 min à 95°C), les protéines ont été séparées selon leur taille par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dans un tampon de

migration (Annexe II). Les protéines ont été électrotransférées en milieu liquide (tampon de transfert, Annexe II) sur membrane de PVDF. Après saturation des sites de liaison non spécifiques par le tampon de saturation (lait écrémé 5% et Tween-20 0,1% dans du PBS 1X), la membrane a été incubée sous agitation pendant une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire. Les anticorps primaires utilisés au cours de cette étude sont répertoriés dans le tableau II.

Anticorps	Référence	Facteur de dilution
Anti-Nlrp3	R&D Systems	1 :250
Anti-IL-1β et -pro-IL-1β	Biovision	1 :1000
Anti- caspase-1 et -pro-caspase-1 (p10)	Santa Cruz	1 :500
Anti-caspase-1 (p20)	Santa Cruz	1 :200
Anti-β actine	Santa Cruz	1 :1000

Tableau II. Anticorps utilisés et facteurs de dilution

La membrane a été par la suite incubée en présence d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase dont le signal a été révélé à l'aide d'un kit de chemiluminescence ECL (*Pierce ECL Western blotting Substrate*, Paris, France). Les lavages ont été effectués, après chaque étape d'incubation avec du tampon PBS/Tween 0,1%. Afin de vérifier que les quantités de protéines déposées sont identiques dans chaque condition testée, la membrane a été déshybridée puis réhybridée avec un anticorps anti- β actine.

Suite aux résultats très prometteurs obtenus au cours de l'étude *in vitro*, nous avons étudié l'effet de la molécule d'Arglabine *in vivo* chez des souris ApoE₂.Ki et ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}.

III. ETUDE *IN VIVO*

1. Modèles transgéniques

a. Souris ApoE₂.Ki

L'allèle ϵ_2 du gène codant pour l'ApoE est lié génétiquement à un risque de développement de désordres métaboliques et vasculaires. L'isoforme humaine ApoE₂ (ϵ_2/ϵ_2) se fixe mal sur les récepteurs membranaires des LDL et cette isoforme est strictement associée à une hyperlipoprotéïnémie de type III qui prédispose à une athérosclérose précoce sévère chez l'homme (164).

La lignée de souris homozygote ApoE₂.Ki a été générée par Sullivan, P.M. et ses collaborateurs en 1997 (165). Les séquences codantes (exons 2-3-4) du gène ApoE murin ont été remplacées par les séquences codantes du gène ApoE₂ humain (exons 2'-3'-4') (Figure 15). Brièvement, le fragment codant pour l'ApoE₂ humaine a été inséré dans un vecteur pPNT isolé du plasmide pHEG-1. Les cellules souches embryonnaires BK-4, sous-clone de cellules E14TG2, ont été mises en culture sur des fibroblastes embryonnaires irradiés avec 3000 rads (1 rad = 0.01 Gy). Ces cellules ont été électroporées avec le vecteur pPNT contenant les exons 2', 3' et 4'. Les clones résistants à la néomycine et à la thymidine kinase ont été recueillis 14 à 21 jours après, pour expansion. Ces clones ont ensuite été microinjectés dans des blastocystes de la lignée de souris C57BL/6 puis transplantés dans l'utérus de femelles pseudo-gestantes. Les chimères ainsi obtenues ont été sélectionnées par Southern blot et mises en reproduction (165).

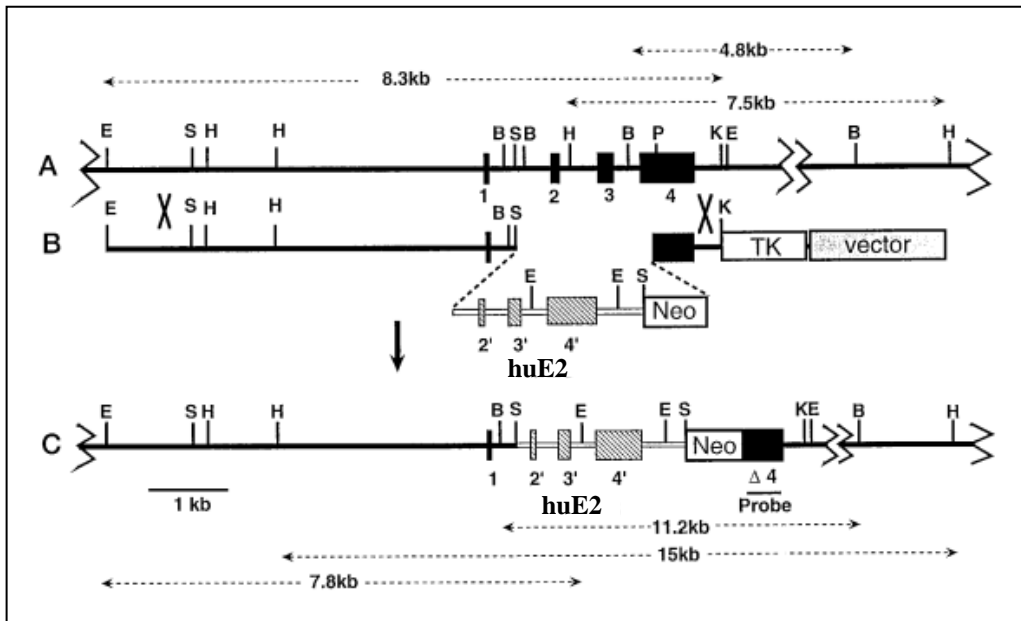


Figure 15. Remplacement du gène ApoE de souris par le gène ApoE₂ humain

A. Organisation génomique du gène de la souris ApoE contenant les exons 1-4 (rectangles noirs). **B.** Construction du vecteur pPNT résistant à la néomycine (Neo) et à la thymidine kinase (TK). Les exons 2', 3' et 4' du gène ApoE₂ (huE₂) ont été introduits entre les deux sites des enzymes de restriction SacI. **C.** Le gène chimérique résultant code pour l'isoforme ApoE₂ humaine exprimée par la souris. La sonde exon 4 de la souris a été utilisée par Southern blot pour détecter les souris exprimant l'ApoE₂ (165). E: EcoRI, S: SacI, H: Hind III, P: PvuI, K: KpnI, X: XbaI, B: BamHI.

b. Souris NLRP3^{-/-}

Les souris NLRP3^{-/-} ont été fournies par le Professeur Jürg Tschopp (Université de Lausanne, Switzerland) (40). Ces souris ont été invalidées pour le gène codant pour la protéine Nlrp3 par une cassette EGFP insérée en amont du codon d'initiation de la transcription ATG de l'exon 2 (Figure 16). Cette cassette est suivie par une queue poly (A), SV40, ce qui entraîne un blocage de l'expression de la protéine Nlrp3 au niveau génique. Les cellules souches embryonnaires transformées ont été sélectionnées par une cassette de résistance, PGK-neo, insérée au niveau de l'intron 2 entre deux sites loxP (40).

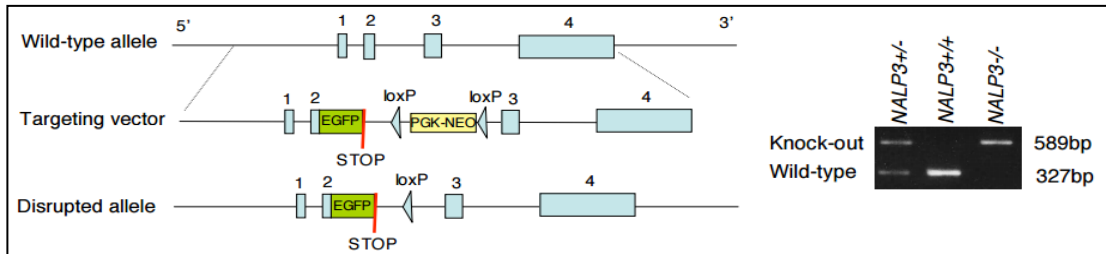


Figure 16. Génération de la lignée NLRP3^{-/-}

A. Le gène qui code pour la protéine Nlrp3 est composé de quatre exons. Afin de bloquer l'expression de cette protéine, une cassette EGFP suivie d'une queue poly(A) a été insérée au niveau de l'exon 2. La cassette PGK-NEO a été utilisée pour sélectionner les cellules embryonnaires transformées. **B.** Electrophorèse d'un produit de PCR extrait d'une souris sauvage, d'une souris NLRP3^{-/-} et d'une souris NLRP3^{+/-} (40).

c. Souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}

Les souris homozygotes ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-} ont été générées dans notre laboratoire après plusieurs croisements entre les deux lignées homozygotes ApoE₂.Ki et NLRP3^{-/-}. Le génotype des descendants issus de chaque croisement a été vérifié par PCR classique selon le protocole ci-dessous.

- Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait à partir de la queue de souris. Environ 2 mm de queue ont été incubés 25 min à 95°C avec du tampon de lyse (Annexe III). Après refroidissement, l'extrait a été neutralisé avec un tampon Tris HCl (Annexe III).

- PCR classique

2 µl d'ADN ont été incubés avec 1 U de Taq-polyomérase (*Sigma*), 25 mM de dNTP, 10 µM d'amorce et de tampon Taq-polymérase dans un volume réactionnel de 20 µl. Les amorces PCR utilisées pour amplifier l'ADN génomique de souris sont répertoriées dans le tableau III et le programme de PCR pour les deux gènes est décrit dans le tableau IV.

Amorces	Séquences des amorces
Amorces ApoE₂.Ki	CCAGGTCACCCAGGAACTG
	CTCCTTCATGGTCTCGTCC
Amorces NLRP3^{-/-}	AAGTCGTGCTGCTTCATGT
	TCAAGCTAAGAGAACTTTCTG
	ACACTCGTCATCTTCAGCA

Tableau III. Séquences des amorces utilisées pour le génotypage des souris

Température	Durée	Nombre de cycle
94°C	5'	1
94°C	15''	
60°C	30''	39
72°C	45''	
72°C	5'	1
4°C		

Tableau IV. Programme de PCR classique utilisé pour le génotypage de souris

2. Traitement des souris

Les souris femelles ApoE₂.Ki et ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-} âgées de 6 semaines ont été subdivisées en trois groupes de 6 souris. Le 1^{er} groupe de chaque lignée, groupe contrôle, a été soumis à un régime normal, *chow diet*. Les 2^{ème} et 3^{ème} groupes ont été soumis à un régime athérogène de type *High Fat Diet* (HFD), avec ou sans injection d'Arglabine. Ces souris ont été traitées par deux doses journalières d'Arglabine (2.5 ng/g de m.c.), administrées par voie intra-péritonéale durant 13 semaines. Les souris placées sous régime *chow diet* ont été traitées par du DMSO. Le régime HFD (E15721-347; ssniff Spezialdiäten, GmbH, Allemagne) est composé de 17,1% de protéines, 21,2% de

matières grasses brutes, 5% de fibre, 4,5% de cendre, 14,5% de fécule, 32,8% de sucre, 18000 UI/kg de vitamine A, 1800 UI/kg de vitamine D3, 180 mg/kg de vitamine E, 24 mg/kg de vitamine K3, 1236 mg/kg de vitamine C et 14 mg/kg de cuivre.

3. Caractérisation des lésions athéroscléreuses

a. Dissection des souris

Les souris ayant ou non subi un régime athérogène ont été anesthésiées par isofluorane après un jeûne de 12 heures. Le plastron thoracique a été enlevé et le sang du sinus retro-orbital a été prélevé sur EDTA (0.1 M). Le sang a été centrifugé à 4°C pendant 20 min à 630xg. Les échantillons de plasma ont été conservés à -80°C pour des analyses ultérieures.

Après prélèvement de certains organes (pancréas et rate), le cœur et l'aorte ont été perfusés 3 à 4 fois par le PBS 1X afin d'éliminer le sang. Le cœur a été prélevé et conservé dans du PFA 4% à 4°C et l'aorte entière a été délicatement séparée de la colonne vertébrale. L'aorte a été récupérée, de la crosse aortique jusqu'à la bifurcation iliaque, nettoyée de la graisse qui l'entoure, fixée dans du formalin 10% et ensuite conservée à 4°C.

b. Coloration histologique des aortes

Pour mettre en évidence la présence de lésions athéroscléreuses, l'aorte a été ouverte, rincée avec de l'éthanol 70% et colorée au rouge sudan IV (*Sigma-aldrich*) qui met en évidence les lipides. Après décoloration à l'éthanol 80% et rinçage à l'eau, l'aorte est prise en photo à l'aide d'une caméra vidéo CAMIRIS (*Perfexsciences Toulouse*). La surface des lésions a été évaluée et exprimée en pourcentage par rapport à la surface totale de l'aorte à l'aide du logiciel ImageJ.

c. Inclusion du cœur de souris par congélation

L'inclusion permet une réalisation de coupes fines et régulières du cœur de souris. Les cœurs ont été inclus dans la solution OCT dans des moules en plastique. Les blocs ont été maintenus dans un bain d'isopentane 100% refroidi dans l'azote liquide. Ils ont été ensuite conservés à -80°C.

d. Coupes au cryostat

Des coupes au cryostat de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées au niveau du sinus aortique. Pour chaque souris, 100 coupes ont été recueillies sur des lames de verre Superfrost (VWR, France) et conservées à -80°C.

e. Coloration à l'Hématoxyline/ Eosine (H&E)

Les lames ont été plongées dans une solution d'hématoxyline de Harris pendant 3 min puis rincées à l'eau pendant 3 min et décolorées dans une solution d'alcool-acide (HCl 37% dans de l'éthanol 70%) pendant 2 sec. Après lavage à l'eau pendant 3 min, les lames ont été plongées dans un bain d'éosine 0.1% pH 4-5 pendant 30 sec puis rincées à l'eau. Les échantillons ont alors été déshydratés (éthanol 95% puis 100%) et montés entre lame et lamelle.

f. Histomorphométrie et évaluation quantitative des lésions

- Objectif et anticorps utilisés

L'objectif de cette étude consiste à évaluer quantitativement la présence de macrophages en déterminant leurs phénotypes au niveau des lésions d'athérosclérose des souris traitées ou non par l'Arglabine. L'immunohistochimie a été effectuée en utilisant les anticorps suivants : anticorps monoclonal anti-F4/80 produit chez le rat (*Serotec*); anticorps polyclonal anti-CD206 produit chez la chèvre (*R&D Systems*) et anticorps polyclonal anti-IL-1β produit chez le lapin (*Santa Cruz*).

- Immunohistochimie sur coupes transversales de cœur de souris

L'étude immunohistochimique a été effectuée sur des coupes transversales du sinus aortique pré-traitées par un mélange acétone-méthanol (50/50 vol/vol) durant 2 min. Après 5 min d'hydratation par PBS 1X, les coupes ont été lavées avec 0,1% de Triton X-100 préparé dans du PBS. L'activité peroxydase endogène a été inhibée par un traitement à l'H₂O₂ 3% pendant 30-60 min puis les lames ont été rincées au PBS. Les sites de réactions non spécifiques ont été saturés par la BSA 4% (*Sigma*) durant 1 h et l'anticorps primaire a été ensuite ajouté sur les coupes pendant 1 h. Après avoir ôté l'excédent d'anticorps primaire (3 lavages PBS 1X de 3 min), les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire durant 1 h puis rincées 3 fois dans du PBS. La présence d'anticorps sur les lames a été révélée à l'aide du kit ABC (Vector). Après 2 nouveaux lavages au PBS, les coupes ont été incubées en présence du substrat de la peroxydase

pendant 10 min. Les coupes ont été analysées avec un microscope Axiophot (*Carl Zeiss*) et une caméra CCD Sony MC-3249.

4. Dosages sériques

a. Dosage des cytokines

Le plasma des souris ApoE2.Ki et ApoE2.Ki/NLRP3^{-/-} traitées ou non par l'Arglabine a été utilisé pour déterminer le niveau circulant de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-10. Le dosage a été effectué avec le kit Millipore (*Millipore, Billerica, MA, USA*). 25 μ l de plasma de souris ont été incubés à 4°C pendant une nuit avec 25 μ l de billes associées à des anticorps spécifiques de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-10. Il s'agit de microbilles (5,6 microns) identifiées par un code couleur spécifique à chaque cytokine, reconnues par un système optique constitué de deux lasers. Après lavage, 25 μ l d'anticorps conjugués à la biotine ont été ajoutés et incubés pendant 1 h à température ambiante. Pour que la réaction au niveau de la surface de chaque bille soit complète, les billes ont été incubées dans 25 μ l de streptavidine-phycoérythrine durant 30 min. Après lavage, 150 μ l de tampon ont été ajoutés afin de passer les billes, une par une, à travers un détecteur (*Luminex 200 Millipore apparatus*) où elles sont exposées à deux faisceaux lasers. Le premier faisceau excite les colorants internes qui identifient la couleur de la bille et le deuxième excite la phycoérythrine. Ainsi, des processeurs de signaux numériques à haute vitesse identifient chaque microsphère et quantifient le niveau d'expression de chaque cytokine en se basant sur l'émission des signaux fluorescents.

b. Dosage des paramètres lipidiques

- Dosage des triglycérides, du cholestérol total, des HDL et LDL cholestérol

Les triglycérides, le cholestérol total et le HDL cholestérol ont été respectivement dosés avec les kits *Randox, cholesterol RTU-Biomerieux et ultra N-Geneous HDL cholesterol reagent-Sckisui Dignostics* (Annexe IV). La concentration plasmatique de LDL-cholestérol a été déduite selon la formule de Friedwald : $\{LDL\text{-cholestérol} = \text{cholestérol total} - (\text{HDL-cholestérol} + \text{triglycerides}/2,2)\}$ (166). Dans le cas où la concentration plasmatique des triglycérides est ≥ 400 mg/dL (4.6 mmol/L), celle de LDL cholestérol est directement calculée par méthode enzymatique (167).

- **Dosage des lipoprotéines**

Nous avons dosé le taux plasmatique des lipoprotéines avec le kit de sous-fraction de LDL et HDL du système Lipoprint de Quantimetrix (*Quantimetrix Corporation, Redondo Beach, CA, USA*). Il existe cinq classes principales de lipoprotéines : les chylomicrons, les lipoprotéines de très basse densité (VLDL), les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les lipoprotéines de basse densité (LDL) et les lipoprotéines de haute densité (HDL). Le système Lipoprint de Quantimetrix est en mesure de décomposer les LDL en sept sous-fractions, numérotées de LDL-1 (les particules les plus grosses) à LDL-7 (les particules les plus petites). Les IDL sont subdivisées en 3 sous-fractions et les HDL sont subdivisées en 10 sous-fractions. Le principe de ce système consiste en une électrophorèse des différentes sous-fractions de lipoprotéines sur un gel de polyacrylamide, linéaire et pré-moulé dans un tube en verre. C'est un gel de haute résolution (3%), constitué de trois parties différentes : (i) un gel de chargement liquide contenant un colorant lipophile qui se fixe proportionnellement à la quantité relative de cholestérol dans chaque lipoprotéine, (ii) un gel de concentration et (iii) un gel de séparation. Un volume de 25 µl d'échantillon et 200 µl de gel de chargement ont été déposés dans chaque tube d'acrylamide. À l'issue de 30 min de photopolymérisation des gels de chargement, les tubes ont été placés dans la chambre d'électrophorèse branchée à une source d'alimentation qui délivre un courant de 3 mA par tube de gel, soit 36 mA pour 12 tubes, avec une puissance maximale de 500 V pendant 60 min. Au cours de la première phase d'électrophorèse, les particules de lipoprotéines pré-colorées sont concentrées par les gels de chargement et de concentration en une bande étroite et nette. À travers la matrice de gel de séparation, elles se répartissent en bandes de lipoprotéines en fonction de la taille de leurs particules, des plus grosses aux plus petites, sous l'action de tamisage du gel : ce sont les lipoprotéines HDL qui migrent le plus loin, suivies par les LDL à petites particules denses, puis par les LDL à particules plus grosses et flottantes, par les bandes intermédiaires (constituées principalement d'IDL) et enfin par les VLDL. Les chylomicrons éventuellement présents apparaissent au-dessus du gel de concentration ou restent dans le gel de chargement. Les gels ont été par la suite scannés par densitométrie à 610 nm et analysés par un ordinateur équipé d'un programme d'analyse LipoWare.

c. Dosage des anticorps anti-LDL oxydées

- Isolement des lipoprotéines

Des LDL humaines ($d=1.030-1.053$ g/mL) ont été isolées à partir de sang frais de sujets volontaires sains. Ces LDL ont été suspendues dans du PBS 1X contenant 0,01% d'EDTA afin d'éviter leur oxydation. Ensuite, les LDL ont été stérilisées par filtration et conservées à 4°C sous nitrogène. Leur mobilité a été évaluée par électrophorèse sur hydragel (Sebia, France).

- Oxydation des lipoprotéines

L'excès d'EDTA a été enlevé par une série de lavages avec du PBS 1X. L'oxydation a été initiée suite à une incubation des LDL avec 5 μ M de cuivre (CuSO_4) à 37°C durant 24 h. Une fois que l'oxydation est arrêtée par l'ajout de 20 μ M d'EDTA, nous avons testé la contamination des LDLox par le biais du kit *limulus amoebocyte lysate* (LAL) (Sigma).

Le principe de ce kit a été mis en évidence en 1964 par Bang F. B. et Levin J. (168, 169). Il s'agit d'une évaluation semi-quantitative d'endotoxine présente au niveau des échantillons de LDLox. Le principe de ce test consiste à évaluer l'interaction de l'échantillon testé avec le lysat d'amœbocytes de limule : c'est un extrait aqueux de cellules sanguines (amœbocytes) de la limule *Limulus polyphemus*. La présence de bactéries dans l'échantillon testé est associée à une réaction enzymatique entre les enzymes des granules des amœbocytes et le composant structurel unique de la paroi cellulaire bactérienne, le LPS. Cette interaction est responsable de la coagulation du sang de la limule, la base du test LAL (170). En effet la réaction de coagulation est une cascade d'étapes d'activation enzymatique aboutissant au clivage d'une protéine, le coagulogène. Le produit insoluble du clivage du coagulogène, la coaguline, s'unit par interaction ionique (171, 172). Si une quantité suffisante de coaguline est formée, une turbidité apparaît suivie par la formation d'un gel-caillot, proportionnelle à la quantité de LPS au niveau de l'échantillon testé. L'analyse des échantillons de LDLox par le test LAL montre moins de 0.75 IU de LPS/ml.

- **Dosage des anticorps anti-LDL oxydées**

100 µl de LDLox à 5 µg/ml resuspendus dans du PBS 1X ont été incubés dans une plaque de 96 puits durant une nuit à 4°C. Après l'étape de pré-coating, les puits sont saturés par 1% de BSA durant 2 h à température ambiante. 100 µl de sérum (dilués au 1/40) de souris ApoE₂.Ki et ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-} ont été incubés à température ambiante durant 2 h. Après une série de trois lavages, nous avons déposé un mix d'IgG/d'IgM conjugués à la peroxydase (dilué au 1:1000, *Beckman-Coulter*, Paris, France). La plaque a été incubée à température ambiante durant 2 h. Le substrat utilisé au cours de ce dosage est l'orthophenylenediamine dichloride (*OPD*, *Sigma*) et l'absorbance de l'activité de la peroxydase alcaline a été mesurée à 492 nm.

d. Dosage de la glycémie et de l'insulinémie

L'insuline a été dosée avec le kit *Rat Insulin ELISA* (*Crystal Chem, Chicago, IL*). Ce kit repose sur la capture de l'insuline de souris/rat dans 5 µl de plasma par un anticorps monoclonal immobilisé dans la microplaque. Après une série de 5 lavages, 100 µl d'un 2^{ème} anticorps monoclonal conjugué à la peroxydase ont été ajoutés. Après 30 min d'incubation à température ambiante, nous avons éliminé les anticorps marqués non liés par une série de 7 rinçages. L'anticorps conjugué a été détecté par réaction avec la 3, 3',5, 5'-tétraméthylbenzidine (TMB) qui donne une coloration bleue qui vire au jaune après ajout de la solution d'arrêt. La concentration d'insuline dans l'échantillon a été calculée par référence à une série de standards et l'intensité de la couleur développée est proportionnelle à la concentration d'insuline présente dans l'échantillon.

La glycémie des souris a été dosée par un dosage enzymatique et colorimétrique avec le kit de dosage du glucose à la glucose oxydase/ peroxydase, Sordalab (Annexe IV).

5. Cytométrie de flux

Après sacrifice des animaux, la rate a été placée sur de la glace, lavée et incubée à 4°C dans du PBS 1X contenant 0.5% de BSA. Après homogénéisation de la rate à l'aide d'un broyeur, la suspension cellulaire a été successivement filtrée sur nylon (pores 80 µm puis 40 µm) et centrifugée à 1400 tr/min durant 10 min. Les érythrocytes ont été lysés à l'aide d'un tampon de lyse ACK (Tris HCl 17 mM, NH₄Cl 144 mM, pH 7.4). Après 3 lavages, les splénocytes ont été filtrés à nouveau puis comptés sur cellule de Malassez. Les

splénocytes ont été ensuite incubés 1 h à 4°C sous agitation dans un cocktail d'anticorps couplés à la phycoérythrine (PE) (anticorps anti-Ly6C [*Miltenyi Biotec Allemagne*]), couplés à la PE-Cy5 (anticorps anti-CD4, anticorps anti-CD8 et anticorps anti-B220 [*BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA*]) et couplés à la Fluorescéine isothiocyanate (FITC) (anticorps anti-CD11b [*Miltenyi Biotec, Allemagne*]). Après incubation, les cellules ont été lavées 2 fois puis resuspendues dans 500 µl de PBS 1X à une concentration de 50×10^3 cellules/ml. Les mesures ont été prises sur un cytomètre de flux BD LSR-II (*BD Biosciences*) et l'analyse des données a été effectuée à l'aide du logiciel FlowJo (*Tree Star's, Ashland, OR, USA*).

IV. ETUDE DE L'APOPTOSE DES CELLULES β -PANCREATIQUES

Étant donné que la mort des cellules β -pancréatiques par apoptose est la caractéristique majeure du DT2, nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur ce mécanisme cellulaire chez les souris ApoE₂.Ki susceptibles à un DT2. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons étudié l'expression de la caspase 3, médiateur essentiel de l'apoptose, par immunohistochimie.

Les pancréas ont été lavés dans du PBS 1X et ensuite fixés dans du formalin 10% et conservés à -80°C. Des sections de 10 µm d'épaisseur ont été réalisées sur les pancréas congelés. Les coupes ont été d'abord traitées avec 0,3% H₂O₂ et ensuite bloquées avec de la BSA 4% (*Sigma*). L'anticorps primaire utilisé est un anticorps polyclonal anti-caspase 3 et anti-pro-caspase 3 (*Cell Signaling, 1 :1000*) et la révélation a été effectuée à l'aide d'un anticorps secondaire de lapin conjugué à la peroxydase. Afin d'étudier les mécanismes d'action impliqués, nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur l'apoptose *in vitro*, au niveau des cellules INS-1. Après 24 h de traitement (Figure 13), une immunodétection par Western blot a été effectuée sur le lysat protéique afin d'évaluer l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Les anticorps anti-Bax et anti-Bcl-2 produits chez le lapin (*Cell Signalling, 1 :1000*), ont été utilisés comme anticorps primaires. La révélation a été réalisée par une réaction de chemiluminescence en utilisant le système ECL et l'intensité relative des bandes a été déterminée à l'aide du logiciel ImageJ 1.48v.

V. ETUDE DE L'AUTOPHAGIE

L'autophagie, processus de survie cellulaire, est fortement impliquée dans le processus inflammatoire responsable de l'installation du DT2 (173) en assurant le maintien de la structure, de la masse et de la fonction des cellules β -pancréatiques (174). Par ailleurs, nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur ce mécanisme protecteur *in vitro*, au niveau de la lignée INS-1 et au niveau des îlots de Langerhans de souris ApoE₂.Ki. L'étude de l'autophagie a été effectuée par Western blot afin d'évaluer l'expression de la protéine Becline 1 (*Bcl2-interacting protein*) et de la protéine LC3 (*light chain 3* des protéines associées aux microtubules). La révélation a été effectuée suite à l'incubation du lysat protéique avec des anticorps primaires anti-Becline 1 et anti-LC3 produits chez le lapin (*Cell Signalling*, 1 :1000).

Nous avons également étudié l'effet de l'Arglabine sur l'autophagie dans le contexte de l'athérosclérose. Cet effet a été étudié au niveau des macrophages péritonéaux.

VI. ANALYSES STATISTIQUES

Les différents résultats obtenus au cours de la réalisation de ce travail sont exprimés en moyenne \pm écart-type (SD). L'analyse statistique a été effectuée avec le test 't *student*', le test '*Wilcoxon rank sum*' couplé au test '*Dunn-Sidak correction*' et le test '*Kruskal-Wallis*'. Les résultats pour lesquels p est inférieur à 0,05 sont considérés comme statistiquement significatifs.



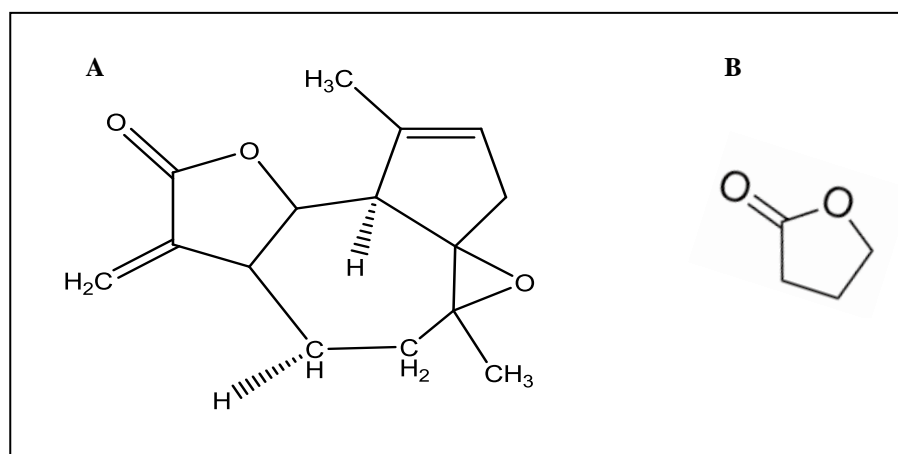
Résultats

CHAPITRE I

IDENTIFICATION DE LA MOLECULE D'ARGLABINE

I. L'ARGLABINE

L'Arglabine [1(R), 10(S)-epoxy-5(S), 5(S), 7(S)-guaia-3(4),11(13)-dien-6, 12-olide] est un sesquiterpène α -méthylène- γ -butyrolactone extrait de la plante *A. glabella*, sous forme d'un composé cristallin. L'Arglabine de formule chimique, $C_{15}H_{18}O_3$, est un cyclopentane formé de cinq stéréos centres contigus (Figure 17.A). Cette molécule se caractérise par la présence d'une double liaison exocyclique conjuguée à la structure γ -butyrolactone au niveau du C-2 (Figure 17.B). Cette particularité lui confère la possibilité de réagir avec les fonctions chimiques nucléophiles des protéines par une addition dite 1,4 ou addition de type Michael. Ce mode d'action semble jouer un rôle essentiel dans l'activité biologique de la molécule d'Arglabine (175, 176).



II. PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

L'étude des caractéristiques de l'Arglabine montre une forte stabilité dans le DMSO pur qui peut durer 12 jours avec un intervalle de température allant de -20°C jusqu'à $+50^{\circ}\text{C}$. Dans le plasma, l'Arglabine est moins stable et sa demi-vie est estimée à une heure.

Par spectrométrie de masse nous avons déterminé la formule chimique de l'Arglabine et nous avons étudié ses propriétés physico-chimiques. Le résultat de cette étude est répertorié dans le tableau V.

Formule chimique	C ₁₅ H ₁₈ O ₃
Poids moléculaire	246.30 g/mol
Masse exacte	246.13 g/mol
Masse monoisotopique	246.13 g/mol

Tableau V. Propriétés physico-chimiques de la molécule d'Arglabine

CHAPITRE II

EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES ET ANTI-ATHEROGENES DE LA MOLECULE D'ARGLABINE CHEZ DES SOURIS APOE₂.KI SUSCEPTIBLES A L'ATHEROSCLEROSE

I. PUBLICATION

Cette étude est publiée dans *Circulation* (Annexe V)

A. Abderrazak, D. Couchie, D.F. Darweesh Mahmood, R. El Hage, C. Vindis, M. Laffargue, V. Matéo, B. Büchele, M.R. Ayala, M. El Gaafary, T. Syrovets, M-N. Slimane, B. Friguet, T. Fulop, T. Simmet, Kh. El Hadri and M. Rouis. **Anti-Inflammatory and Anti-Atherogenic Effects of the Inflammasome NLRP3 Inhibitor, Arglabin, in ApoE₂.Ki Mice Fed a High Fat Diet.** 2015; 131:1061-1070.

II. RESULTATS DES ETUDES *IN VITRO*

1. L'Arglabine : une molécule anti-inflammatoire

- **L'Arglabine inhibe l'expression de l'IL-1 β , de l'IL-18 et de la caspase-1 au niveau des macrophages péritonéaux de souris**

Nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur l'activité de l'inflammasome NLRP3 au niveau des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6. Ces cellules ont été stimulées par le LPS afin d'activer la voie NF- κ B et induire l'expression des formes inactives de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18. Le traitement de ces macrophages par les cristaux de cholestérol a induit l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3, l'auto-clivage de la caspase-1 et l'activation de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 respectivement en IL-1 β et IL-18 biologiquement actives. Ces conditions de culture miment le déroulement du processus athéromateux au niveau de la paroi vasculaire chez l'homme. Les résultats de cette étude montrent que le traitement des macrophages par l'Arglabine inhibe, d'une façon dose-dépendante, l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-18. La diminution de leur expression est maximale en réponse à 50 nM d'Arglabine et l'EC₅₀ est d'environ 10 nM pour les deux cytokines (Figure 18.A). Cette diminution est réversible après 72 h de traitement et la viabilité cellulaire (>95%) n'a pas été affectée en réponse aux différentes doses d'Arglabine (Figure 18.B). Nous avons alors émis deux hypothèses dans cette

étude afin de pouvoir expliquer l'effet inhibiteur de l'Arglabine exercé sur l'activité de l'inflammasome NLRP3.

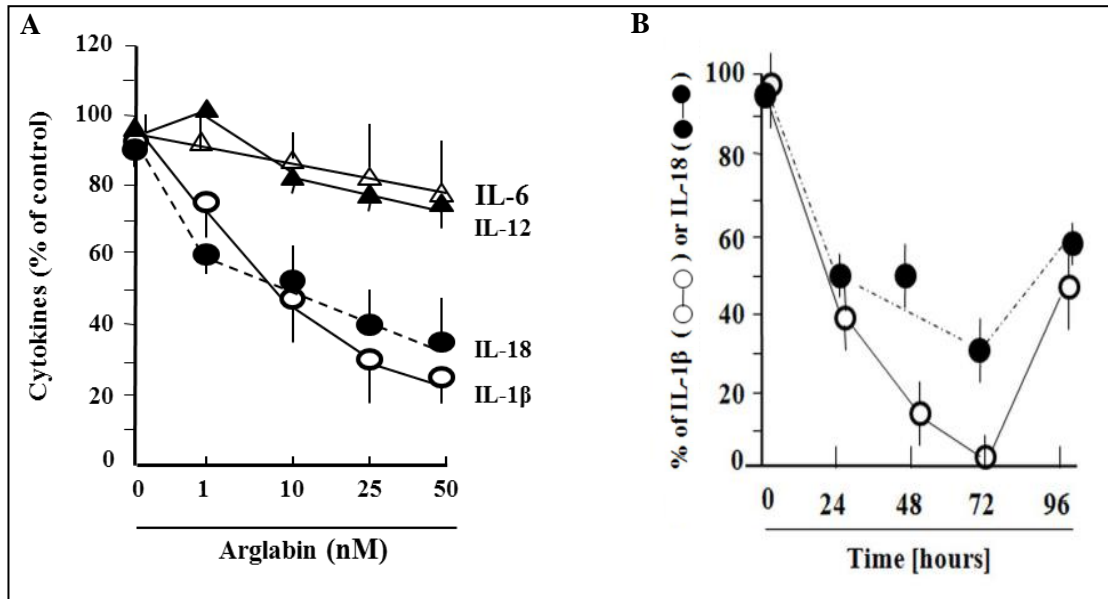


Figure 18. Effet de la molécule d'Arglabine sur l'expression des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages péritonéaux de souris C57Bl/6

A. Effet inhibiteur de l'Arglabine sur l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-18. Les macrophages ont été d'abord stimulés par le LPS (10 ng/ml) afin de déclencher le 'priming', traités dans un 2^{ème} temps par différentes doses d'Arglabine (1, 10, 25 et 50 nM) pendant 1 heure et par la suite, stimulés par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol durant 24 h. Absence d'effet inhibiteur significatif sur l'expression de l'IL-6 et de l'IL-12. Cet effet a été étudié sur des macrophages péritonéaux stimulés par le LPS (10 ng/ml) et traités par l'Arglabine (1, 10, 25 et 50 nM). Les cytokines pro-inflammatoires sécrétées dans le surnageant cellulaire ont été quantifiées par ELISA (IL-1 β et IL-18) et par le kit Multiplex (IL-6 et IL-12). **B.** La réversibilité de l'effet de la molécule d'Arglabine a été étudiée chaque 24 h durant une période totale de 96 h. Les macrophages ont été stimulés par le LPS et les cristaux de cholestérol en présence de 50 nM d'Arglabine. L'effet de l'Arglabine est réversible après 72 h d'incubation. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SD.

- **Hypothèse 1 : L'Arglabine inhibe-t-elle la voie du facteur de transcription NF- κ B?**

Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur l'expression de deux cytokines NF- κ B dépendantes, l'IL-6 et l'IL-12. Ces deux médiateurs pro-inflammatoires jouent un rôle direct dans l'inflammation artérielle et dans l'athérosclérose : l'IL-12 est un marqueur des macrophages pro-inflammatoires M1 et est un puissant promoteur de la voie de différenciation Th1. Chez la souris ApoE^{-/-}, la déficience en IL-12 réduit significativement le développement de l'athérosclérose (177).

L'IL-6 est produite de manière importante par les macrophages, en particulier par les cellules spumeuses, et sa concentration plasmatique est étroitement corrélée avec le risque de développement de maladies cardiovasculaires chez l'homme (178). L'expression NLRP3-indépendante de l'IL-6 et de l'IL-12 a été étudiée au niveau des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 stimulés par le LPS (10 ng/ml) et traités par différentes doses d'Arglabine.

Le kit Multiplex de Millipore (*Millipore, Billerica, MA, USA*) a été utilisé pour quantifier l'expression de ces deux cytokines. Le résultat montre que l'Arglabine ne présente aucun effet significatif ni sur l'expression de l'IL-6 ni sur celle de l'IL-12 (Figure 18.A). Ainsi la première hypothèse émise est à rejeter et cette étude semble suggérer que l'Arglabine n'inhibe pas la voie du facteur de transcription NF- κ B.

- Hypothèse 2 : l'Arglabine inhibe-t-elle l'expression des protéines de l'inflammasome NLRP3?

Nous avons évalué par Western blot l'expression des protéines Nlrp3, pro-IL-1 β , pro-caspase-1 et caspase-1 au niveau du lysat des macrophages péritonéaux de souris traités par le LPS (10 ng/ml), l'Arglabine (50 nM) et les cristaux de cholestérol (1 mg/ml).

Premièrement, nous avons montré que l'Arglabine réduit significativement l'expression des protéines Nlrp3, caspase-1 et pro-IL-1 β (Figure 19). Ces données indiquent que l'Arglabine inhibe le processus d'auto-activation de la pro-caspase-1 et l'expression de sa forme active, la caspase-1. Ce résultat montre clairement que l'Arglabine induit une dégradation des protéines du complexe NLRP3, ce qui inhibe l'oligomérisation de la protéine Nlrp3 avec ASC et inhibe donc l'activation de la pro-caspase-1. Le résultat de cette étude est similaire à celui observé dans le cas de traitement des macrophages par un inducteur d'autophagie, l'EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*) (Figure 19). Il est à noter que des données récentes, publiées en 2013, ont montré que l'autophagie est l'une des voies de régulation de l'inflammasome NLRP3 qui agit en inhibant l'activation de l'IL-1 β au niveau des macrophages de souris (179).

A travers cette étude nous avons voulu confirmer l'effet inhibiteur de la molécule d'Arglabine mis en évidence précédemment par ELISA. Nous avons donc évalué

l'expression de l'IL-1 β au niveau du surnageant (SN) des macrophages en culture par Western blot (Figure 19). Les résultats de cette étude valident les résultats déjà obtenus et montrent que l'Arglabine réduit de façon significative l'expression de l'IL-1 β .

L'ensemble de ces résultats confirme l'hypothèse émise et montre que l'effet inhibiteur de l'Arglabine s'exerce préférentiellement au niveau des protéines constituant l'inflammasome NLRP3.

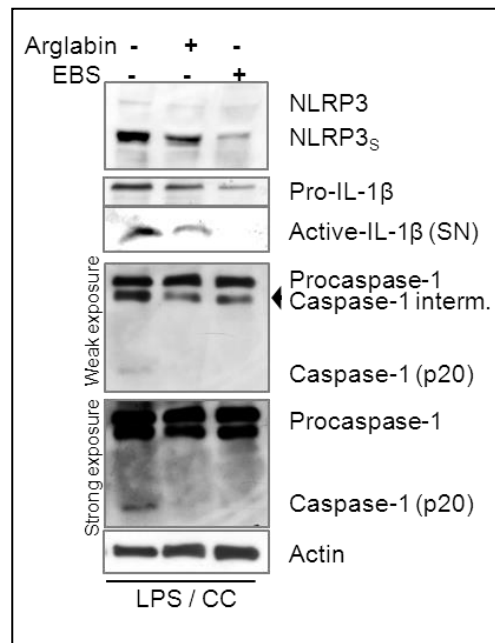


Figure 19. L'Arglabine réduit l'expression de l'IL-1 β et de la caspase-1 au niveau des macrophages péritonéaux de souris C57Bl/6

Les macrophages ont été d'abord stimulés par le LPS (10 ng/ml) durant 2 h, traités dans un 2^{ème} temps par 50 nM d'Arglabine pendant 1 h et par la suite, stimulés par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol durant 24 h. Nous avons évalué par Western blot le niveau d'expression des protéines Nlrp3, pro-IL-1 β et pro-caspase-1/caspase-1. L'expression de l'IL-1 β a été évaluée au niveau du surnageant cellulaire après 24 h de traitement. Le niveau d'expression de chaque protéine a été normalisé par rapport au niveau d'expression de la β -actine. SN: Surnageant ; NLRP3_s : NLRP3 *smaller form lacking LRR domain*; Caspase-1 interm: Caspase-1 intermédiaire (p35/p37 kDa).

2. L'Arglabine : une molécule spécifique de l'inflammasome NLRP3

Nous avons développé trois stratégies afin d'étudier la spécificité de l'Arglabine pour l'inflammasome NLRP3 :

- Premièrement, nous avons étudié la spécificité des cristaux de cholestérol : ces cristaux ont été construits au sein de notre laboratoire et il a d'abord fallu vérifier leur spécificité pour l'inflammasome NLRP3.
- Ensuite, nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur trois types différents d'inflammasomes stimulés par leurs activateurs spécifiques.
- Ces deux stratégies ont été renforcées par une étude effectuée dans un contexte différent de celui de l'athérosclérose. Pour ce faire, nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur des macrophages stimulés par un activateur largement connu pour sa spécificité pour l'inflammasome NLRP3, l'ATP.

a. Les cristaux de cholestérol, activateurs spécifiques de l'inflammasome NLRP3

L'étude de la spécificité des cristaux de cholestérol a été effectuée sur des macrophages péritonéaux de souris C57BL/6 appelés macrophages contrôles (Nlrp3^{+/+}), des macrophages péritonéaux hétérozygotes pour la protéine Nlrp3 (Nlrp3^{+/-}) et des macrophages Nlrp3^{-/-}. Ces macrophages ont été d'abord traités par 10 ng/ml de LPS durant 2 h et par la suite stimulés par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol durant 24 h. La comparaison des résultats entre les macrophages contrôles et les macrophages Nlrp3^{+/-} montre que les concentrations de l'IL-18 et de l'IL-1 β sont réduites d'environ 50%. Au niveau des macrophages Nlrp3^{-/-}, la concentration des deux cytokines est nulle (Figure 20). A travers cette étude, nous montrons la spécificité des cristaux de cholestérol pour l'inflammasome NLRP3.

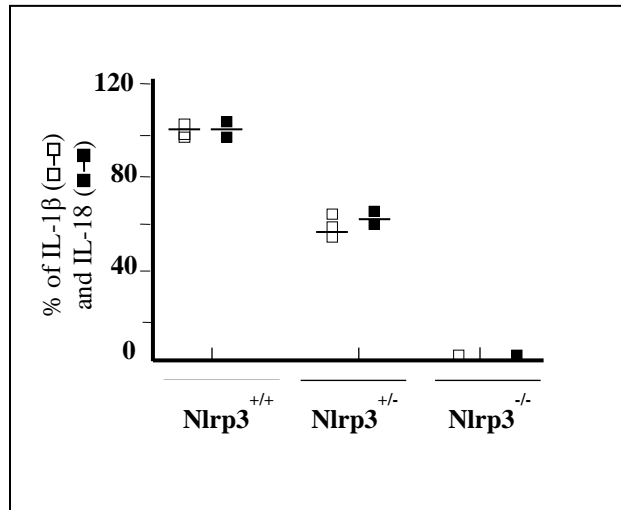


Figure 20. Spécificité des cristaux de cholestérol pour l'inflammasome NLRP3

Des macrophages péritonéaux des souris Nlrp3^{+/+}, Nlrp3^{+/-} et Nlrp3^{-/-} ont été d'abord stimulés par le LPS (10 ng/ml) durant 2 h et traités dans un 2^{ème} temps par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol. Nous avons évalué, par ELISA, l'expression de l'IL-1β au niveau du surnageant cellulaire après 24 h de traitement. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ±SD.

b. L'Arglabine, une molécule spécifique de l'inflammasome NLRP3

- Pour valider sa spécificité, nous avons étudié, dans un premier temps, l'effet de l'Arglabine sur les inflammasomes AIM2, NLRP1 et NLRC4. Ces inflammasomes ont été stimulés respectivement par l'ADN double brin (DS-DNA), par la toxine létale (Antrax) et par la flagelline (Figure 21). Pour chaque activateur, nous avons étudié l'effet de deux concentrations sur des macrophages péritonéaux de souris C57Bl/6, prétraités par le LPS. Nous avons ensuite comparé la concentration de l'IL-1β sécrétée par ces inflammasomes par rapport à celle sécrétée en présence de 50 nM d'Arglabine. Les résultats de cette étude montrent que le traitement par l'Arglabine n'exerce aucun effet significatif sur l'IL-1β sécrétée par AIM2 (Figure 21.A), NLRP1 (Figure 21.B) et NLRC4 (Figure 21.C) et montrent que l'effet inhibiteur de l'Arglabine passe spécifiquement par l'inflammasome NLRP3.

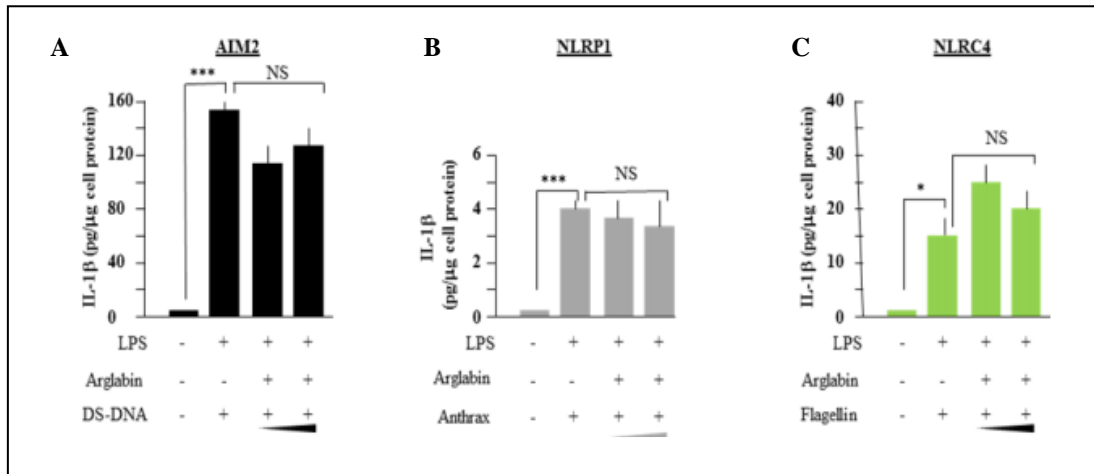


Figure 21. Spécificité de l'Arglabine pour l'inflammasome NLRP3 au niveau des macrophages péritonéaux des souris C57Bl/6

Les macrophages ont été d'abord stimulés par le LPS (10 ng/ml) durant 2 heures, traités dans un 2^{ème} temps par 50 nM d'Arglabine durant 1 heure et par la suite, stimulés par (A) 1,25 et 2,5 μg/ml d'ADN double brin (DS-DNA), (B) 250 et 500 ng/ml de toxine létale (Anthrax) et (C) 312 et 625 ng/ml de Flagelline. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ±SD, *p<0,05, **p<0,01.

- Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur l'inflammasome NLRP3 stimulé par un autre activateur spécifique, l'ATP. Cette étude montre que le traitement par l'Arglabine inhibe, de façon dose-dépendante, la sécrétion de l'IL-1β par les macrophages péritonéaux stimulés par 5 mM d'ATP (Figure 22). Ce résultat confirme l'étude évoquée précédemment et démontre la spécificité de l'Arglabine pour l'inflammasome NLRP3.

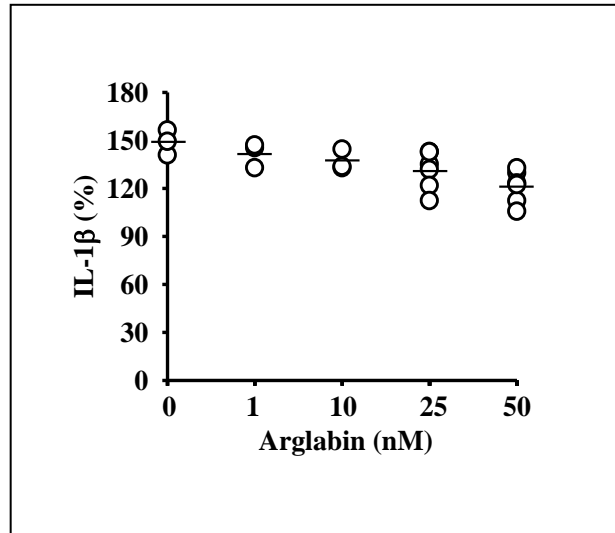


Figure 22. Spécificité de l'Arglabine pour l'inflammasome NLRP3 stimulé par l'ATP
 Les macrophages péritonéaux de souris C57Bl/6 ont été d'abord stimulés par le LPS (10 ng/ml) durant 2 heures, traités dans un 2^{ème} temps par différentes doses d'Arglabine (1, 10, 25 et 50 nM) durant 1 heure et par la suite, stimulés par 5 mM d'ATP. Après 24 h de traitement, nous avons évalué l'expression de l'IL-1 β par ELISA. Le résultat a été analysé par le test de *Kruskal-Wallis*. Dans le cas où le test est positif, l'analyse statistique est suivie par le test de *Wilcoxon rank sum* couplé au test de *Dunn-Sidak*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3. L'Arglabine : une molécule inductrice de l'autophagie

Le résultat, similaire à celui d'EBSS mis en évidence précédemment, nous conduit d'ores et déjà à déterminer le lien entre l'Arglabine et la voie de l'autophagie. Une étude récente a souligné l'importance du lien étroit entre l'altération de l'autophagie, l'accumulation de cristaux de cholestérol au niveau artériel et le développement de plaques d'athérome (180). En se basant sur le fait que la déficience en autophagie induit une athérosclérose à travers l'activation de l'inflammasome NLRP3, Martinet W. et *al.* évoquent l'importance de la découverte d'une approche thérapeutique pro-autophagique qui cible l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires (181). Dans ce contexte, nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur l'expression du système de conjugaison LC3. Ce système existe sous deux formes : une forme cytosolique, le LC3-I et une forme ancrée dans les membranes des phagophores, des autophagosomes et des autophagolysosomes, le LC3-II. Cette protéine est caractérisée par sa fonction structurale permettant l'élongation et la formation de l'autophagosome mature.

Comme elle reste séquestrée dans les autophagosomes après leur formation, la protéine LC3-II est utilisée comme marqueur cellulaire pour étudier l'autophagie et identifier les autophagosomes. Il existe deux techniques principales pour étudier la voie d'autophagie à travers la protéine LC3-II : le Western blot et la microscopie confocale.

- **Le Western blot**

Dans notre étude, nous avons évalué l'expression de la protéine LC3-II en réponse à l'Arglabine sur des extraits cellulaires issus de macrophages péritonéaux, stimulés ou non par le LPS/cristaux de cholestérol. Afin de confirmer les données issues de l'analyse du Western blot, nous avons utilisé l'EBSS et la Bafilomycine A1 comme contrôles positifs. La Bafilomycine A1, inhibiteur du flux autophagique, inhibe l'activité de la V_{ATP}ase (*Vacuolar-type H⁺ -ATPase*), ce qui bloque les pompes à hydrogène des lysosomes. Ainsi, l'augmentation du pH dans les lysosomes bloque l'activité des enzymes lysosomiales qui ne sont actives qu'à pH faible et inhibe donc la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (182).

- **L'approche de microscopie confocale**

L'objectif de cette approche est de mettre en évidence la protéine LC3-II au niveau des cellules en culture. Dans le cas où l'autophagie est induite, la LC3-II se localise au niveau de structure ponctiformes, les autophagosomes.

L'analyse des résultats du Western blot montre que l'Arglabine augmente, de façon significative, l'expression du LC3-II au niveau des macrophages stimulés (Figure 23.B) ainsi qu'au niveau des macrophages non stimulés (Figure 23.A). L'induction de l'autophagie est validée par la mise en évidence de « dots » fluorescentes (vertes) contenant la protéine LC3-II au niveau des autophagosomes (Figure 23.C).

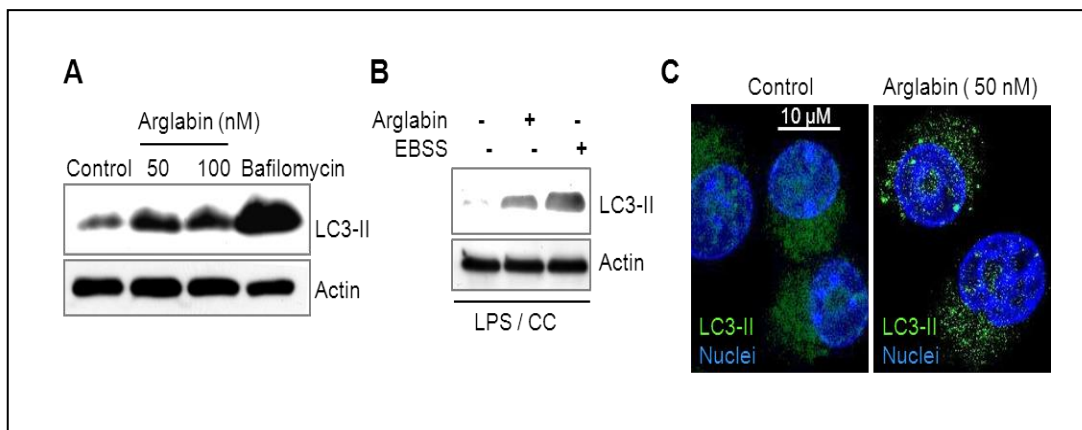


Figure 23. L'Arglabine induit l'autophagie au niveau des macrophages péritonéaux de souris C57Bl/6

A. Les cellules ont été traitées par deux doses d'Arglabine, 50 et 100 nM. Après 24 h de traitement, nous avons étudié l'expression de la protéine LC3-II par Western blot. Cette expression a été aussi évaluée au niveau du lysat protéique de macrophages traités par 30 nM de Bafilomycine A1. **B.** Sur des macrophages traités par le LPS-cristaux de cholestérol, nous avons évalué l'expression de LC3-II avec et sans traitement par l'Arglabine. Cette expression a été comparée par rapport à celle des macrophages incubés dans l'EBSS. **C.** Les cellules ont été d'abord incubées avec 50 nM d'Arglabine durant 24 h, perméabilisées, hybridées avec l'anticorps anti- LC3-II (vert), le DAPI (bleu) et ensuite analysées par microscopie confocale (agrandissement : 630x).

Les études effectuées in vitro sur le développement de l'athérosclérose montrent que par induction d'autophagie, l'Arglabine inhibe spécifiquement l'activité de l'inflammasome NLRP3. Ces résultats très prometteurs nécessitent désormais une exploitation in vivo.

III. RESULTATS DES ETUDES IN VIVO

1. L'Arglabine : une molécule anti-inflammatoire qui induit l'expression de l'IL-10

L'étude *in vivo* porte sur des souris ApoE₂.Ki et des souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-} placées sous régime HFD ou *chow Diet* et traitées ou non par deux doses journalières d'Arglabine durant 13 semaines. Le traitement des souris ApoE₂.Ki susceptibles à l'athérosclérose réduit significativement la concentration plasmatique de l'IL-1 β (Figure 24).

Malheureusement, il était impossible de doser le taux d'IL-18 à cause de l'interférence des lipides plasmatiques présents à des concentrations élevées. Parallèlement à la

diminution de l'IL-1 β , nous avons noté que le traitement par l'Arglabine n'a induit aucune variation significative de la concentration plasmatique du TNF- α . Nous avons également montré que l'Arglabine a induit une augmentation très significative de la concentration plasmatique de la cytokine anti-inflammatoire, IL-10 (Figure 24). Cette cytokine est produite par les cellules T auxiliaires de type Th2, les lymphocytes B, mais bien davantage encore par les monocytes et les macrophages M2 anti-inflammatoires. Un effet protecteur de l'IL-10 contre le développement de l'athérosclérose a été rapporté. L'IL-10 est en effet présente dans les plaques d'athérosclérose humaines et son expression locale est inversement corrélée aux signes d'inflammation et à la mort des cellules par apoptose (183). Les souris IL-10^{-/-}, soumises à un régime alimentaire athérogène, se caractérisent par une infiltration accrue de cellules inflammatoires au niveau des plaques d'athérome et par une plus grande production de cytokines pro-inflammatoires.

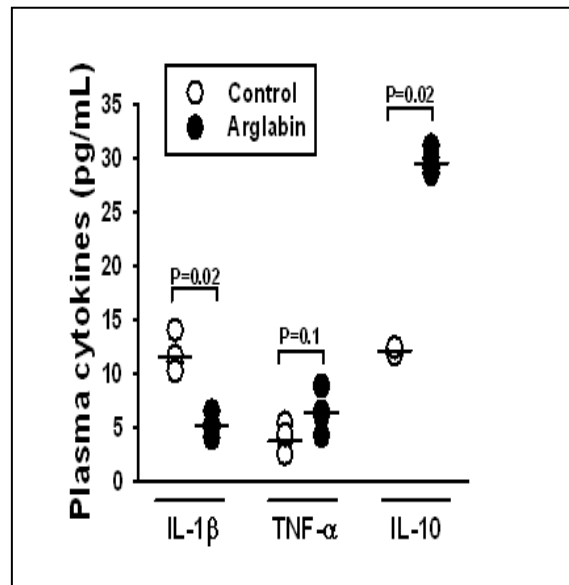


Figure 24. Effet de l'Arglabine sur la concentration plasmatique de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-10 chez des souris ApoE₂.Ki

Des souris femelles ApoE₂.Ki (âgées de 6 semaines) ont été subdivisées en deux groupes : le 1^{er} groupe a été traité par deux doses journalières d'Arglabine de 2.5 ng/g de m.c. et le 2^{ème} groupe a été injecté par le DMSO (groupe contrôle). Les deux groupes ont été placés sous régime HFD durant une période de 13 semaines. Les concentrations plasmatiques de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-10 ont été quantifiées par le kit Multiplex (Millipore). Les résultats ont été analysés par le test de *Kruskal-Wallis*. Dans le cas où le test est positif, l'analyse statistique est suivie par le test de *Wilcoxon rank sum* couplé au test de *Dunn-Sidak*. *p<0,05, **p<0,01.

La baisse de l'IL-1 β induite par l'Arglabine pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'expression de l'IL-10 qui diminue l'activation de la voie NF- κ B et induit la sécrétion de l'IL-1Ra (184). Il est aussi important de mentionner le rôle d'IL-10 dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol et dans la diminution de l'expression des MMPs et des molécules d'adhésion (185).

2. L'Arglabine : une molécule hypolipémiante

Le régime HFD entraîne des désordres métaboliques qui évoluent vers un événement athéromateux. Comparé au régime *chow Diet*, le régime HFD utilisé au cours de notre étude a induit une augmentation très significative de la concentration plasmatique de cholestérol total et des triglycérides chez les souris ApoE₂.Ki. Mais, et de manière très surprenante, le traitement par l'Arglabine normalise le profil lipidique de ces souris en réduisant de façon très significative la cholestérolémie (Figure 25.A) et la triglycéridémie (Figure 25.B).

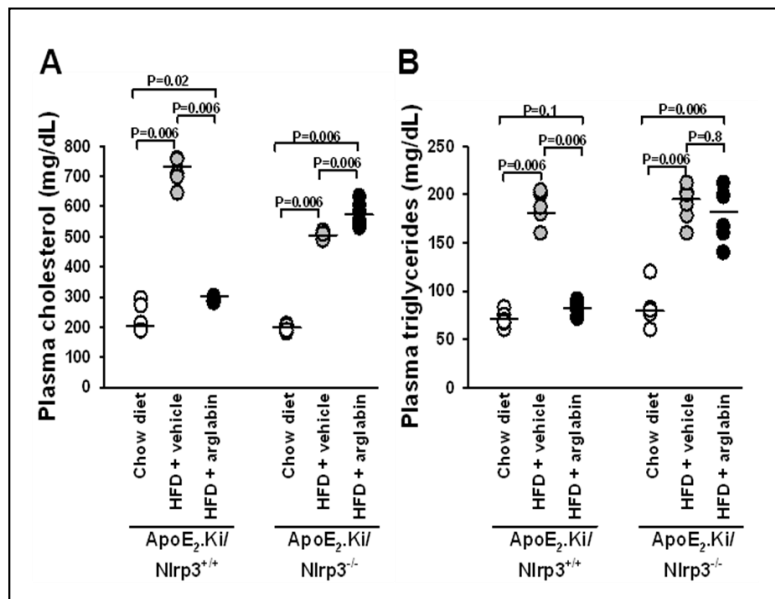


Figure 25. Effet de l'Arglabine sur les concentrations plasmatiques de cholestérol total et des triglycérides chez les souris ApoE₂.Ki et ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}

Ces deux modèles de souris ont été subdivisés en trois groupes. Chaque groupe est composé de 6 souris de sexe féminin âgées de 6 semaines. Le 1^{er} groupe de chaque modèle de souris a été soumis à un régime *chow diet*. Les 2^{ème} et 3^{ème} groupes ont été soumis à un régime HFD avec ou sans traitement par deux doses journalières d'Arglabine (2.5 ng/g de m.c.) durant 13 semaines. Les résultats ont été analysés par le test de *Kruskal-Wallis*. Dans le cas où le test est positif, l'analyse statistique est suivie par le test de *Wilcoxon rank sum* couplé au test de *Dunn-Sidak*. *p<0,05, **p<0,01.

L'utilisation du kit de sous-fractionnement des LDL et HDL du système Lipoprint de Quantimetrix fait apparaître que l'Arglabine réduit significativement la concentration plasmatique de l'ensemble des fractions des lipoprotéines. Par contre, la comparaison du pourcentage de chaque fraction (calculé par rapport à la concentration de cholestérol total) entre les souris ApoE₂.Ki traitées et non traitées, ne montre aucune différence significative (Tableau VI).

	ApoE₂.Ki		ApoE₂.Ki + Arglabine	
	Total (mg/ml)	Pourcentage	Total (mg/ml)	Pourcentage
HDL	308.0±67.5	42.8 ± 2.8	131.7 ± 9.6	41.7 ± 1.5
VLDL	179.7 ± 36.2	25.1 ± 2.5	71.2 ± 5.2	22.5 ± 0.6
LDL	405.7±51.6	57.1 ± 2.8	184.5 ± 22.5	58.1 ± 1.5

Tableau VI. Effet de l'Arglabine sur les différentes fractions des lipoprotéines

Nous avons émis plusieurs hypothèses afin d'expliquer la baisse de la cholestérolémie et de la triglycéridémie. Il est bien connu que la diminution du taux de cholestérol dans le sang est directement liée au nombre des récepteurs des LDL. C'est le principe du mode d'action des statines qui, en inhibant l'hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA), diminuent la synthèse du cholestérol cellulaire et augmentent donc le nombre des récepteurs des LDL. Ainsi, nous avons suggéré que l'Arglabine pourrait agir:

- en mimant le mode d'action des statines ou en affectant l'expression des gènes qui contrôlent l'expression des récepteurs LDL comme la proprotéine convertase subtilisine/kexine de type 9 (PCSK9)
- en induisant une stéatose hépatique
- en diminuant la biosynthèse intracellulaire de cholestérol
- et/ou en diminuant l'appétit des souris

Pour tester ces hypothèses, nous avons quantifié par Q-PCR l'expression des gènes qui codent pour les récepteurs des LDL et pour le PCSK9, chez des souris ApoE₂.Ki traitées

et non traitées par l'Arglabine. Nous n'avons pas observé de différence significative entre les deux groupes : l'Arglabine n'affecte donc pas la voie du récepteur LDL.

Nous avons ensuite observé anatomiquement les foies des deux groupes de souris et nous avons mesuré le taux de cholestérol au niveau de cet organe. L'observation n'indique pas de stéatose hépatique et le dosage du cholestérol au niveau du foie n'a montré aucune différence significative entre les deux groupes. L'Arglabine n'agit donc pas par cette voie pour diminuer le cholestérol plasmatique.

Nous avons aussi évalué la biosynthèse intracellulaire du cholestérol sur les cellules hépatiques en culture en mesurant l'incorporation d'acétate-¹⁴C. La comparaison entre les deux groupes de souris ne montre aucune différence significative.

Enfin, comme il n'y a pas de différence significative au niveau du poids des souris et que toutes les fractions des lipoprotéines sont réduites, l'hypothèse probable pourrait être que l'Arglabine agit au niveau de l'absorption intestinale.

3. L'Arglabine : une molécule antioxydante

Les désordres lipidiques, l'oxydation et l'inflammation sont les trois composantes qui initient la mise en place et le maintien des plaques d'athérome. Depuis un quart de siècle, la toxicité des LDLox a été mise en évidence et leur rôle dans le processus athéromateux a grandement évolué au fil du temps. En 1983, Hessler et ses collaborateurs ont montré que les LDLox altèrent la fonction artérielle à travers leurs propriétés cytotoxiques exercées sur les cellules endothéliales (186). En 1984, Heinecke, Steinbrecher et leurs collaborateurs ont montré que l'internalisation des LDL natives par les macrophages inhibe la formation des cellules spumeuses alors que l'internalisation des LDLox favorise leur formation (187, 188). Par leurs potentiels rôles pro-inflammatoires, immunogènes et cytotoxiques, les LDLox sont aujourd'hui l'acteur indispensable à la pathophysiologie de l'initiation et du développement de l'athérosclérose. Dans ce contexte, et grâce à la présence d'épitopes reconnus par l'immunité innée à la surface des LDLox, nous avons quantifié le taux des anticorps dirigés contre les LDLox chez les souris ApoE₂.Ki et les souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}.

Chez les souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}, le régime HFD n'a pas induit une augmentation de la concentration plasmatique des anticorps anti-LDLox. La comparaison des résultats entre

les souris traitées et non traitées par l'Arglabine, ne fait apparaître aucune différence significative, ce qui montre clairement l'importance de l'inflammasome NLRP3 dans l'oxydation des LDL (Figure 26).

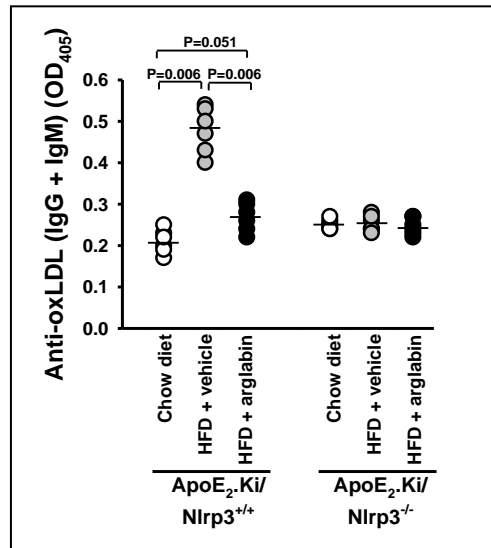


Figure 26. Effet de l'Arglabine sur l'oxydation des LDL chez les souris ApoE₂.Ki et les souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}

Ces deux modèles de souris, ont été subdivisés en trois groupes. Chaque groupe est composé de 6 souris de sexe féminin âgées de 6 semaines. Le 1^{er} groupe de chaque modèle de souris a été soumis à un régime *chow diet*. Le 2^{ème} et le 3^{ème} groupe ont été soumis à un régime HFD avec ou sans traitement par deux doses journalières d'Arglabine (2.5 ng/g de m.c.). Après, 13 semaines de traitement, le sang a été prélevé sur EDTA et la concentration plasmatique des anticorps anti-LDLox a été évaluée par ELISA. Les résultats sont présentés sous forme de points et la barre horizontale présente la médiane. Le résultat a été analysé par le test de *Kruskal-Wallis*. Dans le cas où le test est positif, l'analyse statistique est suivie par le test de *Wilcoxon rank sum*, couplé au test de *Dunn-Sidak*. *p<0,05, **p<0,01.

Chez les souris ApoE₂.Ki, le régime HFD a induit une augmentation très significative de la concentration plasmatique des anticorps anti-LDLox. Le traitement de ces souris par l'Arglabine provoque une réduction très significative d'environ 40% de la concentration des anti-LDLox. Ainsi, nous montrons à travers cette étude, le rôle antioxydant exercé par l'Arglabine (Figure 26). Un rôle très prometteur qui nous rappelle le scientifique Witztum JL. qui a abordé l'impact athéroprotecteur d'un produit pharmacologique ou d'une manipulation génétique qui inhibe l'oxydation des LDL (189).

4. L'Arglabine oriente les cellules immunitaires vers un phénotype anti-inflammatoire

a. L'Arglabine réduit le nombre des monocytes Ly-6C^{high} et augmente le nombre des monocytes Ly-6C^{low}

Une étude effectuée en 2007 a montré que l'hypercholestérolémie induit une augmentation drastique du nombre de monocyte Ly-6C^{high} chez les souris ApoE^{-/-}. Ces monocytes adhèrent à l'endothélium vasculaire, s'infiltrent dans la paroi artérielle où ils se différencient en macrophages nommés 'lésionnels' qui initieront le développement de la plaque d'athérome (190). Conformément à ce résultat, nous avons montré par cytométrie de flux que le régime HFD a induit une augmentation très significative du nombre de monocyte Ly-6C^{high} chez les souris ApoE₂.Ki (Figure 27.A). Cependant, le traitement de ces souris par l'Arglabine a induit un appauvrissement en monocytes Ly-6C^{high} et un enrichissement en monocytes Ly-6C^{low} (Figure 27.B).

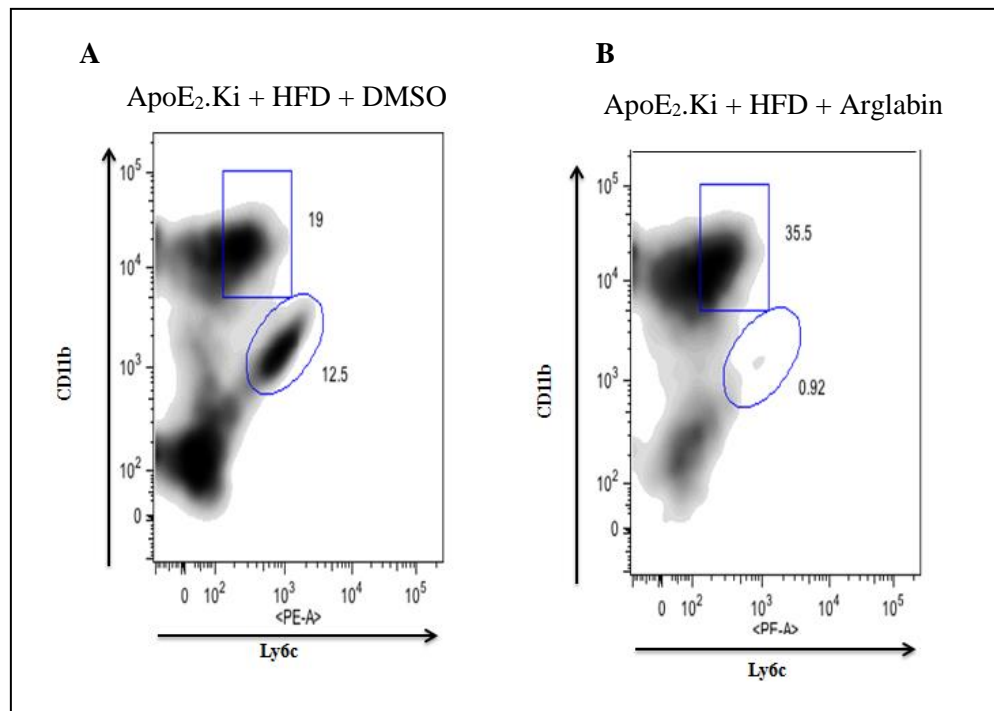


Figure 27. Effet de l'Arglabine sur le phénotype des monocytes au niveau de la rate de souris ApoE₂.Ki.

Après 13 semaines de traitement, les souris ApoE₂.Ki traitées (B) ou non (A) par l'Arglabine ont été sacrifiées. La rate a été prélevée et broyée. Les splénocytes ont été d'abord incubés avec l'anticorps anti-Ly6C et l'anticorps anti-CD11b et par la suite analysés par cytométrie de flux.

Chez les souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}, la comparaison du nombre de monocyte Ly-6C^{high} entre le groupe traité et le groupe non traité par l'Arglabine ne montre aucune différence significative. Un résultat attendu, qui confirme bien la corrélation entre le nombre de monocyte Ly-6C^{high} et l'hypercholestérolémie, puisque le traitement par l'Arglabine n'a pas réduit la cholestérolémie de ces souris.

b. L'Arglabine oriente les macrophages lésionnels d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire

Nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur le phénotype des macrophages 'lésionnels' infiltrés au niveau des plaques d'athérome. Cette étude a été effectuée par immunohistochimie sur des coupes transversales du sinus aortique de souris ApoE₂.Ki placées sous régime HFD. Le résultat montre que l'Arglabine oriente les macrophages d'un phénotype M1 pro-inflammatoire vers un phénotype M2 anti-inflammatoire (Figure 28).

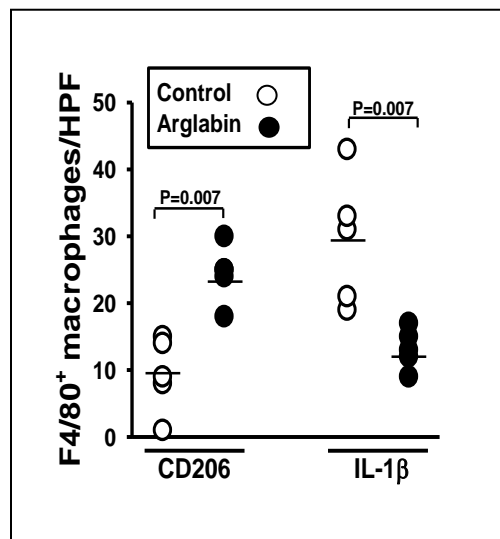


Figure 28. Effet de l'Arglabine sur le phénotype des macrophages des plaques d'athérome de souris ApoE₂.Ki

Après 13 semaines de traitement, les souris ApoE₂.Ki traitées ou non par l'Arglabine ont été sacrifiées. Les cœurs ont été prélevés, congelés dans de l'OCT et par la suite coupés par cryosection en fines coupes de 10 μm d'épaisseur. Les coupes, effectuées au niveau du sinus aortique, ont été ensuite analysées par immunohistochimie en utilisant les anticorps anti-CD206 et anti-IL-1β. Les résultats ont été analysés par le test de *Kruskal-Wallis*. Dans le cas où le test est positif, l'analyse statistique est suivie par le test de *Wilcoxon rank sum* couplé au test de *Dunn-Sidak*. *p<0,05, **p<0,01.

5. L'Arglabine : une molécule athéro-protectrice

L'effet de l'inflammasome NLRP3 sur le développement des lésions d'athérome est controversé dans la bibliographie. En 2010, Duewell P. et ses collaborateurs ont été les premiers à évoquer le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'athérosclérose. Ils ont montré que la transplantation de la moëlle osseuse de souris *Nlrp3^{-/-}*, *ASC^{-/-}* ou *IL-1 α ^{-/-}*/*IL-1 β ^{-/-}* chez des souris *LDLR^{-/-}* (LDL récepteur) placées sous régime HFD, induit une réduction de 60% de la surface des lésions artérielles au niveau du sinus aortique (161).

Un an plus tard, Menu P. et ses collaborateurs infirment ces données qui ont été publiées dans *Nature* et montrent que la déficience en protéines de l'inflammasome NLRP3 chez les souris *ApoE^{-/-}* n'exerce aucun effet, ni sur la progression de l'athérosclérose et l'infiltration des lésions artérielles par les macrophages, ni sur la stabilité de la plaque d'athérome (191). Cette contradiction a bouleversé les axes de recherche de la communauté scientifique qui s'est plutôt focalisée sur l'inflammasome NLRP3, et plus particulièrement sur son impact dans l'athérosclérose.

Afin de tirer au clair cette controverse, nous avons étudié l'effet de la déficience en *Nlrp3* sur le développement de l'athérosclérose. Pour ce faire, nous avons évalué la surface des lésions artérielles au niveau du sinus aortique et au niveau de la totalité de l'aorte chez les souris *ApoE₂.Ki* susceptibles à l'athérosclérose et chez les souris *ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}* placées sous régime HFD. La comparaison des résultats entre les deux modèles montre que la déficience en *Nlrp3* réduit de façon très significative la surface des lésions artérielles au niveau du sinus aortique (plus de 60%) (Figure 29.A.B) ainsi qu'au niveau de la totalité de l'aorte (plus de 50%) (Figure 29.C.D). Ce résultat confirme l'étude de Duewell P. et collaborateurs et montre clairement le rôle essentiel de l'inflammasome NLRP3 dans le développement des plaques d'athérome.

L'environnement anti-inflammatoire induit par notre molécule ainsi que ses propriétés normolipidémiantes, pro-autophagiques et antioxydantes suscitent l'intérêt de l'étude de l'effet de l'Arglabine sur le développement de l'athérosclérose chez les souris *ApoE₂.Ki*. Les résultats de cette étude montrent que l'Arglabine est une molécule athéroprotectrice qui 'protège' les souris *ApoE₂.Ki* contre le développement des plaques d'athérome au

niveau du sinus aortique (Figure 29.A.B) ainsi qu'au niveau de la totalité de l'aorte (Figure 29.C.D).

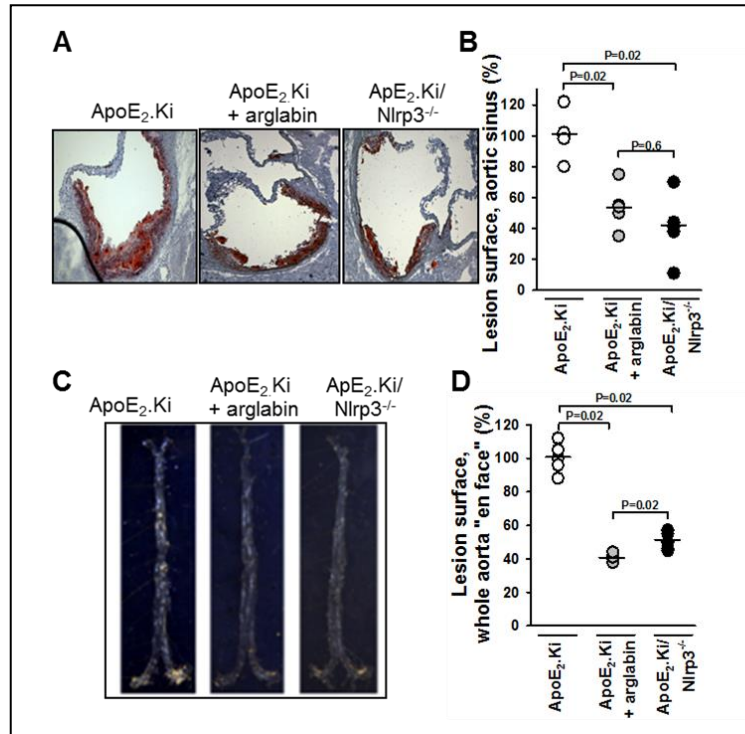


Figure 29. Effet de l'Arglabine sur le développement des plaques d'athérome

Des souris femelles ApoE₂.Ki (traitées et non traitées par l'Arglabine) et des souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-} âgées de 6 semaines ont été placées sous un régime HFD. Deux doses journalières d'Arglabine (2.5 ng/g de m.c.) ont été injectées par voie intra-péritonéale. Après 13 semaines de traitement, les souris ont été sacrifiées. **A.** les cœurs ont été prélevés et des cryosections de 10 µm ont été effectuées au niveau du sinus aortique. **C.** Les aortes ont été prélevées et préparées « en face » et les lésions ont été quantifiées par histomorphométrie. **B.** **D.** Les résultats ont été analysés par le test de *Kruskal-Wallis*. Dans le cas où le test est positif, l'analyse statistique est suivie par le test de *Wilcoxon rank sum* couplé au test de *Dunn-Sidak*. *p<0,05, **p<0,01.

L'étude 'EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRES ET ANTI-ATHEROGENES DE LA MOLECULE D'ARGLABINE CHEZ DES SOURIS APOE₂.KI SUSCEPTIBLES A L'ATHEROSCLEROSE' présente une voie de recherche très prometteuse pour la molécule d'Arglabine qui pourrait être une nouvelle approche thérapeutique.

Cette molécule pourrait limiter non seulement le développement de l'athérosclérose mais également limiter l'initiation et le développement des désordres métaboliques qui lui sont associés comme par exemple le DIABETE DE TYPE 2.

CHAPITRE III

EFFETS DE L'ARGLABINE SUR LE DEVELOPPEMENT DU DIABETE DE TYPE 2 CHEZ LES SOURIS APOE₂.KI

I. PUBLICATION

Cette étude est acceptée pour publication dans *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (Annexe V):

A. Abderrazak, DF. Darweesh Mahmood, V. Diderot, MN. Slimane, B. Friguet, B. Büchele, TH. Simmet, K. El Hadri1, D. Couchie and M. Rouis. **Inhibition of inflammasome NLRP3 by arglabin attenuates inflammation, protects pancreatic β -cells from apoptosis, and prevents type 2 diabetes mellitus development in ApoE₂.Ki mice on a chronic high-fat diet.**

II. RESULTATS

1. L'Arglabine : une molécule anti-inflammatoire

Nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur l'activité de l'inflammasome NLRP3 au niveau des îlots de Langerhans de souris ApoE₂.Ki et ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}. Afin d'atteindre cet objectif, les îlots ont été isolés et rapidement mis en culture en présence de LPS, différentes doses d'Arglabine et 1 mg/ml de cristaux de cholestérol. Les résultats de cette étude montrent que le traitement des îlots de Langerhans de souris ApoE₂.Ki par l'Arglabine inhibe, de façon dose-dépendante, l'expression de l'IL-1 β . La diminution de son expression est maximale en réponse à 100 nM d'Arglabine et l'EC₅₀ est d'environ 75 nM (Figure 30.A). Au cours de cette étude, la viabilité cellulaire (>95%) n'a pas été affectée en réponse aux différentes doses d'Arglabine testées.

Chez la souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}, l'expression de l'IL-1 β par les îlots de Langerhans est nulle (Figure 30.B). Des résultats similaires ont été observés au cours du traitement des macrophages péritonéaux de souris NLRP3^{-/-}.

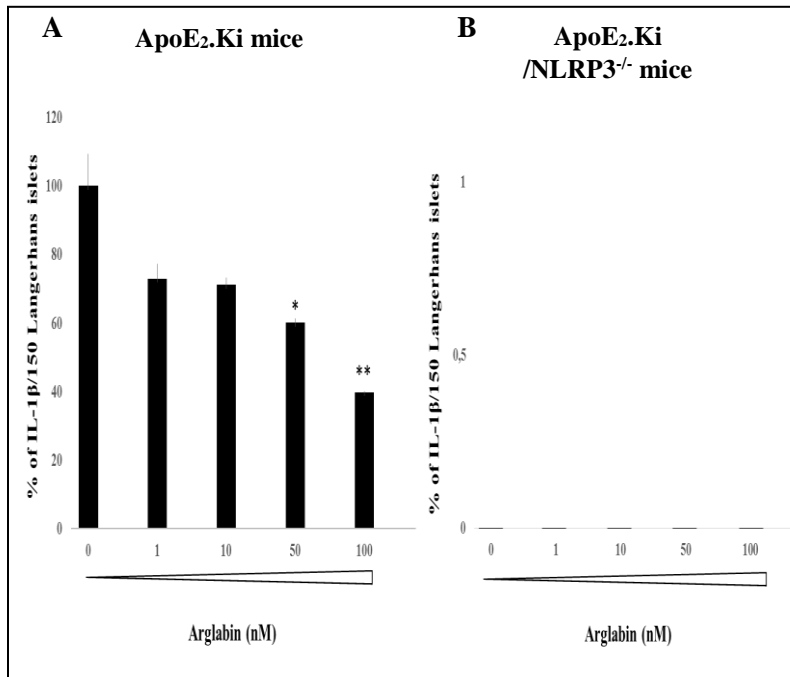


Figure 30. Effet de l'Arglabine sur l'expression de l'IL-1 β au niveau des îlots de Langerhans de souris ApoE₂.Ki et ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}

Cinq souris ApoE₂.Ki (A) et cinq souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-} (B) ont été sacrifiées et leurs îlots de Langerhans ont été stimulés dans un premier temps par le LPS (10 ng/ml) durant 2 h afin de déclencher le 'priming', traités dans un 2^{ème} temps par différentes doses d'Arglabine (1, 10, 50 et 100 nM) pendant 1 h et par la suite, stimulés par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol pendant 24 h. L'IL-1 β sécrétée a été quantifiée par ELISA. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SD.

2. L'Arglabine : une molécule normoglycémiant et normoinsulinémiant

Chez la souris ApoE₂.Ki, le régime HFD a induit une augmentation significative de la glycémie (Figure 31.A) et de l'insulinémie (Figure 31.B). Le traitement de ces souris par l'Arglabine durant 13 semaines a réduit, de façon significative, ces deux paramètres. Ce résultat valide l'hypothèse du rôle de l'isoforme humaine ApoE₂ dans les désordres métaboliques associés à la physiopathologie du DT2 et montre l'importance de l'Arglabine dans la stratégie thérapeutique des désordres inflammatoire, lipidique, glucidique et insulinique qui lui sont associés.

En 2011, Youm YH et ses collaborateurs ont montré que les souris sauvages (*wild type*, WT) Nlrp3^{-/-} et ASC^{-/-} placées sous régime DIO (*diet-induced obese mice*) présentent un risque moins important de développer une hyperglycémie avec une meilleure sensibilité à l'insuline dans les stades précoces de l'obésité (192). Les résultats observés dans le

modèle ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-} placées sous régime athérogène ont été plus ou moins similaires : la comparaison entre les souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-} placées sous régime *chow diet* et HFD ne montre aucune augmentation claire, ni de la glycémie (Figure 31.A) ni de l'insulinémie (Figure 31.B). De plus, le traitement de ces souris par l'Arglabine n'a induit aucun effet significatif sur ces deux concentrations, ce qui montre sa spécificité pour l'inflammasome NLRP3. Ce résultat préliminaire est à confirmer mais il est prometteur pour étudier la sensibilité au glucose et à l'insuline, ce qui pourrait nous aider à mieux exploiter les modèles ApoE₂.Ki et ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-} dans le contexte d'un DT2.

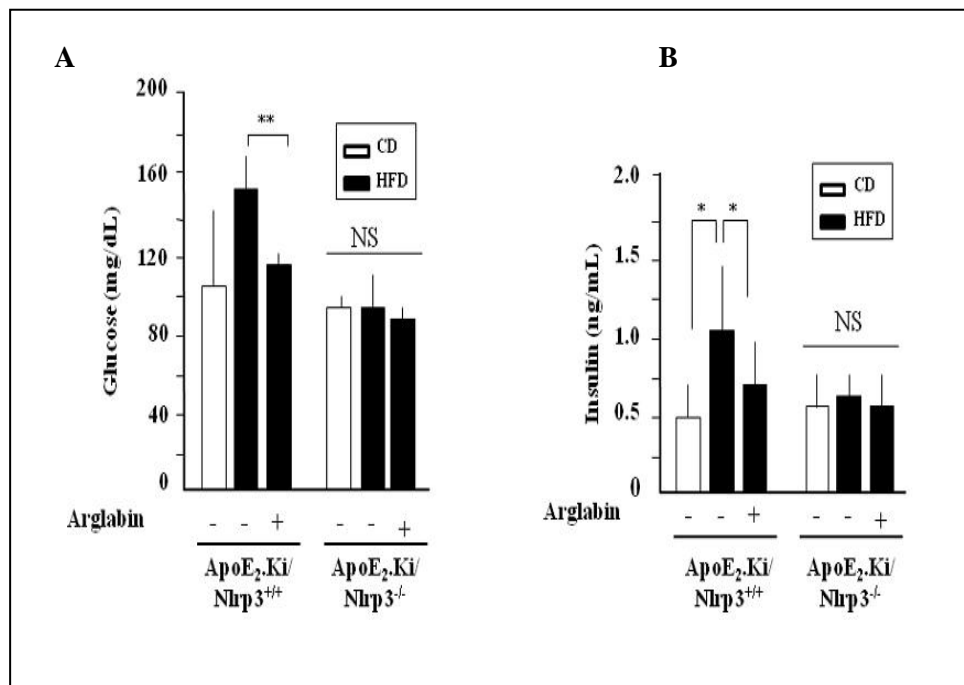


Figure 31. Effet de l'Arglabine sur la glycémie et l'insulinémie chez des souris ApoE₂.Ki et ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}

Ces deux modèles de souris ont été subdivisés en trois groupes. Chaque groupe est composé de 6 souris de sexe féminin âgées de 6 semaines. Le 1^{er} groupe a été soumis à un régime *chow diet*. Les 2^{ème} et 3^{ème} groupes ont été soumis à un régime HFD avec ou sans traitement par deux doses journalières d'Arglabine de 2.5 ng/g de m.c. durant 13 semaines. (A) La glycémie et (B) l'insulinémie ont été dosées par des méthodes enzymatiques. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ±SD, *p<0,05, **p<0,01.

3. L'Arglabine : une molécule anti-apoptotique

Une étude, publiée en 2011, a montré, chez la souris WT obèse, que la déficience en Nlrp3 diminue l'inflammation et l'apoptose des cellules β -pancréatiques et augmente la taille des îlots de Langerhans (192). Suite aux résultats de cette étude, nous avons évoqué l'hypothèse d'étudier par analyse immunohistochimique les cellules β -pancréatiques de notre modèle de souris ApoE₂.Ki placées sous régime athérogène et traitées ou non par l'Arglabine. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons étudié l'expression de la caspase 3 au niveau des cellules β -pancréatiques de souris ApoE₂.Ki. Nos résultats montrent que l'Arglabine réduit de façon significative l'activation de la caspase 3, marqueur d'apoptose, au niveau des cellules β -pancréatiques (Figure 32). Ainsi nous montrons clairement que la molécule d'Arglabine est caractérisée par un effet bénéfique sur le métabolisme lipidique, glucidique et insulinique et que cet effet est positivement corrélé à une action anti-apoptotique au niveau des cellules β -pancréatiques.

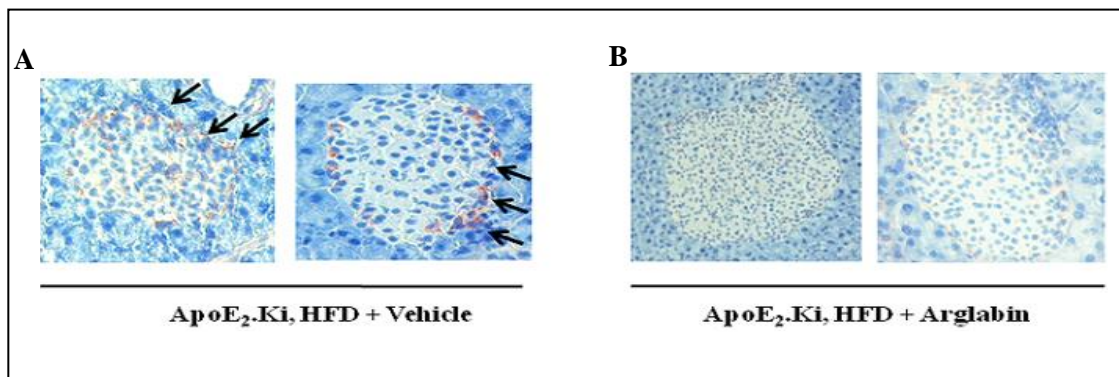


Figure 32. L'Arglabine inhibe l'apoptose des cellules β -pancréatiques chez des souris ApoE₂.Ki

Après 13 semaines de traitement, les souris ApoE₂.Ki placées sous régime HFD traitées (B) ou non (A) par l'Arglabine ont été sacrifiées et des coupes de pancréas ont été préparées et hybridées avec un anticorps spécifique anti-caspase 3. Les flèches indiquent le marquage de la caspase 3 (marquage en rouge).

Afin de compléter cette étude, nous avons mis en évidence le mécanisme d'action de l'Arglabine sur la lignée de cellule β -pancréatiques, INS-1.

III. RESULTATS DES ETUDES *IN VITRO*

1. L'Arglabine augmente l'expression de Bcl-2 et réduit l'expression de Bax

Le phénomène de l'apoptose, dépend de l'action des facteurs pro-apoptotiques et de l'action des facteurs anti-apoptotiques. Chez les mammifères, on distingue trois catégories : un groupe de facteurs anti-apoptotiques, Bcl-2-like (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bcl-B, Mcl-1 et A1) et deux groupes de facteurs pro-apoptotiques : le groupe Bax-like (Bax, Bak et Bok) et le groupe BH3-only (Bad, Bid, Bim, Bmf, Bik, Hrk, Noxa et PUMA). Bcl-2 est une protéine qui régule l'apoptose en maintenant l'intégrité mitochondriale et en contrôlant la libération de divers facteurs apoptogènes dans le cytoplasme (193). Au cours de cette étude, nous avons évalué le ratio Bax/Bcl-2 qui reflète la susceptibilité à l'apoptose, par Western blot au niveau des cellules INS-1 en culture. Ces cellules ont été d'abord stimulées par le LPS durant 2 h, traitées par deux doses différentes d'Arglabine et par la suite stimulées par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol pendant 24 h. Nous avons tout d'abord évalué l'expression de Bcl-2 et de Bax. Nos résultats montrent une augmentation, Arglabine dose-dépendante, de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 sans affecter l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax, ce qui a pour effet de réduire de façon significative le ratio Bax/Bcl-2 (Figure 33).

Ce résultat confirme celui obtenu au niveau des îlots de Langerhans et montre que l'Arglabine se caractérise par un effet anti-apoptotique, non seulement *in vivo* mais également *in vitro*.

L'Arglabine est une molécule anti-apoptotique qui, en induisant l'expression de Bcl-2, empêche la libération de protéines pro-apoptotiques de la mitochondrie et inhibe l'oligomérisation de Bax/Bak et l'insertion de ces dimères dans la membrane mitochondriale externe.

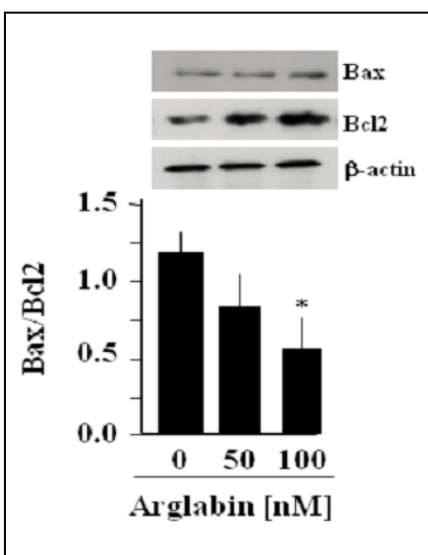


Figure 33. L'Arglabine réduit la susceptibilité des cellules INS-1 à l'apoptose

Les cellules INS-1 ont été d'abord stimulées par 10 ng/ml de LPS durant 2 h, incubées pendant 1 h en présence de 50 et 100 nM d'Arglabine et par la suite traitées par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol pendant 24 h à 37°C. L'expression de Bax/Bcl2 a été évaluée par Western blot. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SD, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

2. L'Arglabine : une molécule anti-inflammatoire

Il était également important de mettre en évidence l'effet anti-inflammatoire de l'Arglabine sur la lignée des cellules INS-1. Afin d'atteindre cet objectif, nous avons traité ces cellules par différentes doses d'Arglabine. Comme les macrophages péritonéaux, les INS-1 ont été stimulées par le LPS afin de déclencher le '*priming*' et par les cristaux de cholestérol afin d'activer l'inflammasome NLRP3. Au cours de cette étude, nous avons non seulement quantifié le taux d'expression de l'IL-1 β au niveau du surnageant cellulaire par ELISA, mais également mis en évidence par Western blot le processus de maturation de la pro-IL-1 β en IL-1 β biologiquement active en présence et en absence de traitement par l'Arglabine.

Le dosage par ELISA montre que le traitement des cellules INS-1 par l'Arglabine inhibe, de façon dose-dépendante, l'expression de l'IL-1 β (Figure 34). La diminution de son expression est maximale en réponse à 100 nM d'Arglabine et l' EC_{50} est d'environ 100 nM. L'effet inhibiteur de l'Arglabine confirme le résultat obtenu au niveau des îlots de Langerhans des souris ApoE₂.Ki.

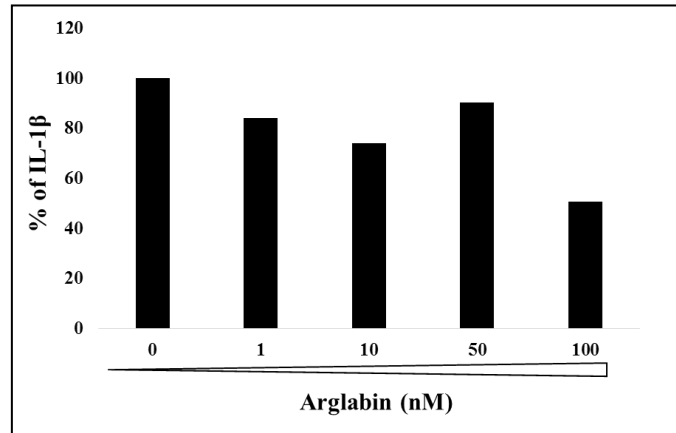


Figure 34. Effet de l'Arglabine sur l'expression de l'IL-1 β au niveau des cellules INS-1

Les cellules INS-1 ont été d'abord stimulées par le LPS (10 ng/ml) durant 2 h, traitées dans un 2^{ème} temps par différentes doses d'Arglabine (1, 10, 50 et 100 nM) pendant 1 h et par la suite, stimulées par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol durant 24 h. L'IL-1 β a été quantifiée par ELISA et les résultats sont présentés sous forme de moyenne.

En absence de l'Arglabine, l'analyse par Western blot montre une augmentation de l'expression de l'IL-1 β au détriment de la pro-IL-1 β . Le traitement des INS-1 par les cristaux de cholestérol a induit l'oligomérisation des différentes protéines de l'inflammasome NLRP3 et l'auto-activation de la caspase-1 qui, à son tour, a activé la pro-IL-1 β induite par le LPS. En présence de différentes doses d'Arglabine, le Western blot montre une réduction dose-dépendante de l'expression de l'IL-1 β vs une augmentation dose-dépendante de l'expression de la pro-IL-1 β (Figure 35). Ainsi, nous montrons l'effet inhibiteur dose-dépendant de l'Arglabine sur le processus de maturation de la pro-IL-1 β .

Ce résultat très encourageant semble suggérer un potentiel thérapeutique de l'Arglabine au niveau des cellules β -pancréatiques dans le contexte d'un DT2.

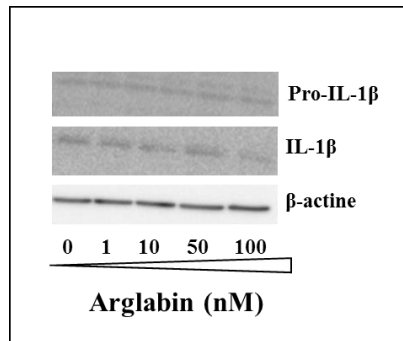


Figure 35. Effet de la molécule d'Arglabine sur le processus de maturation de la pro-IL-1 β au niveau des cellules INS-1

Les cellules INS-1 ont été d'abord stimulées par le LPS (10 ng/ml) durant 2 h, traitées dans un 2^{ème} temps par différentes doses d'Arglabine (1, 10, 50 et 100 nM) pendant 1 h et par la suite, stimulées par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol durant 24 h. L'expression de l'IL-1 β a été évaluée par Western blot.

3. L'Arglabine : une molécule inductrice d'autophagie

L'apoptose est un évènement cellulaire étroitement associé à un très vieux mécanisme conservé au cours de l'évolution, l'autophagie. Ces deux évènements cellulaires jouent un rôle déterminant au cours des processus physiologiques et des processus physiopathologiques. Des études récentes ont montré que l'autophagie est non seulement impliquée dans le processus inflammatoire responsable de l'installation du DT2 mais également essentielle pour la sécrétion d'insuline, la survie des cellules β -pancréatiques et la sensibilité à l'insuline. Des souris sauvages dont les cellules β -pancréatiques sont déficientes en Atg7 (*autophagy-related 7*), médiateur de la biogenèse autophagosomale, présentent moins de cellules β -pancréatiques une réduction de l'insulinémie et une altération de la tolérance au glucose. Cette déficience a été associée à une augmentation de l'apoptose et à la diminution de la prolifération des cellules β -pancréatiques (194). Ce résultat a été validé dans une deuxième étude effectuée sur le même modèle de souris par Wenying Q. et ses collaborateurs. Au cours de cette étude, ils ont montré que l'autophagie joue un rôle crucial dans le maintien de la structure, de la masse et de la fonction des cellules β -pancréatiques et que la déficience en Atg7 déclenche la progression de l'obésité vers un DT2 (173).

L'ensemble de ces études souligne l'importance d'étudier l'effet de l'Arglabine sur l'autophagie. La Becline 1 est une des protéines essentielles à l'induction de l'autophagie

et à la formation de l'autophagosome via le recrutement dans un pré-autophagosome de partenaires indispensables à l'autophagie telle que la protéine LC3 (195). Dans le but d'étudier l'effet de l'Arglabine sur l'autophagie, nous avons évalué l'expression de la Becline 1 et de la LC3 au niveau des cellules INS-1 en culture par Western blot. Les résultats montrent que l'Arglabine augmente significativement et de façon dose-dépendante l'expression de la Becline 1 (Figure 36.A) et de la protéine LC3 (Figure 36.B) au niveau des cellules β -pancréatiques en culture.

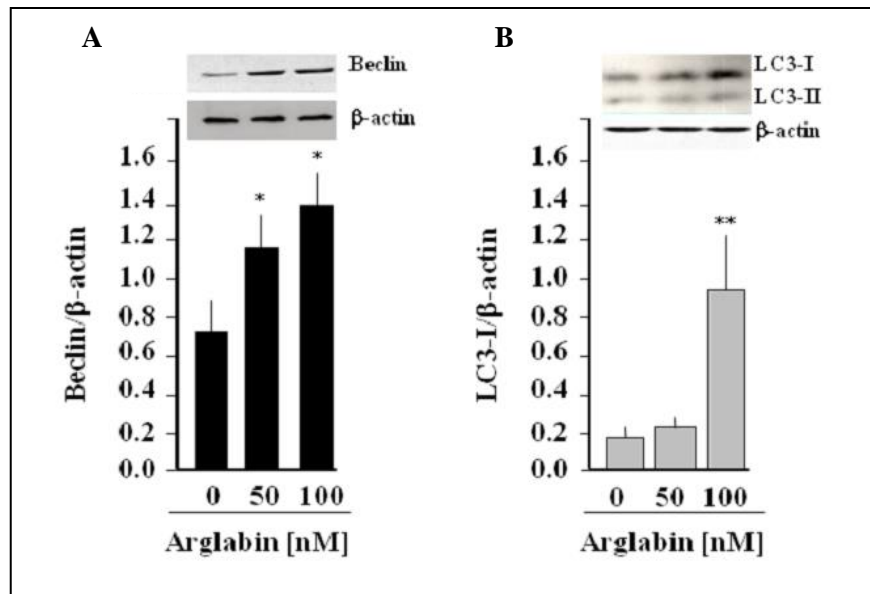


Figure 36. L'Arglabine augmente la susceptibilité des cellules INS-1 à l'autophagie

Les cellules INS-1 ont été d'abord stimulées par 10 ng/ml de LPS durant 2 h, incubées pendant 1 h en présence de 50 et 100 nM d'Arglabine et par la suite traitées par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol durant 24 h à 37°C. L'expression de la Becline 1 (A), de la LC3-I et de la LC3-II (B), a été évaluée par Western blot. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SD, *p<0,05, **p<0,01.

4. L'Arglabine et les voies de régulation de l'autophagie

L'apoptose et l'autophagie concourent l'une et l'autre à la destruction des cellules. Afin de mieux comprendre le mécanisme d'autophagie au niveau des cellules β -pancréatiques, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de l'autophagie induite par l'Arglabine sur l'expression des protéines apoptotiques Bax et Bcl-2. La procédure que nous avons adoptée afin d'étudier le mécanisme de l'autophagie chez la souris, consiste à recourir à des inhibiteurs et à des activateurs. Ainsi, nous avons élaboré les stratégies suivantes :

- premièrement, inhiber l'autophagie induite par l'Arglabine avec un inhibiteur spécifique, le 3-MA.
- deuxièmement, comparer les résultats obtenus par rapport à un puissant inducteur d'autophagie, la rapamicine.

Le 3-MA inhibe l'activité de l'une des enzymes clés de la voie PKB/Akt, la kinase PI3K de type III, enzyme essentielle à l'induction d'autophagie (163). La rapamicine a été utilisée pour induire l'autophagie, en inhibant la voie de régulation MTOR (*Mechanistic Target of Rapamycin*), principale voie régulant l'autophagie et aussi la voie la plus étudiée. La rapamicine se lie au récepteur intracellulaire FKBP12 et forme le complexe rapamicine-FKBP12 qui se fixe sur le domaine *FKBP12-Rapamycin Binding* de la protéine MTOR et inhibe ainsi l'activité kinase de MTOR (196). Afin d'atteindre l'objectif de cette étude, nous avons traité les cellules INS-1 par 100 nM d'Arglabine en présence et en absence de 10 mM de 3-MA et de 200 nM de rapamicine.

Les premiers résultats montrent que le traitement des cellules INS-1 par le 3-MA induit une augmentation du ratio Bax/Bcl-2 (Figure 37.A) alors que le traitement par l'Arglabine (Figure 33) et le traitement par la rapamicine (Figure 38.A) réduisent la susceptibilité des INS-1 à l'apoptose.

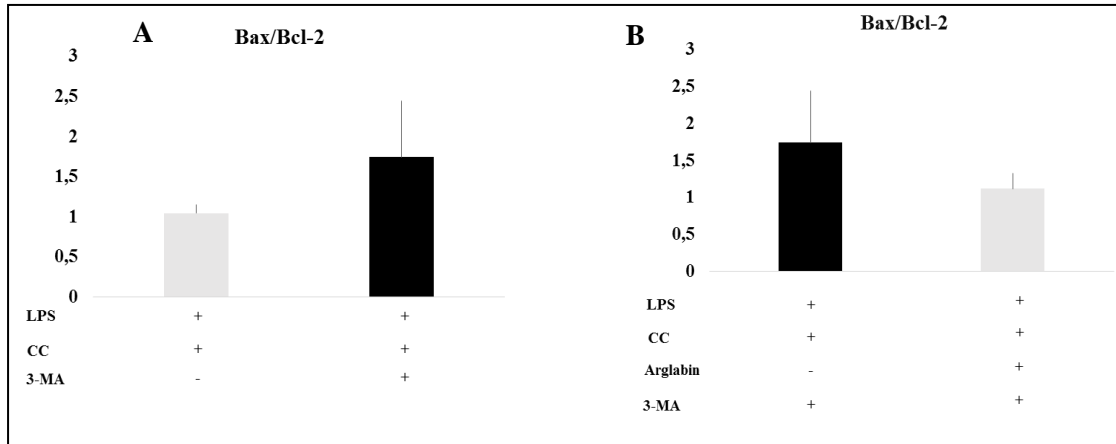


Figure 37. Le traitement des cellules INS-1 par le 3-Methyladénine en présence de l'Arglabine réduit leur susceptibilité à l'apoptose

A. Les cellules INS-1 ont été d'abord stimulées par 10 ng/ml de LPS durant 2 h, incubées pendant 1 h en présence de 10 mM de 3-MA et par la suite traitées par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol durant 24 h à 37°C. **B.** Les cellules INS-1 ont été d'abord stimulées par 10 ng/ml de LPS durant 2 h, incubées pendant 1 h en présence de 10 mM de 3-MA et de 100 nM d'Arglabine et par la suite traitées par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol durant 24 h à 37°C. L'expression de Bax et de Bcl-2 a été évaluée par Western blot. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± SD.

De façon surprenante, le traitement des cellules INS-1 par le 3-MA en présence d'Arglabine a réduit le ratio Bax/Bcl-2, ce qui pourrait s'expliquer par l'activation de la kinase PI3K de type III (Figure 37.B). En revanche, le traitement des INS-1 par la rapamycine en présence d'Arglabine augmente la susceptibilité des INS-1 à l'apoptose et ne montre aucune synergie entre les deux molécules (Figure 38.B). Ce résultat montre clairement que l'Arglabine est un inducteur d'autophagie qui pourrait être impliqué non seulement dans la voie de régulation PKB/Akt mais également dans la voie MTOR.

L'Arglabine a un effet anti-apoptotique dose-dépendant sur les cellules β -pancréatiques et augmente leur capacité autophagique. Les mécanismes d'action de l'Arglabine sur les voies de régulation de l'autophagie nécessitent des études plus approfondies chez la souris. Ces mécanismes pourraient rendre compte de l'amélioration du métabolisme glucidique caractérisé *in vivo*.

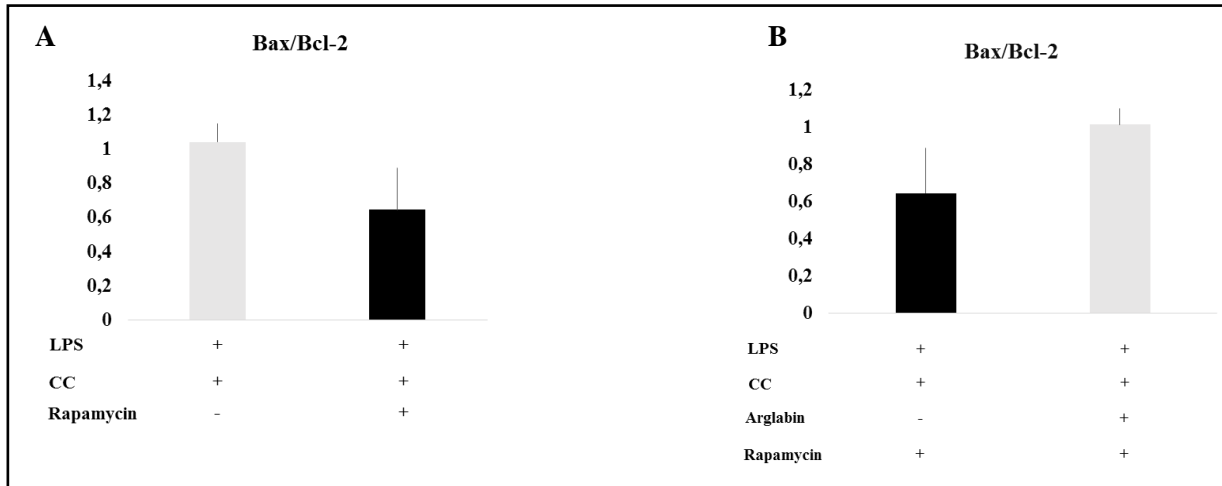


Figure 38. Le traitement des cellules INS-1 par la rapamycine en présence de l'Arglabine augmente leur susceptibilité à l'apoptose

A. Les cellules INS-1 ont été d'abord stimulées par 10 ng/ml de LPS durant 2 h, incubées pendant 1 h en présence de 200 nM de rapamycine et par la suite traitées par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol durant 24 h à 37°C. **B.** Les cellules INS-1 ont été d'abord stimulées par 10 ng/ml de LPS durant 2 h, incubées pendant 1 h en présence de 200 nM de rapamycine et de 100 nM d'Arglabine et par la suite traitées par 1 mg/ml de cristaux de cholestérol durant 24 h à 37°C. L'expression de Bax et de Bcl-2 a été évaluée par Western blot. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SD.

L'étude 'EFFETS DE L'ARGLABINE SUR LE DEVELOPPEMENT DU DIABETE DE TYPE 2 CHEZ LES SOURIS APOE₂.KI' montre que l'Arglabine exerce des effets anti-inflammatoire, normo-glycémiant, normo-insulinémiant et anti-apoptotique et augmente la capacité autophagique des cellules β -pancréatiques.

Cette molécule pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique pour limiter l'initiation des désordres métaboliques et cardiovasculaires qui présentent actuellement un problème majeur de santé publique ayant pris des prévalences alarmantes à travers le monde.



D

iscussion

Le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans la physiopathologie de l'athérosclérose chez la souris et chez l'homme n'est pas encore bien élucidé. Cependant, plusieurs études récentes décrites dans la littérature ont été conduites afin de mieux comprendre son rôle. Ainsi, Zheng F. et ses collaborateurs, par une approche de siRNA via des lentivirus, ont invalidé l'expression des protéines constituant l'inflammasome NLRP3 chez des souris ApoE^{-/-} placées sous régime alimentaire athérogène. Ils ont montré une réduction de l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-18 ainsi qu'une réduction de la progression des plaques d'athérome (197). De plus, ils ont observé une nette diminution de l'abondance des macrophages et des lipides au niveau des lésions artérielles (197). En revanche, ils ont remarqué une abondance des CMLV et du collagène, deux acteurs impliqués dans la stabilité des plaques d'athérome (197). Par ailleurs, nous avons montré, au cours de cette thèse, une nette diminution de la surface des lésions chez un autre modèle de souris, les souris ApoE₂.Ki/Nlrp3^{-/-} ayant une déficience dans l'activité de l'inflammasome NLRP3 (Nlrp3^{-/-}) par rapport au même modèle de souris où l'inflammasome NLRP3 est pleinement actif (Nlrp3^{+/+}). D'autres arguments en faveur du rôle athérogène de l'inflammasome NLRP3 ont été rapportés. Ainsi, en 2015, Peng K. et ses collaborateurs ont montré une forte induction de l'expression de l'inflammasome NLRP3 au niveau des lésions artérielles non seulement au niveau du sinus aortique de la souris ApoE^{-/-} mais également au niveau des artères coronaires chez l'homme (198). Ces derniers résultats suggèrent que l'inflammasome NLRP3 joue un rôle clé dans les pathologies vasculaires.

En se basant sur l'ensemble de ces données, nous avons étudié l'impact de l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 sur l'évolution des plaques d'athérome et le DT2. Dans ce contexte, nous avons caractérisé et identifié pour la première fois une molécule de la famille des sesquiterpènes lactones qui inhibe de façon spécifique l'activité de l'inflammasome NLRP3. Cette molécule, l'Arglabine, a été isolée à partir d'une plante vivace du genre *Artemisia*, espèce *glabella*.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié, dans un premier temps, l'effet de l'Arglabine sur les macrophages murins obtenus à partir de souris ApoE₂.Ki et de souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}. Dans un deuxième temps, j'ai étudié les effets de l'Arglabine sur les désordres

vasculaires et métaboliques associés au développement de l'athérosclérose et le DT2 sur les mêmes modèles de souris.

Les résultats de nos études ont montré que l'Arglabine :

1- réduit l'activité de l'inflammasome NLRP3 *in vitro* et *in vivo* et inhibe l'expression des protéines Nlrp3, IL-1 β et caspase-1.

2- induit l'autophagie au niveau des macrophages murins en culture, en augmentant significativement l'expression de la LC3-II.

3- normalise la concentration plasmatique de cholestérol total et des triglycérides et réduit de façon identique la concentration plasmatique de l'ensemble des fractions des lipoprotéines chez les souris ApoE₂.Ki placées sous régime alimentaire de type HFD.

4- réduit l'oxydation des LDL au niveau du plasma des souris ApoE₂.Ki placées sous régime HFD.

5- réduit le nombre des monocytes pro-inflammatoires (Ly-6C^{high}) et augmente le nombre des monocytes anti-inflammatoires (Ly-6C^{low}).

6- oriente les macrophages, présents au niveau des lésions artérielles sous un phénotype pro-inflammatoire M1, vers un phénotype anti-inflammatoire M2.

L'ensemble de ces résultats montre un rôle athéroprotecteur de l'Arglabine. En effet, elle réduit la surface des lésions artérielles au niveau du sinus aortique ainsi qu'au niveau de la totalité de l'aorte des souris ApoE₂.Ki placées sous régime athérogène. La déficience de ces souris en Nlrp3 induit un effet similaire à l'Arglabine, ce qui montre son rôle clé dans la physiopathologie de l'athérosclérose. L'inflammasome NLRP3 suscite donc un grand intérêt car son inhibition pourrait limiter l'inflammation en général et les maladies cardiovasculaires et le DT2 en particulier.

Les inhibiteurs des inflammasomes les mieux étudiés sont le Parthénolide et le Glyburide. Juliana C. et ses collaborateurs ont identifié le Parthénolide extrait de la plante *Tanacetum parthenium* (la Grande Camomille) (Figure 39). C'est un extrait d'une plante vivace utilisée comme herbe médicinale pour soigner de nombreuses pathologies inflammatoires telles que la fièvre, la migraine, l'arthrite et le psoriasis. L'effet du

Parthénolide a été étudié sur des macrophages isolés à partir de la moëlle osseuse de fémurs de souris sauvage. Les résultats de leur étude montrent que le Parthénolide est capable d'alkyler les résidus cystéine de l'IkappaB kinase β , ce qui inhibe son activité et inhibe donc la voie NF- κ B (199, 200). Le Parthénolide est un inhibiteur non-spécifique de l'inflammasome NLRP3. Il inhibe l'activité de la caspase-1 par alkylation de la cystéine catalytique Cys²⁸⁵ de la sous-unité p20 de la caspase-1, de différents types d'inflammasomes, comme le NLRP1 et le NLRC4.

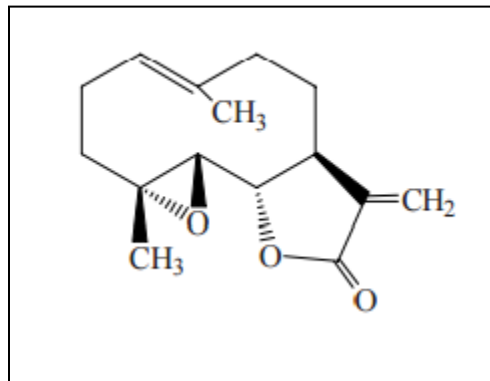


Figure 39. Structure chimique de la molécule de Parthénolide (201)

Cette molécule anti-inflammatoire peut aussi agir en inhibant l'activité ATPase du domaine NBD de la protéine Nlrp3, nécessaire à l'oligomérisation et à la formation du complexe NLRP3 et responsable de l'activation des cytokines pro-inflammatoires (202). L'effet du Parthénolide a été élucidé dans de nombreuses pathologies comme la cystite (203), le choc endotoxique (204) et les pathologies cardiovasculaires (205). Mais la non-spécificité du Parthénolide pour un inflammasome en particulier, limite la progression de la recherche sur cette molécule.

Le Glyburide est un composé sulfonylurée (comportant un groupe sulfonyle lié à un groupe urée) qui appartient à une classe d'anti-diabétiques utilisés dans le suivi du DT2 aux Etats-Unis (Figure 40). Le fragment cyclohexylurée dans la molécule de Glyburide agit par accroissement de la libération d'insuline, en inhibant les canaux potassiques sensibles à l'ATP (K [ATP]) des cellules β -pancréatiques, ce qui empêche l'efflux cellulaire des ions K^+ . Lamkanfi M. et ses collaborateurs ont eu l'idée d'étudier l'effet inhibiteur du Glyburide sur l'inflammasome NLRP3 au niveau des macrophages isolés de

la moëlle osseuse de souris sauvage. L'argument en faveur de cette hypothèse était qu'une faible concentration en ions K^+ est connue pour activer l'inflammasome NLRP3. Ils ont montré que le Glyburide exerce un effet inhibiteur dose-dépendant sur l'expression de protéines constituant l'inflammasome NLRP3, la caspase-1, l'IL-1 β et l'IL-18 (206). Le Glyburide présente un groupe sulfonyl et un groupe benzamido nécessaires à sa fonction inhibitrice de la caspase-1 (206). L'effet inhibiteur du Glyburide sur l'inflammasome a été bien décrit *in vitro*.

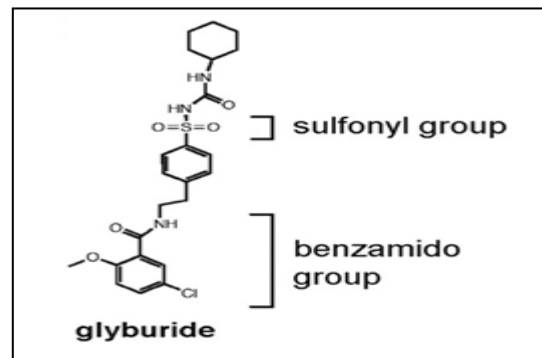


Figure 40. Structure chimique de la molécule de Glyburide (206)

Des études *in vivo*, effectuées dans un contexte cardiovasculaire (le cas d'infarctus aigu du myocarde), ont montré que l'effet inhibiteur du Glyburide s'exerce à des concentrations beaucoup plus élevées que celles utilisées dans le diabète. Ces concentrations ont été associées à une hypoglycémie létale, qui montre que le Glyburide est uniquement efficace dans le contexte de la thérapie antidiabétique (207).

Contrairement au Parthénolide et au Glyburide, l'Arglabine est une molécule qui pourrait constituer une approche thérapeutique très prometteuse dans le traitement des pathologies inflammatoires et métaboliques comme l'athérosclérose et le DT2. Nous avons montré que l'Arglabine n'agit pas sur la voie NF- κ B mais agit sur le processus de maturation de la pro-caspase-1 en inhibant son auto-clivage et donc en empêchant la genèse de sa forme active, la caspase-1. De plus, l'Arglabine induit la dégradation de la protéine Nlrp3 et de la pro-IL-1 β . Cette dégradation réduit l'activation et l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18.

A côté des études effectuées *in vitro*, les propriétés anti-inflammatoires de l'Arglabine ont été étudiées *in vivo*. Par rapport aux souris placées sous régime *chow diet*, le

traitement des souris ApoE₂.Ki placées sous régime alimentaire athérogène par deux doses journalières d'Arglabine durant 13 semaines montre (i) une réduction très significative de la concentration plasmatique de l'IL-1 β , (ii) et une augmentation très significative de la concentration plasmatique de la cytokine IL-10.

Il a été démontré que, la déficience des souris en IL-10 placées sous régime athérogène augmente la surface des lésions artérielles de 35%, par rapport aux souris IL-10^{+/+}. De plus, cette déficience est associée à une accumulation très significative de lymphocytes et de macrophages avec une réduction de collagène au niveau des plaques d'athérome (208). Dans une autre étude, Potteaux S. et ses collaborateurs ont étudié l'effet de l'IL-10 sur l'activation endothéliale du sinus aortique de souris placées sous régime athérogène. Les résultats de leur étude montrent que l'IL-10 inhibe complètement l'activation de la voie NF- κ B et l'expression des molécules d'adhésion endothéliales, VCAM-1 et ICAM-1 (209). Ces données montrent que l'Arglabine exerce un effet athéroprotecteur à partir des phases précoces du développement de l'athérosclérose à travers l'induction de l'IL-10. A cause de l'interférence des lipides plasmatiques présents à des concentrations élevées, nous n'avons pas été en mesure de quantifier la concentration plasmatique de l'IL-18 chez les souris ApoE₂.Ki traitées par l'Arglabine. Cependant, l'effet inhibiteur de l'Arglabine sur l'expression de cette cytokine a été bien mis en évidence *in vitro*. L'Arglabine inhibe l'IL-1 β et l'IL-18, deux cytokines pro-inflammatoires largement connues pour leurs propriétés pro-athérogènes. Elles exercent des effets pro-inflammatoires très importants par l'induction de la maturation des cellules T et des cellules NK, par l'activation des macrophages et par la production de cytokines, de chémokines et de molécules d'adhésion (112, 113). L'IL-1 β intervient dans l'amplification de la réaction inflammatoire en activant les enzymes de la voie de biosynthèse de la prostaglandine E₂ dans les CMLV. Ces effets pro-inflammatoires sont fortement impliqués dans l'initiation, le développement et la progression de l'athérosclérose. Quand elles sont exprimées par les macrophages infiltrés au niveau de la paroi artérielle, l'IL-1 β et l'IL-18 exercent des effets pro-athérogènes et induisent la formation de la chape fibreuse en provoquant la migration et la prolifération des CMLV. En effet, elles induisent (i) la production d'IFN- γ qui amplifie l'inflammation et inhibe la fibroprolifération et le développement d'un fibroathérome (115, 116), (ii) une

augmentation de l'activité collagénolytique des CMLV et une inhibition de la synthèse du collagène, ce qui contribue à la résistance de la chape fibreuse et à la rupture de la plaque (117) et (iii) une augmentation de l'expression des métalloprotéases par les macrophages et les CMLV, ce qui contribue à la déstabilisation de la plaque et à la dysfonction cardiaque (115, 118). L'ensemble de ces effets reflète l'impact anti-inflammatoire de la molécule d'Arglabine dans la protection contre l'athérosclérose et le développement des plaques d'athérome. L'étude des propriétés physico-chimiques de la molécule d'Arglabine montre qu'elle se caractérise par la présence d'une double liaison exocyclique conjuguée à la structure γ -butyrolactone au niveau du C-2. Cette particularité lui confère la possibilité de réagir avec les fonctions chimiques nucléophiles des protéines par une addition dite 1,4 ou addition de type Michael. Ce mode d'action semble jouer un rôle essentiel dans l'activité biologique de la molécule (175, 176). L'étude de son mécanisme d'action suggère que l'Arglabine inhibe l'activité de l'inflammasome NLRP3, au moins en partie, par l'induction de l'autophagie. Cet effet a été mis en évidence suite à l'induction de l'expression du LC3-II au niveau des macrophages péritonéaux stimulés par le LPS et par les cristaux de cholestérol. Il est important de mentionner que la concentration plasmatique en caspase-1, en IL-1 β et en IL-18 chez les souris LC3^{-/-} est significativement élevée par rapport aux souris LC3^{+/+}. *In vitro*, la stimulation des macrophages LC3^{-/-} par le LPS et l'ATP, aggrave le dysfonctionnement mitochondrial et induit l'auto-activation de la caspase-1 et l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-18. Il a été démontré que la déficience en LC3 altère l'homéostasie mitochondriale, ce qui induit une augmentation de la concentration intracellulaire en ROS. Cette augmentation induit la translocation de l'ADN mitochondrial au cytosol en réponse à la stimulation des macrophages. Il a également été montré que l'accumulation cytosolique de l'ADN mitochondrial est un co-activateur nécessaire à l'activation de la caspase-1 et que l'inflammasome NLRP3 est un facteur nécessaire à la translocation de l'ADN mitochondrial (210). Ce résultat pourrait expliquer le mécanisme d'action de la molécule d'Arglabine qui est fortement impliquée dans la régulation de l'inflammation à travers le système de l'inflammasome NLRP3 en préservant l'intégrité mitochondriale des macrophages. Des études *in vivo* ont montré que l'altération du mécanisme d'autophagie au niveau des macrophages lésionnels est positivement corrélée avec la progression des

plaques d'athérome. La dysfonction lysosomale est considérée comme la principale cause de l'altération du flux autophagique et de la dysfonction de l'autophagie au cours de l'athérosclérose (211). Il en résulte une aggravation de l'environnement inflammatoire, des anomalies dans l'efflux de cholestérol, une accumulation délétère de macrophages apoptotiques dans la plaque et une inefficacité de l'efférocytose pour éliminer les cellules apoptotiques trop nombreuses. L'ensemble de ces mécanismes induit l'augmentation des corps nécrotiques et la déstabilisation de la plaque d'athérome (180, 212, 213). Aujourd'hui, l'athérosclérose est considérée comme une pathologie complexe dont l'autophagie se situe au carrefour de la signalisation inflammatoire et du métabolisme lipidique. La déficience en ATG5 (*Autophagy-Related Protein 5*) au niveau des macrophages est associée à une activation de l'inflammasome NLRP3 et à une accumulation drastique des cristaux de cholestérol dans les plaques d'athérome (180). Une étude suggère que l'inhibition de l'inflammasome NLRP3 par autophagie pourrait se faire directement et/ou indirectement. En effet, l'autophagie induit la dégradation de la protéine Nlrp3 par ubiquitination, ce qui contribue au recrutement de l'adaptateur autophagique p62 et de la protéine LC3 (214). L'autophagie inhibe également l'oligomérisation de l'inflammasome de façon indirecte, en induisant l'efflux de cholestérol qui est un rempart de plus contre l'accumulation des cristaux de cholestérol et l'acquisition du phénotype « cellule spumeuse ». La fonction d'autophagie dans la régulation du stockage des lipides a été révélée via le mécanisme de lipophagie (212). Ce mécanisme joue un rôle principal dans la régulation de l'efflux de cholestérol des cellules spumeuses via la lipase acide lysosomale (LIPA). Cette enzyme hydrolyse les esters de cholestérol stockés sous forme de gouttelettes lipidiques afin de générer le cholestérol libre dont l'export se fait par l'intermédiaire du transporteur ABCA1. L'importance de l'efflux de cholestérol cellulaire des cellules spumeuses vers les apoA-I et HDL dans la protection contre les maladies cardiovasculaires en général et l'athérosclérose en particulier a été bien décrite. Il est la première et la plus importante étape du transport inverse du cholestérol (212). Il a été démontré que la dysfonction du mécanisme d'autophagie réduit l'efflux de cholestérol et son transport inverse à partir des macrophages lésionnels. L'excès de cholestérol s'accumule sous forme de cristaux au

niveau des plaques d'athérome, ce qui aggrave l'état inflammatoire via l'activation de l'inflammasome NLRP3 et l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-18 (215).

Prenant en considération l'ensemble de ces résultats, il serait intéressant de savoir quel(s) est/sont le(s) mécanisme(s) d'autophagie visé(s) par la molécule de l'Arglabine *in vivo*. L'étude de ce(s) mécanisme(s) d'action au niveau des plaques d'athérome présente une voie de recherche très prometteuse, qui nous permettrait de mieux comprendre l'interaction de la molécule d'Arglabine avec l'inflammasome NLRP3 et la lipophagie.

Outre ses propriétés anti-inflammatoires et ses propriétés d'induction de l'autophagie, les propriétés normolipidémiantes de l'Arglabine sont d'une importance capitale pour la protection contre la formation de lésions. Au cours de ce travail, nous avons montré que l'Arglabine normalise la concentration plasmatique de cholestérol total et de triglycérides et réduit de façon très significative la concentration plasmatique de l'ensemble des fractions des lipoprotéines chez les souris ApoE₂.Ki placées sous régime athérogène. Dans la littérature, l'Arglabine est connue comme une drogue anti-cancéreuse qui inhibe la farnésyl transférase (175) afin d'inhiber l'activité de l'oncogène RAS dont la mutation activatrice est retrouvée dans plus de 30% des cancers humains (216). Il a été démontré que les inhibiteurs de la farnésyl diphosphate farnésyltransférase, tels que l'acide zaragozique et l'acide carboxylique, inhibent la biosynthèse endogène du cholestérol (217) et réduisent la biosynthèse hépatique des triglycérides (218). Les statines sont des inhibiteurs de la HMG-CoA réductase qui réduisent aussi la biosynthèse endogène du cholestérol en bloquant la synthèse de mévalonate. La diminution de la concentration hépatique en cholestérol conduit à l'activation de la transcription de différents gènes tels que le gène codant pour les LDLR, impliqués dans la clairance plasmatique des particules LDL (219). Or, nos résultats montrent que le traitement des souris par l'Arglabine n'inhibe pas la biosynthèse endogène du cholestérol et n'altère pas l'expression des LDL récepteurs au niveau des hépatocytes. En effet, les statines inhibent la HMG-CoA réductase, l'enzyme clé de la biosynthèse endogène du cholestérol. La baisse de la concentration du cholestérol au niveau du cytoplasme entraîne une augmentation de la synthèse des LDLR et donc une captation plus importante des LDL plasmatiques. Dans le cas de l'Arglabine, bien qu'elle inhibe la farnésyl diphosphate farnésyltransférase, une

enzyme intermédiaire dans la voie métabolique, qui catalyse la conversion de la farnésyl-pyrophosphate en squalène, n'entraîne pas d'augmentation des LDLR. Cependant, comme l'Arglabine réduit la concentration plasmatique de l'ensemble des fractions des lipoprotéines de façon équitable, l'hypothèse probable pour expliquer la normalisation du niveau de cholestérol et des triglycérides pourrait être attribuée à un blocage par l'Arglabine de l'absorption des lipides au niveau intestinal. L'IL-1 β inhibe l'activité de la lipoprotéine lipase qui hydrolyse les triglycérides contenus dans les VLDL et les chylomicrons (220), ce qui induit une hypertriglycéridémie chez les souris ApoE₂.Ki placées sous régime athérogène. Le traitement de ces souris par l'Arglabine réduit la concentration plasmatique de l'IL-1 β , d'où la baisse de la triglycéridémie. La HMG-CoA réductase est l'enzyme clé de la voie de synthèse du cholestérol et la 7- α hydroxylase (Cyp7a1) est l'enzyme clé de la transformation du cholestérol en acides biliaires. Kojima M et ses collaborateurs ont récemment montré que l'hypercholestérolémie induite chez la souris est sous le contrôle de la cytokine IL-1 β qui agit en inhibant l'expression de la Cyp7a1 et en augmentant l'expression de la HMG-CoA (221). Or, Kotas ME et ses collaborateurs ont montré que la normalisation du métabolisme lipidique n'est pas limitée à la baisse de la concentration plasmatique de l'IL-1 β . Ils ont montré que la caspase-1, indépendamment de l'IL-1 β , joue un rôle principal dans la régulation de l'appétit, le poids corporel et le métabolisme des lipides (222). La déficience des souris en caspase-1 induit une accélération de la clairance des triglycérides sans lien causal avec la synthèse et l'absorption des lipides. Il en résulte une altération de l'équilibre entre les triglycérides et les acides gras circulants. Une deuxième étude a souligné le rôle de la déficience en caspase-1 dans la malabsorption des lipides au niveau intestinal (223). L'administration orale d'huile d'olive à des souris caspase-1^{-/-} réduit l'absorption des triglycérides au niveau intestinal et réduit la captation des acides gras par le foie, le muscle et le tissu adipeux. De plus, la déficience en caspase-1 réduit la synthèse hépatique de VLDL à partir de triglycérides captés par le foie. L'analyse de l'expression des gènes hépatiques et intestinaux chez les souris caspase-1^{-/-} ne montre aucun effet significatif ni sur l'oxydation ni sur la captation des acides gras. Par contre, une inhibition du transport intracellulaire des acides gras a été bien établie. Cette inhibition est le résultat de la disponibilité limitée des lipides nécessaires à l'assemblage et à la sécrétion des

lipoprotéines riches en triglycérides (223). A côté de son rôle dans l'inflammation, l'apoptose et la nécrose, les études ci-dessus montrent clairement le rôle de la caspase-1 dans l'absorption intestinale et la sécrétion hépatique des triglycérides. L'ensemble de ces résultats montre que l'Arglabine est une molécule hypolipémiante ou anticholestérolémiante qui agit sur le métabolisme et l'absorption lipidique à travers l'inhibition de l'auto-clivage de la caspase-1. Au cours de ces dernières années, un progrès thérapeutique majeur a eu lieu concernant le traitement des sujets hypercholestérolémiques avec la mise au point des statines. Vu les effets indésirables dont elles sont responsables, comme la pancréatite aiguë et l'hépatite aiguë, l'Arglabine pourrait bénéficier d'un essor sans précédent dans le domaine de la prévention des maladies cardiovasculaires.

L'importance du cholestérol et plus particulièrement des LDL dans l'athérogénèse n'est plus contestée. De nombreuses études effectuées sur des sujets hypercholestérolémiques ont montré qu'il est possible de réduire le risque cardiovasculaire chez l'homme en diminuant le taux de LDL cholestérol. L'hyperlipidémie est associée à une augmentation de la captation des LDL par les cellules endothéliales. Une fois l'endothélium traversé, les LDL se retrouvent piégées dans l'espace sous-endothélial suite aux interactions qui s'établissent entre des constituants de l'apoprotéine B100 et les protéoglycanes de la matrice. Les ROS s'attaquent à la partie lipidique et protéique des LDL, ce qui aboutit à la formation de LDLox. Ces produits dérivés induisent l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales permettant l'invasion de la paroi artérielle par les leucocytes, l'un des événements précoces de l'athérogénèse (224). Au cours de ce travail, nous avons montré que les souris ApoE₂.Ki placées sous régime athérogène présentent une concentration plasmatique de l'IL-1 β significativement très élevée par rapport aux souris placées sous régime *chow diet*. Cette augmentation est en partie médiée par l'induction de l'oxydation des LDL cholestérol dans l'intima des souris. Au niveau des macrophages, les LDLox participent au '*priming*' de l'inflammasome NLRP3 à travers l'induction de la voie de l'hétérodimère TLR-4/TLR-6 et de la voie NF- κ B. Ils induisent aussi l'activation de l'inflammasome NLRP3 des macrophages où ils sont ingérés par phagocytose. Ce processus est associé à une induction de l'expression intracellulaire des ROS et à la libération de la cathépsine B, responsables de l'activation

de l'inflammasome NLRP3 et de l'activation de l'IL-1 β et de l'IL-18 (225). Une étude récente a souligné l'importance du récepteur CD36 dans l'activation de l'inflammasome NLRP3 par les LDLox. Il a été démontré que la déficience des souris ApoE^{-/-} en CD36 est associée à une réduction de la concentration plasmatique de l'IL-1 β et de l'IL-18 et à un risque moins important d'accumuler des cristaux de cholestérol au niveau des macrophages (226). La comparaison entre les souris traitées ou non montre que l'Arglabine réduit de façon très significative l'oxydation des LDL cholestérol chez les souris ApoE₂.Ki placées sous régime athérogène. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'effet de l'Arglabine sur l'inhibition de l'oxydation des LDL :

- l'Arglabine pourrait agir sur l'endothélium vasculaire en induisant la synthèse de NO, ce qui préserve la balance redox des cellules endothéliales et inhibe la sécrétion des ROS, notamment l'anion superoxyde à l'origine de l'oxydation des LDL.
- l'Arglabine pourrait agir directement sur le LDL cholestérol notamment au niveau de leur partie protéinique, l'apoprotéine B100, ce qui inhibe l'oxydation des LDL.
- une corrélation a été mise en évidence entre l'oxydation des LDL et l'état oxydatif intracellulaire qui dépend de l'équilibre entre les oxydases cellulaires et les anti-oxydants (227). Ainsi nous avons émis l'hypothèse que l'Arglabine pourrait agir au niveau cellulaire, notamment au niveau des macrophages, en inhibant les oxygénases cellulaires comme la NADPH oxydase ou en activant les antioxydants cellulaires comme le système de GSH.

Le résultat de cette étude fait l'objet de plusieurs voies de recherche qui suscitent l'intérêt de tester ces hypothèses et de décrypter les mécanismes d'action de l'Arglabine sur le processus d'oxydation des LDL.

L'hétérogénéité des populations monocytaires est conservée chez les mammifères. Chez la souris comme chez l'homme, les monocytes sont classés en sous-populations en fonction des marqueurs qu'ils expriment à leur surface. Ainsi on distingue :

- les monocytes Ly-6C^{high} (chez la souris) ou CD14^{high}CD16⁻ (chez l'homme) ou monocytes « classiques ». Ils sont les précurseurs des macrophages M1 pro-inflammatoires et des cellules dendritiques en conditions inflammatoires qui produisent le TNF- α et les ROS. Leur migration dépend de la chimiokine CCL2/MCP-1 exprimée par les macrophages (228).
- les monocytes Ly-6C^{low} (chez la souris) ou CD14⁺CD16⁺ (chez l'homme) ou monocytes « non-classiques ». Ces cellules ont une demi-vie plus longue que les monocytes Ly-6C^{high}. Ils sont appelées 'monocytes résidents' ou 'patrouilleurs', responsables de la sécrétion des cytokines et des chimiokines pour le recrutement d'autres types de cellules immunitaires nécessaires à la lutte contre l'inflammation. Leur migration dépend de la fractalkine et de son récepteur CX3CR1, présent sur les cellules endothéliales activées (229).

Swirski FK. et ses collaborateurs ont démontré que l'hypercholestérolémie induite chez la souris ApoE^{-/-} par le régime athérogène augmente le nombre des monocytes Ly-6C^{high} (190). Leurs résultats valident nos résultats obtenus chez les souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}. Nous avons déjà montré que la comparaison entre ces souris, placées sous régime *chow diet* ou HFD, ne montre aucune différence significative au niveau de la cholestérolémie et de la triglycéridémie. Par cytométrie de flux, nous avons quantifié le nombre de monocytes Ly-6C^{high} et de monocytes Ly-6C^{low} et les données ne montrent aucune différence significative. Il a été démontré que le traitement des sujets hypercholestérolémiques par une molécule anticholestérolémiant comme la statine, réduit le nombre des monocytes Ly-6C^{high}, responsables de la formation de la plaque d'athérome (190). Au cours de cette étude, nous avons montré que le traitement des souris ApoE₂.Ki placées sous régime athérogène par l'Arglabine, réduit le nombre des monocytes Ly-6C^{high} et augmente le nombre des monocytes Ly-6C^{low}. Ainsi l'Arglabine oriente les monocytes d'un phénotype pro-inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire à travers la réduction de la concentration plasmatique de l'IL-1 β et la normalisation du profil lipidique des souris ApoE₂.Ki. L'effet anti-inflammatoire de l'Arglabine a été validé par une étude effectuée sur le phénotype des macrophages 'lésionnels' infiltrés au niveau des plaques d'athérome par immunohistochimie. Les

résultats de cette étude montrent que l'Arglabine oriente ces macrophages d'un phénotype M1 pro-inflammatoire vers un phénotype M2 anti-inflammatoire.

Son potentiel thérapeutique dans les maladies cardiovasculaires (MCV) a suscité notre intérêt à décrypter les effets de la molécule d'Arglabine dans un contexte métabolique notamment dans le DT2, un facteur de risque fréquent des MCV. Afin d'atteindre cet objectif, j'ai étudié dans un premier temps, l'effet de l'Arglabine sur une lignée cellulaire β -pancréatique, les cellules INS-1 et sur les îlots de Langerhans murins prélevés sur des souris ApoE₂.Ki et des souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}. Dans un deuxième temps, j'ai étudié les effets de l'Arglabine sur les désordres métaboliques associés au développement du DT2 sur les mêmes modèles de souris. L'isoforme humaine ApoE₂ (ϵ 2/ ϵ 2) était le sujet de plus d'une trentaine d'études qui l'ont positivement corrélée à la survenue d'un DT2 (230). L'ApoE murine, principalement synthétisée au niveau du foie, se lie au récepteur des LDL, ce qui induit la clairance des lipoprotéines riches en triglycérides de la circulation (231). Or l'isoforme humaine ApoE₂ se fixe mal aux récepteurs LDL, ce qui induit une hypertriglycéridémie qui résulte de l'altération de la clairance hépatique des lipoprotéines riches en triglycérides (231, 232). L'inflammation est la complication majeure de l'hypertriglycéridémie qui en résulte, ce qui augmente le risque de développement des pathologies métaboliques (233, 234, 235). Après un régime riche en lipides, les souris ApoE₂.Ki présentent une insulinémie élevée et une hyperlipidémie postprandiale prolongée, accompagnée d'une augmentation du nombre de granulocytes. L'hyperlipidémie postprandiale et l'hypertriglycéridémie sont les deux principaux facteurs de risque des maladies métaboliques et vasculaires à cause de leur lien étroit avec l'activation des leucocytes, l'augmentation du nombre des neutrophiles et l'induction de l'inflammation (236, 237, 238, 239). Les souris ApoE₂.Ki, placées sous un régime de type HFD, présentent un dysfonctionnement adipocytaire sévère dû à l'inflammation du tissu adipeux et à son infiltration par les macrophages. Cette dysfonction est associée à une hyperinsulinémie prolongée qui prédispose les souris ApoE₂.Ki à un DT2 (240).

Les résultats de nos études ont montré que l'Arglabine :

- 1- réduit l'activité de l'inflammasome NLRP3 en inhibant le processus de maturation de la pro-IL-1 β en IL-1 β biologiquement active au niveau des îlots de Langerhans prélevés sur des souris ApoE₂.Ki et au niveau des cellules INS-1.
- 2- normalise la glycémie et l'insulinémie des souris ApoE₂.Ki placées sous régime HFD.
- 3- réduit l'apoptose des cellules β -pancréatiques des souris ApoE₂.Ki. L'Arglabine augmente, de manière dose-dépendante, l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 réduisant ainsi le ratio Bax/Bcl-2.
- 4- induit l'autophagie au niveau des cellules INS-1 en augmentant de façon dose-dépendante l'expression de la Becline 1 et de la protéine LC3.

Nous avons montré que la déficience des îlots de Langerhans en Nlrp3 est associée à une inhibition complète de l'expression de l'IL-1 β , ce qui montre le rôle de l'inflammasome NLRP3 dans l'inflammation des cellules β -pancréatiques. L'activation de l'inflammasome NLRP3, induite par les cristaux de cholestérol au niveau des îlots de Langerhans et au niveau des cellules INS-1, a été inhibée de façon dose-dépendante par l'Arglabine. Cet effet consiste en une inhibition du processus de maturation et du clivage de la pro-IL-1 β en IL-1 β biologiquement active. Il a été démontré que l'expression des composantes de l'inflammasome NLRP3, telles que la caspase-1, ASC et la Nlrp3 est augmentée principalement dans les macrophages infiltrés au niveau du tissu adipeux. Cette expression est directement corrélée à la résistance à l'insuline et à la gravité du DT2 (241, 242). L'activation de l'inflammasome NLRP3 (par l'hyperglycémie chronique, les acides gras libres, la production consécutive de l'IL-1 β , etc) contribue à l'inflammation locale, à l'apoptose des cellules β -pancréatiques et au déficit de la sécrétion de l'insuline (243). Stienstraa R. et ses collaborateurs ont montré que les souris NLRP3^{-/-} placées sous régime de type HFD sont protégées contre l'obésité, l'insulinorésistance, la stéatose hépatique et l'hypertrophie adipocytaire (244). Ces données suggèrent l'importance de l'Arglabine dans la préservation de la masse et de la

fonction des cellules β du pancréas des diabétiques et dans l'amélioration de leur sensibilité à l'insuline.

L'hypertriglycéridémie induite chez les souris ApoE₂.Ki susceptibles au DT2, a été associée à d'autres désordres métaboliques qui pourraient se résumer en une hyperglycémie et une hyperinsulinémie. Ces deux paramètres ont été normalisés par l'Arglabine. En effet, l'hyperglycémie induite par le régime HFD agit sur les îlots de Langerhans des souris ApoE₂.Ki en induisant l'expression de l'IL-1 β . L'hyperglycémie induit la production intracellulaire des ROS qui dissocient le complexe TXNIP/Trx-1. Une fois libéré, le TXNIP active l'inflammasome NLRP3 et induit le clivage de l'IL-1 β , ce qui favorise l'infiltration des cellules β -pancréatiques par les macrophages pro-inflammatoires. D'où l'augmentation de la concentration cytoplasmique de l'IL-1 β chez les souris ApoE₂.Ki. Ce résultat a été validé dans notre deuxième modèle animal, les souris ApoE₂.Ki/NLRP3^{-/-}. Nous avons montré que ces souris présentent une glycémie et une insulinémie similaires à celles des souris placées sous régime *chow diet* et ne présentent aucune différence significative au niveau de la concentration plasmatique de l'IL- β . L'effet toxique du glucose ainsi que l'environnement inflammatoire chronique induit chez les souris ApoE₂.Ki peuvent exacerber l'altération de la fonction des cellules β -pancréatiques, causant l'apoptose des cellules. Le traitement des souris ApoE₂.Ki placées sous régime athérogène montre que l'Arglabine inhibe l'apoptose des cellules β -pancréatiques des îlots de Langerhans. Ce résultat a été mis en évidence par analyse immunohistochimique, en évaluant l'expression du marqueur d'apoptose, la caspase 3. L'étude de son mécanisme d'action montre que l'Arglabine agit en augmentant l'expression de la Bcl-2, ce qui réduit le ratio Bax/Bcl-2, marqueur de la susceptibilité à l'apoptose. Les mécanismes de régulation de la prolifération des cellules β -pancréatiques ont été largement étudiés (245). Comme les autres types cellulaires, ces cellules expriment des régulateurs du cycle cellulaire comme les cyclines, les CDK (*cyclin-dependent kinases*) et les inhibiteurs des CDK, regroupés en deux populations : les CIP/KIP (*Cdk-interacting protein/kinase inhibitory protein*) et les inhibiteurs de la CDK4 (INK4/Arf) (245, 246, 247). L'inhibiteur de la CDK-1a (CDKN1a), appelé aussi p21, est un membre de la sous-population des CIP/KIP qui inhibe l'expansion de la masse cellulaire et la prolifération des cellules β -pancréatiques. Hernandez A.M. et ses

collaborateurs ont démontré que le p21 active directement l'apoptose des cellules β -pancréatiques à travers l'induction de processus de maturation de la caspase 3. Ils ont démontré que l'induction de l'expression de la Bcl-2 et l'inhibition de l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak inhibent le clivage de la caspase 3 induit par le p21 (248). Ainsi, il serait intéressant de confirmer ce mécanisme d'action dans notre modèle de souris et d'étudier l'effet de la molécule d'Arglabine sur la transcription de p21. Un effet anti-apoptotique similaire à celui de l'Arglabine a été observé dans une étude effectuée chez l'homme. Il a été démontré que le polyphénol extrait de la plante *Camellia sinensis* (thé vert), largement connue pour ses vertus dans la protection contre les maladies cardiovasculaires et le cancer, inhibe l'apoptose des îlots de Langerhans prélevés du pancréas humain. De la même façon que l'Arglabine, le polyphénol augmente de 2,5 fois l'expression de la Bcl-2 et réduit de 2 fois l'expression de Bax, ce qui a préservé la fonction et la masse cellulaire des cellules β au niveau du pancréas humain (249).

Depuis 2006, la découverte de vacuoles autophagiques au niveau des îlots de Langerhans de rats diabétiques (modèle ZDF) a marqué un tournant important dans l'étude du DT2. Cependant, le rôle physiopathologique de l'autophagie et son lien causal avec le DT2 n'a pas été bien rapporté jusqu'à maintenant. Au cours de ce travail, nous avons étudié l'effet de l'Arglabine sur le processus autophagique au niveau de la lignée des cellules INS-1. Les résultats de notre étude montrent que le traitement des INS-1 par l'Arglabine induit l'autophagie en augmentant l'expression de la Becline 1 et de la LC3. Une étude récente a démontré que l'activation de l'autophagie au cours de l'insulinorésistance est initialement induite au niveau du tissu adipeux. Ils ont démontré que l'induction de l'expression des marqueurs d'autophagie tels que la LC3-I, la LC3-II, l'Atg5 et le complexe Atg12-Atg5 est déclenchée au niveau du tissu viscéral (250). De plus, la transcription de leurs gènes est positivement corrélée avec le développement de l'obésité, la distribution du tissu adipeux viscéral et l'hypertrophie adipocytaire (251). L'altération des voies autophagiques est positivement corrélée à une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et l'IL-18. Il a été démontré que la délétion des protéines autophagiques, notamment la Becline 1 et la LC3, induit l'oligomérisation de l'inflammasome NLRP3, l'auto-activation de la caspase-1 et

l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-18 (252). Dans une autre étude, Ebato Ch. et ses collaborateurs ont démontré que l'induction de l'autophagie chez des souris diabétiques (modèle db/db) et des souris C57BL/6 placées sous régime de type HFD, induit la formation des autophagosomes, augmente le taux de conversion de la LC3-I en LC3-II et réduit la concentration cytoplasmique des marqueurs de l'inflammation. Pour déterminer le rôle physiologique de l'autophagie au niveau des îlots de Langerhans, Ebato Ch. et ses collaborateurs ont généré un modèle de souris déficientes en Atg7, un gène essentiel à la formation des autophagosomes, en particulier au niveau des cellules β -pancréatiques. Cette déficience a été associée à une dégénération des cellules β , une altération de la tolérance au glucose et une réduction de la sécrétion d'insuline (253). Ce résultat a été validé par l'équipe de Jung H.S. et ses collaborateurs qui, par le biais du même modèle de souris, ont montré que la déficience en Atg7 est associée à une déficience en insuline et à une hyperglycémie. Ces deux désordres métaboliques peuvent être expliqués par la réduction de la masse des cellules β -pancréatiques qui résulte de la baisse de la prolifération des cellules β et de l'induction de leur apoptose (194). Prenant en considération l'ensemble des résultats de ces études, nous montrons l'importance du potentiel pro-autophagique de la molécule de l'Arglabine dans la réduction de l'environnement inflammatoire et le maintien de l'architecture et de la fonction des cellules β au niveau des pancréas des souris ApoE₂.Ki placées sous régime athérogène. Notre étude montre la causalité entre deux mécanismes cellulaires au cours de la pathogenèse d'un DT2, la survie et la mort des cellules β -pancréatiques. Ce lien a suscité notre intérêt à émettre l'hypothèse suivante : l'autophagie pourrait-elle protéger de l'apoptose les cellules β -pancréatiques dans notre modèle de souris? Afin d'atteindre cet objectif, nous avons étudié l'effet de l'inhibition de l'autophagie induite par l'Arglabine sur l'apoptose des cellules INS-1 via l'évaluation de l'expression de la Bax et de la Bcl-2. L'effet pro-autophagique de l'Arglabine a été inhibé par un inhibiteur spécifique, le 3-MA et les résultats obtenus ont été comparés par rapport à un puissant inducteur de l'autophagie, la rapamicine. Les données de cette étude montrent que :

- le traitement des INS-1 par le 3-MA induit une augmentation du ratio Bax/Bcl-2.

- le traitement par l'Arglabine ainsi que le traitement des INS-1 par la rapamycine réduisent le ratio Bax/Bcl-2.
- le traitement des INS-1 par le 3-MA en présence de l'Arglabine réduit modérément le ratio Bax/Bcl-2.
- le traitement par la rapamycine en présence de l'Arglabine augmente le ratio Bax/Bcl-2 et augmente donc la susceptibilité des INS-1 à l'apoptose.

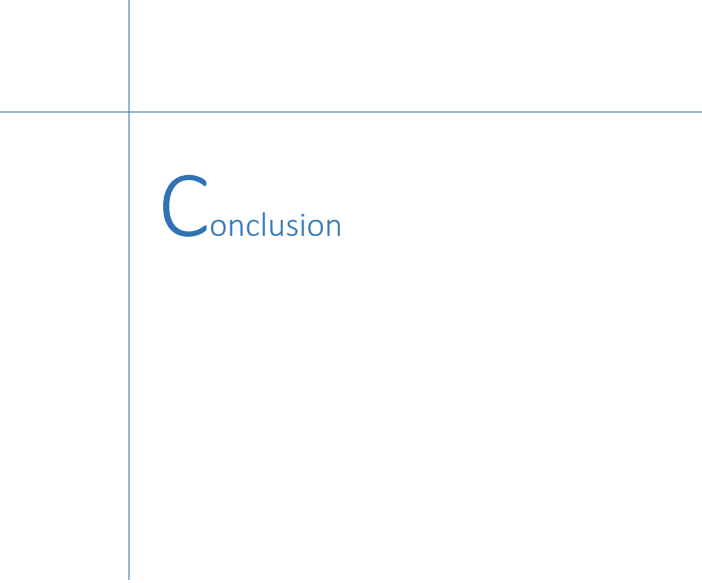
Le 3-MA inhibe l'autophagie en bloquant la PI3K, empêchant ainsi la formation de l'autophagosome (163). Il a été démontré que le 3-MA bloque l'expression de la Becline 1 (254) nécessaire à la régulation de l'initiation de l'autophagie et inhibe la conversion du LC3-I en LC3-II (255). D'autres études ont démontré que l'inhibition de l'autophagie par le 3-MA est étroitement liée à l'inflammasome NLRP3. Nos résultats sont validés par l'étude de Harris J. et ses collaborateurs qui ont démontré que le 3-MA induit l'activation de l'inflammasome NLRP3 et l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-18 à travers l'inhibition de la PI3K (255, 256). Le traitement des INS-1 par l'Arglabine, en présence du 3-MA, a réduit l'apoptose en induisant l'expression de Bcl-2. L'hypothèse pouvant expliquer ce résultat est que l'Arglabine pourrait agir en activant la kinase PI3K de type III. Cette activation est associée à l'inhibition de l'activité de l'inflammasome NLRP3 et à l'induction de l'autophagie des INS-1 en augmentant l'expression de la Becline 1 et de la LC3 et en réduisant leur apoptose.

La rapamycine, également connue sous le nom de sirolimus ou Rapamune, est utilisée comme médicament chez les patients ayant effectué une transplantation d'organes, en combinaison avec des immunosuppresseurs classiques, pour prévenir le rejet d'organes (257). Cette molécule se caractérise par des propriétés anti-inflammatoires, antifongiques (258) et anticancéreuses (257). Ainsi, la rapamycine est recommandée dans le traitement de plusieurs pathologies comme l'athérosclérose, les maladies d'Alzheimer et de Parkinson. La rapamycine (inhibiteur de la voie de régulation MTOR) est une molécule inductrice de l'autophagie qui agit comme l'Arglabine en augmentant l'expression de la Bcl-2 responsable de la réduction de l'apoptose des INS-1. Il a été démontré que la Rapamycine protège les cellules INS-1 stimulées par l'amyline contre l'apoptose en inhibant le clivage de la caspase 3. Une étude effectuée sur un modèle de souris

susceptible à un DT2 (Akita) montre que la rapamycine améliore la fonction des îlots de Langerhans en réduisant la concentration cytoplasmique de glucose (259) et en augmentant la sécrétion d'insuline (260). Elle réduit l'apoptose des cellules β -pancréatiques par amélioration du stress du réticulum endoplasmique sans effet significatif sur la masse cellulaire (259). Le traitement du même modèle de souris par la rapamycine augmente de deux fois le nombre des autolysosomes par rapport aux autophagosomes. Ce résultat montre que la rapamycine agit en induisant la fusion autophagosome-lysosome au niveau des cellules β -pancréatiques des souris diabétiques (260). Nous avons montré que le traitement des INS-1 par deux inducteurs d'autophagie, la rapamycine et l'Arglabine, augmente leur susceptibilité à l'apoptose. Chang G.R et ses collaborateurs ont étudié l'effet de l'injection intrapéritonéale d'une dose journalière de 2 mg/kg de rapamycine sur un modèle de souris obèses (KK/HIJ) placées sous régime athérogène durant 42 jours. Le résultat montre que le traitement par la rapamycine a été associé à une baisse du gain de poids et à une réduction de la concentration cytoplasmique des triglycérides et de la leptine. De plus, la rapamycine a induit une augmentation de la concentration cytoplasmique de l'insuline et une altération de la tolérance au glucose (261). Une autre étude a été effectuée *in vitro* sur des cellules INS-1 qui ont été traitées en continu par la rapamycine. Le résultat montre une induction de l'expression de la Bax par rapport à une baisse de l'expression de la Bcl-2, ce qui montre que l'induction prolongée d'autophagie est associée à une apoptose des cellules β -pancréatiques. Les résultats de ces études sont en faveur de l'hypothèse émise selon laquelle la molécule d'Arglabine pourrait être impliquée non seulement dans la voie de régulation PKB/Akt mais également dans la voie MTOR. Il a été démontré que l'induction prolongée d'autophagie en présence de la rapamycine est associée à l'induction de la génération des ROS, ce qui augmente le stress oxydant responsable de la dérégulation de la production des adipocytokines impliquées dans l'homéostasie de l'énergie incluant l'adiponectine, l'IL-6, le PAI-1 (*Plasminogen activator inhibitor-1*) et le MCP-1 (262, 263). Il en résulte des dommages cellulaires responsables de l'altération de la tolérance au glucose, l'insulinorésistance et l'apoptose des cellules β -pancréatiques (264, 265). Fraenkel et ses collaborateurs ont démontré que la rapamycine induit une insulinorésistance à travers la réduction de la phosphorylation de l'Akt et l'augmentation

de l'activité de GSK3b et de JNK (266). Malgré des effets indésirables comme l'hypertriglycémie, le gain de poids excessif et l'insulinorésistance, la rapamycine est encore recommandée chez l'homme. Vu la variation de l'effet de la rapamycine entre les deux espèces (267, 268, 269), l'importance des complications associées à ses effets secondaires remet en question l'étude physiologique de l'Arglabine dans la prévention de rejet d'organes.

Le mécanisme d'autophagie dans la physiopathologie du DT2 demeure complexe et pas bien décrit, d'où la nécessité d'études supplémentaires qui pourraient mieux élucider le mécanisme d'action de la molécule d'Arglabine au niveau des îlots de Langerhans.



C

onclusion

Les résultats obtenus au cours de ce projet de thèse montrent que l'inflammation pourrait constituer une nouvelle stratégie dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires comme l'athérosclérose et le DT2.

L'inflammasome NLRP3 et l'IL-1 β constituent la pierre angulaire de nombreuses pathologies inflammatoires. L'activité de l'inflammasome NLRP3 a été ciblée par la molécule d'Arglabine, un produit naturel extrait de la plante *Artemisia glabella*. Cette molécule inhibe l'oligomérisation et l'activation de l'inflammasome NLRP3 ainsi que le processus de maturation des cytokines pro-inflammatoires, l'IL-1 β et l'IL-18.

Les résultats de ce travail montrent que l'Arglabine exerce des propriétés anti-oxydantes, anti-athérogènes et anti-apoptotiques à travers l'inhibition spécifique de l'activité de l'inflammasome NLRP3, l'amélioration du profil lipidique, du profil glucidique/insulinémique et l'induction de l'autophagie. Ainsi, nous montrons, pour la première fois, le rôle capital de la molécule d'Arglabine dans l'amélioration des désordres métaboliques et cardiovasculaires associés à la physiopathologie de l'athérosclérose et le DT2.

Les résultats de cette étude présentent une voie de recherche très prometteuse dont la molécule d'Arglabine pourrait être une nouvelle approche thérapeutique dans l'initiation et le développement des maladies inflammatoires et dans la prévention des complications qui leur sont associées.



Perspectives

Les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse représentent un progrès dans les connaissances sur les propriétés de l'inflammasome NLRP3 et notamment sur son rôle dans la production de l'IL1- β dans le macrophage et les cellules β -pancréatiques. L'inhibition de l'inflammasome pourrait constituer une nouvelle stratégie thérapeutique dans la prise en charge pharmacologique de l'athérosclérose et du DT2. Cependant, d'autres études peuvent être envisagées, notamment des études cliniques afin que l'Arglabine puisse être utilisée chez l'homme.

- Nous avons montré que l'Arglabine induit la dégradation de la protéine Nlrp3 et inhibe le processus d'auto-activation de la caspase-1. En condition physiologique, le domaine PYD de la protéine Nlrp3 présente une conformation d'auto-agrégation ce qui rend la protéine Nlrp3 inactive et inhibe donc son interaction avec le domaine PYD de l'ASC. Le mécanisme responsable de cette inactivation demeure encore inconnu. La stimulation de l'inflammasome NLRP3 est étroitement corrélée à un changement de conformation de la protéine Nlrp3, indispensable à son oligomérisation. L'élucidation de la structure de la protéine Nlrp3 et de la caspase-1 par cristallographie devrait faciliter le décryptage du mécanisme d'action de l'Arglabine sur l'inflammasome NLRP3.

L'apoptose et l'autophagie sont deux mécanismes complexes qui concourent l'un et l'autre à la destruction des cellules. Nous avons bien élucidé l'effet protecteur de l'induction de l'autophagie par l'Arglabine dans la physiopathologie de l'athérosclérose et dans le maintien de l'architecture et de la fonction des cellules β au niveau du pancréas. D'autres études peuvent être envisagées afin de déterminer :

- le rôle de la molécule d'Arglabine sur les voies de régulation de l'autophagie : la voie PKB/Akt et la voie MTOR, ce qui nous permettrait de mieux décrypter la complexité de l'autophagie dans l'athérosclérose et le DT2.
- l'effet de l'Arglabine sur les régulateurs du cycle cellulaire des cellules β -pancréatiques et leurs inhibiteurs comme le p21.

Au cours de cette thèse, nous avons déterminé le schéma posologique optimal de la molécule d'Arglabine chez la souris: la demi-vie dans le plasma, la voie d'administration,

la dose et la fréquence d'administration. Ces données doivent être associées à une étude pharmacocinétique de l'Arglabine. Elle comprend l'étude de :

- l'absorption : cette étude nous permettra de valider notre hypothèse selon laquelle l'Arglabine pourrait être absorbée au niveau de l'intestin grêle.
- la distribution : l'Arglabine pourrait s'accumuler dans certains organes ou tissus ; ainsi il serait intéressant d'étudier l'affinité de l'Arglabine pour certaines protéines comme les protéines tissulaires ainsi que pour les acides nucléiques.
- la métabolisation, en particulier au niveau du foie.
- l'excrétion de l'Arglabine et de ses métabolites : l'Arglabine peut être éliminée par voie urinaire, par voie biliaire ou sous forme de métabolites conjugués. Cependant, de nombreux autres organes peuvent participer à son élimination comme les poumons, la peau (transpiration), les glandes salivaires, les glandes lacrymales...



Bibliographie

- 1- Haslam D.W. and James W. P.; Obesity; *Lancet*; (2005); 366:1197-1209.
- 2- DeMarchi E., Baldassari F., Bononi A., Wieckowski M. R. and Pinton P.; Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases and Obesity: Role of p66Shc and Protein Kinase C; *Oxid Med Cell Longev*; (2013); 2013:564961.
- 3- Genestra M.; Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants; *Cell Signal*; (2007); 19(9):1807-19.
- 4- Mikkelsen R.B. and Wardman P.; Biological chemistry of reactive oxygen and nitrogen and radiation-induced signal transduction mechanisms; *Oncogene*; (2003); 22:5734–5754.
- 5- Martindale J.L. and Holbrook N.J.; Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival; *J Cell Physiol*; (2002); 192:1–15.
- 6- Klaunig J.E. and Kamendulis L.M.; The role of oxidative stress in carcinogenesis; *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; (2004); 44:239–267.
- 7- Dinarello C.A.; The IL-1 family and inflammatory diseases; *Clin Exp Rheumatol*; (2002); 20:S1-13.
- 8- Gerdes N., Sukhova G.K., Libby P., Reynolds R.S., Young J.L. and Schonbeck U.; Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis; *J Exp Med*; (2002); 195(2):245-57.
- 9- Martinon F., Burns K. and Tschopp J.; The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of pro IL-beta; *Mol Cell*; (2002); 10(2):417-426.
- 10- Janeway CA.Jr.; The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self; *Immunol Today*; (1992); 13(1):11-16.
- 11- Horvath G.L., Schrum J.E., De Nardo C.M., Latz E.; Intracellular sensing of microbes and danger signals by the inflammasomes; *Immunol Rev*; (2011); 243:119–135.
- 12- Martinon F. and Tschopp J.; NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens; *Trends Immunol*; (2005); 26(8):447-454.
- 13- Jin T., Perry A., Smith P., Jiang J., Xiao TS.; Structure of the Absent in Melanoma 2 (AIM2) Pyrin Domain Provides Insights into the Mechanisms of AIM2 Autoinhibition and Inflammasome Assembly; *J Biol Chem*; (2013); 288(19):13225-35.
- 14- Tschopp J., Martinon F. and Burns K.; NALPs: a novel protein family involved in inflammation; *Nat Rev Mol Cell Biol*; (2003); 4:95-104.
- 15- Rathinam V.A., Jiang Z., Waggoner S.N., Sharma S., Cole L.E., Waggoner L., Vanaja S.K., Monks B.G., Ganesan S., Latz E., Hornung V., Vogel S.N., Szomolanyi-Tsuda E. and Fitzgerald K.A.; The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses; *Nat Immunol*; (2010); 11:395–402.
- 16- Poyet J.L., Srinivasula S.M., Tnani M., Razmara M., Fernandes-Alnemri T. and Alnemri E.S.; Identification of Ipaf, a human caspase-1-activating protein related to Apaf-1; *J Biol Chem*; (2001); 276:28309–28313.
- 17- Boyden E.D. and Dietrich W.F.; Nalp1b controls mouse macrophage susceptibility to anthrax lethal toxin; *Nat Genet*; (2006); 38:240–244.
- 18- Faustin B., Lartigue L., Bruey J.M., Luciano F., Sergienko E., Bailly-Maitre B., Volkmann N., Hanein D., Rouiller I. and Reed J.C.; Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation; *Mol Cell*; (2007); 25:713–724.
- 19- Hsu L.C., Ali S.R., McGillivray S., Tseng P.H., Mariathasan S., Humke E.W., Eckmann L., Powell J.J., Nizet V., Dixit V.M. and Karin M.; A NOD2-NALP1 complex mediates caspase-1-dependent IL-1b secretion in response to *Bacillus anthracis* infection and muramyl dipeptide; *Proc Natl Acad Sci*; (2008); 105:7803–7808.
- 20- Franchi L., Amer A., Body-Malapel M., Kanneganti T.D., Ozoren N., Jagirdar R., Inohara N., Vandenabeele P., Bertin J., Coyle A., Grant E.P. and Núñez G.; Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1b in salmonellainfected macrophages; *Nat Immunol*; (2006); 7:576–582.

- 21- Sutterwala F.S., Ogura Y., Szczepanik M., Lara-Tejero M., Lichtenberger G.S., Grant E.P., Bertin J., Coyle A.J., Galan J.E., Askenase P.W. and Flavell R.A.; Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1; *Immunity*; (2006); 24:317–327.
- 22- Zhao Y., Yang J., Shi J., Gong Y.N., Lu Q., Xu H., Liu L. and Shao F.; The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus; *Nature*; (2011); 477(7366):596–600.
- 23- Suzuki T., Franchi L., Toma C., Ashida H., Ogawa M., Yoshikawa Y., Mimuro H., Inohara N., Sasakawa C. and Nunez G.; Differential regulation of caspase-1 activation, pyroptosis, and autophagy via Ipaf and ASC in Shigella-infected macrophages; *PLoS Pathog*; (2007); 3(8): 111.
- 24- Mariathasan S., Newton K., Monack D.M., Vucic D., French D.M., Lee W.P., Roose-Girma M., Erickson S. and Dixit V.M.; Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf; *Nature*; (2004); 430:213–218.
- 25- Nordlander S., Pott J. and Maloy K.J.; NLRC4 expression in intestinal epithelial cells mediates protection against an enteric pathogen; *Mucosal Immunol*; (2014); 7:775–785.
- 26- McIlwain D.R., Berger T. and Mak T.W.; Caspase Functions in Cell Death and Disease; *Cold Spring Harb Perspect Biol*; (2013); 5.
- 27- Sandanger O., Ranheim T., Vinge L.E., Bliksøen M., Alfsnes K., Finsen A.V., Dahl C.P., Askevold E.T., Florholmen G., Christensen G., Fitzgerald K.A., Lien E., Valen G., Espevik T., Aukrust P. and Yndestad A.; The NLRP3 inflammasome is upregulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischemia-reperfusion injury; *Cardiovasc Res*; (2013); 199:164–74.
- 28- Kummer J.A., Broekhuizen R., Everett H., Agostini L., Kuijk L., Martinon F., van Bruggen R. and Tschopp J.; Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response; *J Histochem Cytochem*; (2007); 55:443–52.
- 29- Hoffman H.M., Mueller J.L., Broide D.H., Wanderer A.A. and Kolodner R.D.; Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome; *Nat Genet*; (2001); 29:301–305.
- 30- Gross O., Thomas C.J., Guarda G. and Tschopp J.; The inflammasome: an integrated view; *Immunol Rev*; (2011); 243:136-151.
- 31- Masumoto J., Dowds T.A., Schaner P., Chen F.F., Ogura Y., Li M., Zhu L., Katsuyama T., Sagara J., Taniguchi S., Gumucio D.L., Núñez G., Inohara N.; ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis; *Biochem Biophys Res Commun*; (2003); 303(1):69-73.
- 32- Masters S.L., Simon A., Aksentjevich I. and Kastner D.L.; Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease; *Annu Rev Immunol*; (2009); 27:621-668.
- 33- Bae J.Y. and Park H.H.; Crystal Structure of NALP3 Protein Pyrin Domain (PYD) and Its Implications in Inflammasome Assembly; *J Biol Chem*; (2011); 286:39528-39536.
- 34- Wang L., Yang J.K., Kabaleeswaran V., Rice A.J., Cruz A.C., Park A.Y., Yin Q., Damko E., Jang S.B., Raunser S., Robinson C.V., Siegel R.M., Walz T. and Wu H.; The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations; *Nat Struct Mol Biol*; (2010); 17:1324–1329.
- 35- Fernandes-Alnemri T., Wu J., Yu J.W., Datta P., Miller B., Jankowski W., Rosenberg S., Zhang J. and Alnemri E.S.; The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation; *Cell Death Differ*; (2007); 14(9):1590-1604.
- 36- Cohen G.M.; Caspases: the executioners of apoptosis; *Biochem J*; (1997); 326(Pt 1):1-16.
- 37- Kersse K., Lamkanfi M., Bertrand M.J.M., Berghe T.V. and Vandenabeele P.; Interaction Patches of Pro-caspase-1 Caspase Recruitment Domains (CARDs) Are Differently Involved in Pro-caspase-1 Activation and Receptor-interacting Protein 2 (RIP2)-dependent Nuclear Factor κ B Signaling; *J Biol Chem*; (2011); 286(41): 35874–35882.

- 38- Netea M.G., Nold-Petry C.A., Nold M.F., Joosten L.A., Opitz B., Van der Meer J.H., Van de Veerdonk F.L., Ferwerda G., Heinhuis B., Devesa I., Funk C.J., Mason R.J., Kullberg B.J., Rubartelli A., Van der Meer J.W. and Dinarello C.A.; Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1beta in monocytes and macrophages; *Blood*; (2009); 113:2324-2335.
- 39- Mariathasan S., Weiss D.S., Newton K., McBride J., O'Rourke K., Roose-Girma M., Lee W.P., Weinrauch Y., Monack D.M. and Dixit V.M.; Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP; *Nature*; (2006); 440(7081):228-232.
- 40- Martinon F., Petrilli V., Mayor A., Tardivel A. and Tschopp J.; Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome; *Nature*; (2006); 440(7081):237-241.
- 41- Yamasaki K., Muto J., Taylor K.R., Cogen A.L., Audish D., Bertin J., Grant E.P., Coyle A.J., Misaghi A., Hoffman H.M. and Gallo R.L.; NLRP3/cryopyrin is necessary for interleukin-1beta (IL-1beta) release in response to hyaluronan, an endogenous trigger of inflammation in response to injury; *J Biol Chem*; (2009); 284(19):12762-12771.
- 42- Sutterwala F.S., Ogura Y., Szczepanik M., Lara-Tejero M., Lichtenberger G.S., Grant E.P., Bertin J., Coyle A.J., Galán J.E., Askenase P.W. and Flavell R.A.; Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1; *Immunity*; (2006); 24(3):317-327.
- 43- Kanneganti T.D., Body-Malapel M., Amer A., Park J.H., Whitfield J., Franchi L., Taraporewala Z.F., Miller D., Patton J.T., Inohara N. and Núñez G.; Critical role for Cryopyrin/Nalp3 in activation of caspase-1 in response to viral infection and double-stranded RNA; *J Biol Chem*; (2006); 281(48):36560-36568.
- 44- Kanneganti T.D., Ozoren N., Body-Malapel M., Amer A., Park J.H., Franchi L., Whitfield J., Barchet W., Colonna M., Vandenabeele P., Bertin J., Coyle A., Grant E.P., Akira S. and Núñez G.; Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3; *Nature*; (2006); 440(7081):233-236.
- 45- Di Paolo N.C., Miao E.A., Iwakura Y., Murali-Krishna K., Aderem A., Flavell R.A., Papayannopoulou T., Shayakhmetov D.M.; Virus binding to a plasma membrane receptor triggers interleukin-1 alpha-mediated proinflammatory macrophage response in vivo; *Immunity*; (2009); 31(1):110-121.
- 46- Muruve D.A., Petrilli V., Zaiss A.K., White L.R., Clark S.A., Ross P.J., Parks R.J. and Tschopp J.; The inflammasome recognizes cytosolic microbial and host DNA and triggers an innate immune response; *Nature*; (2008); 452(7183):103-107.
- 47- Dostert C., Petrilli V., Van Bruggen R., Steele C., Mossman B.T. and Tschopp J.; Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica; *Science*; (2008); 320:674-677.
- 48- Hornung V., Bauernfeind F., Halle A., Samstad E.O., Kono H., Rock K.L., Fitzgerald K.A. and Latz E.; Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization; *Nat Immunol*; (2008); 9(8):847-856.
- 49- Lunov O., Syrovets T., Loos C., Nienhaus G.U., Mailänder V., Landfester K., Rouis M. and Simmet T.; Amino-functionalized polystyrene nanoparticles activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages; *ACS Nano*; (2012); 5:9648-9657.
- 50- Kool M., Petrilli V., De Smedt T., Rolaz A., Hammad H., van Nimwegen M., Bergen I.M., Castillo R., Lambrecht B.N. and Tschopp J.; Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome; *J Immunol*; (2008); 181(6):3755-3759.
- 51- Dostert C., Petrilli V., Van Bruggen R., Steele C., Mossman B.T. and Tschopp J.; Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica; *Science*; (2008); 320:674-677.
- 52- Cassel S.L., Eisenbarth S.C., Iyer S.S., Sadler J.J., Colegio O.R., Tephly L.A., Carter A.B., Rothman P.B., Flavell R.A. and Sutterwala F.S.; The Nalp3 inflammasome is essential for the development of silicosis; *Proc Natl Acad Sci*; (2008); 105(26):9035-9040.
- 53- Cruz C.M., Rinna A., Forman H.J., Ventura A.L., Persechini P.M. and Ojcius D.M.; ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages; *J Biol Chem*; (2007); 282(5):2871-2879.

- 54- Gross O., Yazdi A.S., Thomas C.J., Masin M., Heinz L.X., Guarda G., Quadroni M., Drexler S.K. and Tschopp J.; Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1; *Immunity*; (2012); 36:388–400.
- 55- Vince J.E., Wong W.W., Gentle I., Lawlor K.E., Allam R., O'Reilly L., Mason K., Gross O., Ma S., Guarda G., Anderton H., Castillo R., Häcker G., Silke J. and Tschopp J.; Inhibitor of apoptosis proteins limit RIP3 kinase-dependent interleukin-1 activation; *Immunity*; (2012); 36:215–227.
- 56- Zhong Z., Zhai Y., Liang S., Mori Y., Han R., Sutterwala F.S. and Qiao L.; TRPM2 links oxidative stress to NLRP3 inflammasome activation; *Nat Commun*; (2013); 4:1611.
- 57- Perregaux D. and Gabel C.A.; Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity; *J Biol Chem*; (1994); 269(21):15195-203.
- 58- Petrilli V., Papin S., Dostert C., Mayor A., Martinon F. and Tschopp J.; Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration; *Cell Death Differ*; (2007); 14(9):1583-9.
- 59- P. Pelegrin A.; Surprenant, Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1 β release by the ATP-gated P2X7 receptor; *Embo J*; (2006); 25:5071–5082.
- 60- Kanneganti T.D., Lamkanfi M., Kim Y.G., Chen G., Park J.H., Franchi L., Vandenabeele P. and Núñez G.; Pannexin-1- mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling; *Immunity*; (2007); 26 433–443.
- 61- Lawlor K.E. and Vince J.E.; Ambiguities in NLRP3 inflammasome regulation: Is there a role for mitochondria?; *Biochim Biophys Acta*; (2014); 1840:1433–1440.
- 62- Rossol M., Pierer M., Raulien N., Quandt D., Meusch U., Rothe K., Schubert K., Schöneberg T., Schaefer M., Krügel U., Smajilovic S., Bräuner-Osborne H., Baerwald C. and Wagner U.; Extracellular Ca²⁺ is a danger signal activating the NLRP3 inflammasome through G protein-coupled calcium sensing receptors; *Nat Commun*; (2012); 3:1329.
- 63- Lee G.S., Subramanian N., Kim A.I., Aksentijevich I., Goldbach-Mansky R., Sacks D.B., Germain R.N., Kastner D.L. and Chae J.J.; The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP; *Nature*; (2012); 492: 123–127.
- 64- Kowaltowski A.J., de Souza-Pinto N.C., Castilho R.F. and Vercesi A.E.; Mitochondria and reactive oxygen species; *Free Radic Biol Med*; (2009); 47(4):333-343.
- 65- Halle A., Hornung V., Petzold G.C., Stewart C.R., Monks B.G., Reinheckel T., Fitzgerald K.A., Latz E., Moore K.J. and Golenbock D.T.; The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta; *Nat Immunol*; (2008); 9(8):857-865.
- 66- Hornung V., Bauernfeind F., Halle A., Samstad E.O., Kono H., Rock K.L., Fitzgerald K.A and Latz E.; Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization; *Nat Immunol*; (2008); 9(8):847-856.
- 67- Shimada K., Crother T.R., Karlin J., Dagvadorj J., Chiba N., Chen S., Ramanujan V.K., Wolf A.J., Vergnes L., Ojcius D.M., Rentsendorj A., Vargas M., Guerrero C., Wang Y., Fitzgerald K.A., Underhill D.M., Town T. and Arditi M.; Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis; *Immunity*; (2012); 36(3):401-414.
- 68- McDermott M.F. and Frenkel J.; Hereditary periodic fever syndromes; *Neth. J. Med*; (2011); 59:118-125.
- 69- French FMF Consortium.; A candidate gene for familial Mediterranean fever, The French FMF Consortium; *Nature Genet*; (1997); 17:25-31.
- 70- International FMF Consortium; Ancient missense mutations in a new member of the RoRet gene family are likely to cause familial Mediterranean fever; *Cell*; (1997); 90:797-807.
- 71- Cuisset L., Drenth J.P., Berthelot J.M., Meyrier A., Vaudour G., Watts R.A., Scott D.G., Nicholls A., Pavlek S., Vasseur C., Beckmann J.S., Delpech M. and Grateau G.; Genetic linkage of the Muckle-Wells syndrome to chromosome 1q44; *Am J Hum Genet*; (1999); 65:1054-1059.

- 72- Hoffman H.M., Wright F.A., Broide D.H., Wanderer A.A. and Kolodner R.D.; Identification of a locus on chromosome 1q44 for familial cold urticarial; *Am J Hum Genet*; (2000); 66:1693-1698.
- 73- Feldmann J., Prieur A.M., Quartier P., Berquin P., Certain S., Cortis E., Teillac-Hamel D., Fischer A. and de Saint Basile G.; Chronic infantile neurological cutaneous and articular syndrome is caused by mutations in CIAS1, a gene highly expressed in polymorphonuclear cells and chondrocytes; *Am J Hum Genet*; (2002); 71:198-203.
- 74- Miceli-Richard C., Lesage S., Rybojad M., Prieur A.M., Manouvrier-Hanu S., Häfner R., Chamaillard M., Zouali H., Thomas G. and Hugot J.P.; Card 15 mutations in Blau syndrome; *Nature Genet*; (2001); 29(1):19-20.
- 75- Agostini L., Martinon F., Burns K., McDermott M.F., Hawkins P.N. and Tschopp J.; NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder; *Immunity*; (2004); 20(3):319-325.
- 76- Masters S.L., Lobito A.A., Chae J. and Kastner D.L.; Recent advances in the molecular pathogenesis of hereditary recurrent fevers; *Curr Opin Allergy Clin Immunol*; (2006); 6(6):428-433.
- 77- McDermott M.F. and Tschopp J.; From inflammasomes to fevers, crystals and hypertension: how basic research explains inflammatory diseases; *Trends Mol Med*; (2007); 13(9):381-388.
- 78- Liu J., Smith C.L., DeRyckere D., DeAngelis K., Martin G.S. and Berger J.M.; Structure and function of Cdc6/Cdc18: implications for origin recognition and checkpoint control; *Mol Cell*; (2000); 6(3):637-648.
- 79- Mayor A., Martinon F., De Smedt T., Petrilli V. and Tschopp J.; A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses; *Nature Immunol*; (2007); 8:497-503.
- 80- Lusis. A.J.; Atherosclerosis; *Nature*; (2000); 407(6801):233-41.
- 81- Sary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., Glagov S., Insull W.Jr., Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Wagner W.D. and Wissler R.W.; A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis; *Circulation*; (1995); 92:1355-1374.
- 82- Adeyi O., Smith O. and Robles S.; Public policy and the challenge of chronic noncommunicable diseases. Washington, DC: The World Bank; 2007.
- 83- WHO.; The global burden of disease; Geneva: World Health Organization; 2008b.
- 84- WHO.; World health statistics; Geneva: World Health Organization; 2009e.
- 85- WHO.; Preventing chronic diseases: A vital investment; 2005.
- 86- Beaglehole R. and Bonita R.; Global public health: A scorecard; *Lancet*; (2008); 372(9654):1988-1996.
- 87- Libby P., Warner S.J. and Friedman G.B.; Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids; *J Clin Invest*; (1988); 81(2): 487-98.
- 88- Gillian P. and Richards C.D. ; *Physiologie Humaine : Les fondements de la médecine*; pp :284-285; Masson.
- 89- Camilleri J-P., Berry C.L., Fiessinger J-N. and Bariéty J.; *Les maladies de la paroi artérielle*; pp : 2; *Médecine- Sciences Flammarion* ; (1987).
- 90- Fawcett Don W. and Jensch P.R.; *Histologie: L'essentiel* ; pp :199-200 ; Editions Maloine ; (2002).
- 91- Watkins H. and Farrall M.; Genetic susceptibility to coronary artery disease: from promise to progress; *Nat Rev Genet*; (2006); 7(3):163-73.
- 92-Gu L., Okada Y., Clinton S.K., Gerard C., Sukhova G.K., Libby P. and Rollins B.J.; Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice; *Mol Cell*; (1998); 2(2): 275-81.
- 93- Qiao J.H., Tripathi J., Mishra N.K., Cai Y., Tripathi S., Wang X.P., Imes S., Fishbein M.C., Clinton S.K., Libby P., Lusis A.J. and Rajavashisth T.B.; Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice; *Am J Pathol*; (1997); 150(5):1687-99.

- 94- Hanyu M., Kume N., Ikeda T., Minami M., Kita T. and Komeda M.; VCAM-1 expression precedes macrophage infiltration into subendothelium of vein grafts interposed into carotid arteries in hypercholesterolemic rabbits a potential role in vein graft Atherosclerosis; *Atherosclerosis*; (2001); 158(2): 313-9.
- 95- Collins R.G., Velji R., Guevara N.V., Hicks M.J., Chan L. and Beaudet A.L.; P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice; *J Exp Med*; (2000); 191(1): 189-94.
- 96- Fager G., Camejo G., Olsson U., Ostergren-Lundén G., Lustig F., Bondjers G. ; Binding of platelet-derived growth factor and low density lipoproteins to glycosaminoglycan species produced by human arterial smooth muscle cells; *J Cell Physiol*; (1995); 163(2):380-92.
- 97- Chait A., Han C.Y., Oram J.F. and Heinecke J.W.; Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease?; *J Lipid Res*; (2005); 46(3): 389-403.
- 98- Dong Z.M., Chapman S.M., Brown A.A., Frenette P.S., Hynes R.O. and Wagner D.D.; The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis.; *J Clin Invest*; (1998); 102(1):145-52.
- 99- Jiang S., Naito M., Kaizu C., Kuwata K., Hasegawa G., Mukaida N. and Shultz L.D.; Lipopolysaccharide-induced cytokine and receptor expression and neutrophil infiltration in the liver of osteopetrosis (op/op) mutant mice; *Liver*; (2000); 20(6): 465-74.
- 100- Ritter M., Buechler C., Langmann T., Orso E., Klucken J. and Schmitz G.; The scavenger receptor CD163: regulation, promoter structure and genomic organization; *Pathobiology*; (1999); 67(5-6):257- 61.
- 101-Yamada Y., Doi T., Hamakubo T. and Kodama T.; Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system; *Cell Mol Life Sci*; (1998); 54(7):628-40.
- 102- Campbell J.H. and Campbell G.R.; Cell biology of atherosclerosis; *J Hypertens Suppl*; (1994); 12(10): S129-32.
- 103- Stary H.C., Chandler A.B., Dinsmore R.E., Fuster V., Glagov S., Insull W.Jr., Rosenfeld M.E., Schwartz C.J., Wagner W.D and Wissler R.W.; A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; (1995); 15(9): 1512-31.
- 104- Stary H.C.; Changes in components and structure of atherosclerotic lesions developing from childhood to middle age in coronary arteries; *Basic Res Cardiol*; (1994); 89 Suppl 1:17-32.
- 105- Bogren H. and Larsson K.; An X-Ray-Diffraction Study of Crystalline Cholesterol in Some Pathological Deposits in Man; *Biochim Biophys Acta*; (1963); 75:65-69.
- 106- Miller Y.I., Viriyakosol S., Binder C.J., Feramisco J.R., Kirkland T.N. and Witztum J.L.; Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells; *J Biol Chem*; (2003); 278:1561–1568.
- 107- Michelsen K.S., Wong M.H., Shah P.K., Zhang W., Yano J., Doherty T.M., Akira S., Rajavashisth T.B. and Arditi M.; Lack of Toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E; *Proc Natl Acad Sci*; (2004); 101(29):10679-10684.
- 108- Bjorkbacka H., Kunjathoor V.V., Moore K.J., Koehn S., Ordija C.M., Lee M.A, Means T., Halmen K., Luster A.D., Golenbock D.T. and Freeman M.W.; Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways; *Nat Med*; (2004); 10(4):416-421.
- 109- Tschopp J. and Schroder K.; NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production?; *Nat Rev Immunol*; (2010); 10(3):210-215.
- 110- Rajamaki K., Lappalainen J., Oorni K., Välimäki E., Matikainen S., Kovanen P.T. and Eklund K.K.; Cholesterol crystals activate the NLRP3 inflammasome in human macrophages: a novel link between cholesterol metabolism and inflammation; *PLoS One*; (2010); 5:e11765.

- 111- Latz E.; The inflammasomes: mechanisms of activation and function; *Curr Opin Immunol*; (2010); 22(1):28-33.
- 112- Dinarello C.A.; Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process; *Am J Clin Nutr*; (2006); 83:447S-455S.
- 113- Gracie J.A., Robertson S.E. and McInnes I.B.; Interleukin-18; *J Leukoc Biol*; (2003); 73:213-224.
- 114- De Nardo D. and Latz E.; NLRP3 inflammasomes link inflammation and metabolic disease; *Trends Immunol*; (2011); 32(8): 373–379.
- 115- Robertson A.K. and Hansson G.K.; T cells in atherogenesis: for better or for worse?; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; (2006); 26:2421-2432.
- 116- Leon M.L. and Zuckerman S.H.; Gamma interferon: a central mediator in atherosclerosis; *Inflamm Res*; (2005); 54:395-411.
- 117- De Nooijer R., Thusen von der J.H., Verkleij C.J., Kuiper J., Jukema J.W., Wall van der E.E., van Berkel J.C. and Biessen E.A.; Overexpression of IL-18 decreases intimal collagen content and promotes a vulnerable plaque phenotype in apolipoprotein-E-deficient mice; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; (2004); 24:2313-2319.
- 118- Gerdes N., Sukhova G.K., Libby P., Reynolds R.S., Young J.L. and Schonbeck U.; Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis; *J Exp Med*; (2002); 195:245-257.
- 119- Banerjee M. and Vats P.; Reactive metabolites and antioxidant gene polymorphisms in Type 2 diabetes mellitus; *Redox Biology*; (2014); 170–177.
- 120- Njølstad P.R., Søvik O., Cuesta-Muñoz A., Bjørkhaug L., Massa O., Barbetti F., Undlien D.E., Shiota C., Magnuson M.A., Molven A., Matschinsky F.M. and Bell G.I.; Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency; *N Engl J Med*; (2001); 344:1588-1592.
- 121- Newman A.B., Siscovick D.S., Manolio T.A., Polak J., Fried L.P., Borhani N.O. and Wolfson S.K.; Ankle-arm index as a marker of atherosclerosis in the Cardiovascular Health Study; *Circulation*; (1993); 88:837-845.
- 122- Feskens E.J. and Kromhout D.; Glucose tolerance and the risk of cardiovascular disease: the Zutphen Study; *J Clin Epidemiol*; (1992); 45:1327-1334.
- 123- Himmelmann A., Hansson L., Svensson A., Harmsen P., Holmgren C. and Svanborg A.; Predictors of stroke in the elderly; *Acta Med Scand*; (1988); 224:439-443.
- 124- Kannel W.B. and McGee D.L.; Update on some epidemiologic features of intermittent claudication: the Framingham Study; *J Am Geriatr Soc*; (1985); 33:13-18.
- 125- Kuusisto J., Mykkanen L., Pyorala K. and Laakso M.; Non-insulin-dependent diabetes and its metabolic control are important predictors of stroke in elderly subjects; *Stroke*; (1994); 25:1157-1164.
- 126- Hu F.B., Stampfer M.J., Solomon C.G., Liu S., Willett W.C., Speizer F.E., Nathan D.M. and Manson J.E.; The impact of diabetes mellitus on mortality from all causes and coronary heart disease in women; *Arch Intern Med*; (2001); 161:1717-1723.
- 127- Stegmayr B. and Asplund K.; Diabetes as a risk factor for stroke; *Diabetologia*; (1995); 38:1061-1068.
- 128- Williams S.B., Cusco J.A., Roddy M.A., Johnstone M.T., Creager M.A.; Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus; *J Am Coll Cardiol*; (1996); 27:567-574.
- 129- Johnstone M.T., Creager S.J., Scales K.M., Cusco J.A., Lee B.K. and Creager M.A.; Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus; *Circulation*; (1993); 88:2510-2516.
- 130- Vinik A.I., Erbas T., Park T.S., Nolan R. and Pittenger G.L.; Platelet dysfunction in type 2 diabetes; *Diabetes Care*; (2001); 24:1476-1485.
- 131- Carr M.E.; Diabetes mellitus: a hypercoagulable state; *J Diabetes Complications*; (2001); 15:44-54.
- 132- Zimmet P., Alberti K.G. and Shaw J.; Global and societal implications of the diabetes epidemic; *Nature*; (2001); 414:782–787.

- 133- Shaw J.E., Sicree R.A. and Zimmet P.Z.; Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030; *Diabetes Res Clin Pract*; (2010); 87:4–14.
- 134- Chen L., Magliano D.J. and Zimmet.P.Z.; The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*; (2011); 8(4): 228-36.
- 135- Yang W., Lu J., Weng J., Jia W., Ji L., Xiao J., Shan Z., Liu J., Tian H., Ji Q., Zhu D., Ge J., Lin L., Chen L., Guo X., Zhao Z., Li Q., Zhou Z., Shan G. and He J.; Prevalence of diabetes among men and women in China; *N Engl J Med*; (2011); 362:1090–1101.
- 136- Ning F., Pang Z.C., Dong Y.H., Gao W.G., Nan H.R., Wang S.J., Zhang L., Ren J., Tuomilehto J., Hammar N., Malmberg K., Andersson S.W. and Qiao Q.; Risk factors associated with the dramatic increase in the prevalence of diabetes in the adult Chinese population in Qingdao, China; *Diabet Med*; (2009); 26:855–863.
- 137- Ramachandran A., Mary S., Yamuna A., Murugesan N. and Snehalatha C.; High prevalence of diabetes and cardiovascular risk factors associated with urbanization in India; *Diabetes Care*; (2008); 31:893–898.
- 138- Rotter V., Nagaev I. and Smith U.; Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factoralpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects; *J Biol Chem*; (2003); 278:45777–45784.
- 139- Yuan M., Konstantopoulos N., Lee J., Hansen L., Li Z.W., Karin M. and Shoelson S.E.; Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta; *Science*; (2001); 293:1673–1677.
- 140- Donath M.Y., Schumann D.M., Faulenbach M., Ellingsgaard H., Perren A., Ehse J.A.; Islet Inflammation in Type 2 Diabetes; *Diabetes Care*; (2008); 31(Suppl. 2):S161–S164.
- 141- Morgan D., Oliveira-Emilio H.R., Keane D., Hirata A.E., Santos da Rocha M., Bordin S., Curi R., Newsholme P., Carpinelli A.R.; Glucose, palmitate and pro-inflammatory cytokines modulate production and activity of a phagocyte-like NADPH oxidase in rat pancreatic islets and a clonal beta cell line; *Diabetologia*; (2007); 50:359-369.
- 142- Nishikawa T. and Araki E.; Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications; *Antioxid Redox Signal*; (2007); 9:343-53.
- 143- Junn E., Han S.H., Im J.Y., Yang Y., Cho E.W., Um H.D., Kim D.K., Lee K.W., Han P.L., Rhee S.G. and Choi I.; Vitamin D3 upregulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function; *J Immunol*; (2000); 164: 6287–6295.
- 144- Spindel O.N., World C. and Berk B.C.; Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms; *Antioxid Redox Signal*; (2012); 16: 587–596.
- 145- Zhou R., Tardivel A., Thorens B., Choi I. and Tschopp.; Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation; *J Nat Immunol*; (2009); 136-40.
- 146- Dinarello C.A., Donath M.Y. and Mandrup-Poulsen T.; Role of IL-1 β in type 2 diabetes; *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*; (2010); 17:314-321.
- 147- Masters S.L., Dunne A., Subramanian S.L., Hull R.L., Tannahill G.M., Sharp F.A., Becker C., Franchi L., Yoshihara E., Chen Z., Mullooly N., Mielke L.A., Harris J., Coll R.C., Mills K.H., Mok K.H., Newsholme P., Nuñez G., Yodoi J., Kahn S.E., Lavelle E.C. and O'Neill L.A.; Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 β in type 2 diabetes; *Nat Immunol*; (2010); 11(10):897-904.
- 148- Maedler K., Størling J., Sturis J., Zuellig R.A., Spinas G.A., Arkhammar P.O., Mandrup-Poulsen T. and Donath M.Y.; Glucose- and interleukin-1 β -induced beta-cell apoptosis requires Ca²⁺ influx and extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 activation and is prevented by a sulfonylurea receptor 1/inwardly rectifying K⁺ channel 6.2 (SUR/Kir6.2) selective potassium channel opener in human islets; *Diabetes*; (2004); 53:1706–1713.

- 149- Del Guerra S., Lupi R., Marselli L., Marselli L., Masini M., Bugliani M., Sbrana S., Torri S., Pollera M., Boggi U., Mosca F., Del Prato S. and Marchetti P.; Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes; *Diabetes*; (2005); 54 :727-735.
- 150- D'Alessandris C., Andreozzi F., Federici M., Cardellini M., Brunetti A., Ranalli M., Del Guerra S., Lauro D., Del Prato S., Marchetti P., Lauro R. and Sesti G.; Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells; *FASEB J*; (2004); 18:959-961.
- 151- Poyttou V. and Robertson R.P.; Glucolipotoxicity: fuel excess and β -cell dysfunction; *Endocr Rev*; (2008); 29(3):351-66.
- 152- Maedler K., Oberholzer J., Bucher P., Spinas G.A. and Donath M.Y.; Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function; *Diabetes*; (2003) ; 52 :726-733.
- 153- Lupi R., Dotta F., Marselli L., Del Guerra S., Masini M., Santangelo C., Patané G., Boggi U., Piro S., Anello M., Bergamini E., Mosca F., Di Mario U., Del Prato S. and Marchetti P.; Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated; *Diabetes*; (2002) ; 51:1437-1442.
- 154- Wrede C.E., Dickson L.M., Lingohr M.K., Briaud I. and Rhodes C.J.; Protein kinase B/Akt prevents fatty acid-induced apoptosis in pancreatic beta-cells (INS-1); *J Biol Chem*; (2002); 277: 49676-49684.
- 155- Fraga B.; Naturel sesquiterpenoides; *Nat prod rep*; (1998); 15:73-92.
- 156- Abil'daeva A.Zh., Pak R.N., Kulyasov A.T. and Adekenov S.M.; Anti-inflammatory effect of arglabin and 11,13-dihydro-13-dimethylaminoarglabin hydrochloride; *Eksp Klin Farmakol*; (2004); 67(1):37-9.
- 157- Buchele B. and Simmet T.; Analysis of 12 different pentacyclic triterpenic acids from frankincense in human plasma by high-performance liquid chromatography and photodiode array detection; *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; (2003); 795(2):355-362.
- 158- Buchele B., Zugmaier W. and Simmet T.; Analysis of pentacyclic triterpenic acids from frankincense gum resins and related phytopharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. Identification of lupeolic acid, a novel pentacyclic triterpene; *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*; (2003); 791(1-2):21-30.
- 159- Morad S.A., Schmidt C., Buchele B., Schneider B., Wenzler M., Syrovets T. and Simmet T.; (8R)-3beta,8-dihydroxypolypoda-13E,17E,21-triene induces cell cycle arrest and apoptosis in treatment-resistant prostate cancer cells; *J Nat Prod*; (2011); 74(8):1731-1736.
- 160- Ray A. and Dittel B.N.; Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells; *J Vis Exp*; (2010); (35):1488.
- 161- Duester P., Kono H., Rayner K.J., Sirois C.M., Vladimer G., Bauernfeind F.G., Abela G.S., Franchi L., Nuñez G., Schnurr M., Espevik T., Lien E., Fitzgerald K.A., Rock K.L., Moore K.J., Wright S.D., Hornung V. and Latz E.; NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals; *Nature*; (2010); 464(7293):1357-61.
- 162- Bachar-Wikstrom E., Wikstrom J.D., Ariav Y., Tirosh B., Kaiser N., Cerasi E. and Leibowitz G.; Stimulation of autophagy improves endoplasmic reticulum stress-induced diabetes; *Diabetes*; (2013); 62(4):1227-1237.
- 163- Wu Y.T., Tan H.L., Shui G., Bauvy C., Huang Q., Wenk M.R., Ong C.N., Codogno P. and Shen H.M.; Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase; *J Biol Chem*; (2010); 285(14):10850-61.
- 164- Sullivan P.M., Mezdour H., Quarfordt S.H. and Maeda N.; Type III hyperlipoproteinemia and spontaneous atherosclerosis in mice resulting from gene replacement of mouse Apoe with human Apoe*2; *J Clin Invest*; (1998); 102(1):130-135.
- 165- Sullivan, P.M., Mezdour H., Aratani Y., Knouff C., Najib J., Reddick R.L., Quarfordt S.H, and Maeda N.; Targeted replacement of the mouse apolipoprotein E gene with the common human APOE3 allele

enhances diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis; *J Biol Chem*; (1997); 272(29):17972–17980.

166- Wiesbauer F., Blessberger H., Azar D., Goliash G., Wagner O., Gerhold L., Huber K., Widhalm K., Abdolvahab F., Sodeck G., Maurer G. and Schillinger M.; Familial-combined hyperlipidaemia in very young myocardial infarction survivors (< or =40 years of age); *Eur Heart J*; (2009); 30(9):1073–1079.

167- Miki Y. and Heller C.; A homogeneous assay for the selective measurement of LDL-cholesterol in serum. Enzymatic selective protection method; *Clin Lab*; (1999); 45:398-401.

168- Bang F.B.; A bacterial disease of *Limulus polyphemus*; *Bull Johns Hopkins Hosp*; (1956); 98(5):325-351.

169- Levin J. and Bang F.B.; The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood; *Bull Johns Hopkins Hosp*; (1964); 115:265-274.

170- Bang F.B.; The toxic effect of a marine bacterium on *Limulus* and the formation of blood clots; *Biol Bull (Woods Hole, MA)*; (1953); 105:361-362.

171- Levin J. and Bang F.B.; A description of cellular coagulation in the *Limulus*; *Bull Johns Hopkins Hosp*; (1964); 115:337-345.

172- Levin J. and Bang F.B.; Clottable protein in *Limulus*: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin; *Thromb Diath Haemorrh*; (1968); 19:186-197.

173- Wenyong Q., Yu-Mi L. and Myung-Shik L.; Role of autophagy in diabetes and endoplasmic reticulum stress of pancreatic β -cells; *Exp Mol Med*; (2012); 44(2): 81-88.

174- Li S., Du L., Zhang L., Hu Y., Xia W., Wu J., Zhu J., Chen L., Zhu F., Li C. and Yang S.; Cathepsin B contributes to autophagy-related 7 (Atg7)-induced nod-like receptor 3 (NLRP3)-dependent proinflammatory response and aggravates lipotoxicity in rat insulinoma cell line; *J Biol Chem*; (2013); 288(42):30094-104.

175- Shaikenov T.E., Adekenov S.M., Williams R.M., Prashad N., Baker F.L., Madden T.L. and Newman R.; Argabin-DMA, a plant derived sesquiterpene, inhibits farnesyltransferase; *Oncol Rep*; (2001); 8:173-179.

176- Büchele B., Zugmaier W., Lunov O., Syrovets T., Merfort I. and Simmet T.; Surface plasmon resonance analysis of nuclear factor-kappaB protein interactions with the sesquiterpene lactone helenalin; *Anal Biochem*; (2010); 401:30-37.

177- Ait-Oufella H., Taleb S., Mallat Z. and Tedgui A.; Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; (2011); 31(5):969–979.

178- Brasier A.R.; The nuclear factor- κ B–interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation; *Cardiovasc Res*; (2010); 86(2): 211–218.

179- Latz E., Xiao T.S. and Stutz A.; Activation and regulation of the inflammasomes; *Nat Rev Immunol*; (2013); 13(6):397-411.

180- Razani B., Feng C., Coleman T., Emanuel R., Wen H., Hwang S., Ting J.P., Virgin H.W., Kastan M.B. and Semenkovich C.F.; Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression; *Cell Metab*; (2012); 15(4):534-544.

181- Martinet W., De Meyer I., Verheye S., Schrijvers D.M., Timmermans J.P. and De Meyer G.R.; Drug-induced macrophage autophagy in atherosclerosis: for better or worse?; *Basic Res Cardiol*; (2013); 108(1):321.

182- Yamamoto A., Tagawa Y., Yoshimori T., Moriyama Y., Masaki R. and Tashiro Y.; Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes et lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells; *Cell Struct Funct*; (1998); 23(1):33–42.

183- Mallat Z., Besnard S., Duriez M., Deleuze V., Emmanuel F., Bureau M.F., Soubrier F., Esposito B., Duez H., Fievet C., Staels B., Duverger N., Scherman D. and Tedgui A.; Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis; *Circ Res*; (1999); 85(8):e17-24.

- 184- Schottelius A.J., Mayo M.W., Sartor R.B. and Baldwin AS. Jr.; Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of Kappa B kinase activity and nuclear factor kB DNA binding; *J Biol Chem*; (1999); 274(45):31868-31874.
- 185- Henke P.K., DeBrunye L.A., Strieter R.M., Bromberg J.S., Prince M., Kadell A.M., Sarkar M., Londy F. and Wakefield T.W.; Viral IL-10 gene transfer decreases inflammation and cell adhesion molecule expression in a rat model of venous thrombosis; *J Immunol*; (2000); 164(4):2131-2141.
- 186- Hessler J.R., Morel D.W., Lewis L.J. and Chisolm G.M.; Lipoprotein oxidation and lipoprotein-induced cytotoxicity; *Arteriosclerosis*; (1983); 3(3):215-222.
- 187- Heinecke J.W., Rosen H. and Chait A.; Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture; *J Clin Invest*; (1984); 74(5):1890-1894.
- 188-Steinbrecher U.P., Parthasarathy S., Leake D.S., Witztum J.L. and Steinberg D. ; Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids; *Proc Natl Acad Sci USA* ; (1984); 81(12): 3883-3887.
- 189- Witztum J.L. and Steinberg D.; The Oxidative Modification Hypothesis of Atherosclerosis: Does It Hold for Humans?; *TCM*; (2001); 11(3-4):93-102.
- 190- Swirski, F.K., Libby P., Aikawa E., Alcaide P., Luscinskas F.W., Weissleder R. and Pittet M.J.; Ly-6Chi Monocytes Dominate Hypercholesterolemia-Associated Monocytosis and Give Rise to Macrophages in Atheromata; *The Journal of Clinical Investigation*; (2007); 117(1):195-205.
- 191- Menu P., Pellegrin M., Aubert J.F., Bouzourene K., Tardivel A., Mazzolai L. and Tschopp J.; Atherosclerosis in ApoE-deficient mice progresses independently of the NLRP3 inflammasome; *Cell Death Dis.*; (2011); 2:e137.
- 192- Youm Y.H., Adijiang A., Vandanmagsar B., Burk D., Ravussin A. and Dixit V.D.; Elimination of the NLRP3-ASC Inflammasome Protects against Chronic Obesity-Induced Pancreatic Damage; *Endocrinology*; (2011); 152(11): 4039-4045.
- 193- Wong W.W. and Puthalakath H.; Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway; *IUBMB Life*; (2008); 60:339-390.
- 194- Jung H.S., Chung K.W., Kim J.W., Kim J., Komatsu M., Tanaka K., Nguyen Y.H., Kang T.M., Yoon K.H., Kim J.W., Jeong Y.T., Han M.S., Lee M.K., Kim K.W., Shin J. and Lee M.S.; Loss of Autophagy Diminishes Pancreatic b Cell Mass and Function with Resultant Hyperglycemia; *Cell Metabolism*; (2008); 8(4):318-324.
- 195- He C. and Levine B.; The Beclin 1 interactome; *Curr Opin Cell Biol*; (2010); 22(2):140-149.
- 196- Huang S. and Houghton P.J.; Mechanisms of resistance to rapamycins; *Drug Resist Updat*; (2001); 4:378-91.
- 197- Zheng F., Xing S., Gong Z., Mu W. and Xing Q.; Silence of NLRP3 Suppresses atherosclerosis and stabilizes plaques in apolipoprotein E-deficient mice; *Mediators Inflamm*; (2014); 2014:507208.
- 198- Peng K., Liu L., Wei D., Yuncheng L.V., Wang G., Xiong W., Wang X., Altaf A., Wang L., HE D., WANG H. and QU P.; P2X7R is involved in the progression of atherosclerosis by promoting NLRP3 inflammasome activation; *Int J Mol Med*; (2015); 35(5): 1179-1188.
- 199- Kwok B.H., Koh B., Ndubuisi M.I., Elofsson M. and Crews C.M.; The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IkappaB kinase; *Chem Biol*; (2001); 8(8):759-766.
- 200- García-Pineros A.J., Castro V., Mora G., Schmidt T.J., Strunck E., Pahl H.L. and Merfort I.; Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones; *J Biol Chem*; (2001); 276(43):39713-39720.
- 201- Weng S.X., Sui M.H., Chen S., Wang J.A., Xu G., Ma J., Shan J. and Fang L.; Parthenolide inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells through induction of G0/G1 phase cell cycle arrest; *J Zhejiang Univ Sci B*; (2009); 10(7):528-535.

- 202- Juliana Ch., Fernandes-Alnemri T., Wu J., Datta P., Solorzano L., Yu J.w., Meng R., Quong A.A., Latz E., Scot C.P. and Alnemri E.S.; Anti-inflammatory Compounds Parthenolide and Bay 11-7082 Are Direct Inhibitors of the Inflammasome; *J Biol Chem*; (2010); 285(13): 9792–9802.
- 203- Kiuchi H., Takao T., Yamamoto K., Nakayama J., Miyagawa Y., Tsujimura A., Nonomura N. and Okuyama A.; Sesquiterpene lactone parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-kappaB phosphorylation; *J Urol*; (2009); 181(5):2339-48.
- 204- Sheehan M., Wong H.R., Hake P.W., Malhotra V., O'Connor M. and Zingarelli B.; Parthenolide, an inhibitor of the nuclear factor-kappaB pathway, ameliorates cardiovascular derangement and outcome in endotoxic shock in rodents; *Mol Pharmacol*; (2002); 61(5):953-63.
- 205- Lopez-Franco O., Hernandez-VArglabineas P., Ortiz-Munoz G., Sanjuan G., Suzuki Y., Ortega L., Blanco J., Egido J. and Gomez-Guerrero C.; Parthenolide Modulates the NF-kB-Mediated Inflammatory Responses in Experimental Atherosclerosis; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; (2006); 26(8):1864-1870.
- 206- Lamkanfi M., Mueller J.L., Vitari A.C., Misaghi S., Fedorova A., Deshayes K., Lee W.P., Hoffman H.M. and Dixit V.M.; Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome; *J Cell Biol*; 187(1):61–70.
- 207- Marchetti C, Chojnacki J., Toldo S., Mezzaroma E., Tranchida N., Rose S.W., Federici M., Tassell B.W.V., Zhang S. and Abbate A.; A novel pharmacologic inhibitor of the NLRP3 inflammasome limits myocardial injury after ischemia-reperfusion in the mouse; *J Cardiovasc Pharmacol*; (2014); 63(4):316–322.
- 208- Potteaux S., Esposito B., van Oostrom O., Brun V., Ardouin P., Groux H., Tedgui A. and Mallat Z.; Leukocyte-derived interleukin 10 is required for protection against atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; (2004); 24(8):1474-8.
- 209- Potteaux S., Deleuze V., Merval R., Bureau M.F., Esposito B., Scherman D., Tedgui A. and Mallat Z.; In vivo electrotransfer of interleukin-10 cDNA prevents endothelial upregulation of activated NF-kappaB and adhesion molecules following an atherogenic diet; *Eur Cytokine Netw*; (2006); 17(1):13-8.
- 210- Nakahira K., Haspel J.A., Rathinam V.A.K., Lee S.J., Dolinay T., Lam H.C., Englert J.A., Rabinovitch M., Cernadas M., Kim H.P., Fitzgerald K.A., Ryter S.W. and Choi A.M.K.; Autophagy proteins regulate innate immune response by inhibiting NALP3 inflammasome-mediated mitochondrial DNA release; *Nat Immunol*; (2011); 12(3): 222–230.
- 211- Emanuel R., Sergin I., Bhattacharya S., Turner J.N., Epelman S., Settembre C., Diwan A., Ballabio A. and Razani B.; Induction of lysosomal biogenesis in atherosclerotic macrophages can rescue lipid-induced lysosomal dysfunction and downstream sequelae; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; (2014); 34(9):1942–1952.
- 212- Ouimet M., Franklin V., Mak E., Liao X., Tabas I., and Marcel Y.L.; Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase; *Cell Metab*; (2011); 13(6):655–667.
- 213- Liao X., Sluimer J.C., Wang Y., Subramanian M., Brown K., Pattison J.S., Robbins J., Martinez J. and Tabas I.; Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis; *Cell Metab*; (2012); 15(4):545–553.
- 214- Shi C.S., Shenderov K., Huang N.N., Kabat J., Abu-Asab M., Katherine A., Fitzgerald K.A., Sher A. and Kehrl J.H.; Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction.; *Nat Immunol*; (2012); 13(3):255–263.
- 215- Cai Z., Shen L. and He B.; Moving with and beyond CANTOS: How to put out the fire of inflammation in atherosclerosis? *International Journal of Cardiology*; (2015); 195:45–47.
- 216- Boss J.L.; Ras gene mutations and human cancer; *Mol Gen Can Diag*; (1990); 273-287.
- 217- Kourounakis A.P., Katselou M.G., Matralis A.N., Ladopoulou E.M. and Bavavea E.; Squalene synthase inhibitors: An update on the search for new antihyperlipidemic and antiatherosclerotic agents; *Curr Med Chem*; (2011); 18(29):4418–39.

- 218- Hiyoshi H., Yanagimachi M., Ito M., Saeki T., Yoshida I., Okada T., Ikuta H., Shinmyo D., Tanaka K., Kurusu N., Tanaka H.; Squalene synthase inhibitors reduce plasma triglyceride through a low-density lipoprotein receptor-independent mechanism; *Eur J Pharmacol*; (2001); 431(3): 345–52.
- 219- Assmann G., Cullen P., Fruchart C., Lewis B., Mancini M. and Carmena R.; Coronary heart disease prevention task force; *Eur Heart*; (1999); 20:841-844.
- 220- Price S.R., Mizel S.B. and Pekala P.H.; Regulation of lipoprotein lipase synthesis and 3T3-L1 adipocyte metabolism by recombinant interleukin 1; *Biochim Biophys Acta*; (1986); 889(3):374–381.
- 221- Kojima M., Ashino T., Yoshida T., Iwakura Y. and Degawa M.; Involvement of interleukin-1 in lead nitrate-induced hypercholesterolemia in mice; *Biol Pharm Bull*; (2012); 35:246-250.
- 222- Kotas M.E., Jurczak M.J., Annicelli C., Gillum M.P., Cline G.W., Shulman G.I. and Medzhitov R.; Role of caspase-1 in regulation of triglyceride metabolism; *Proc Natl Acad Sci*; (2013); 110(12):4810-4815.
- 223- Van Diepen J.A., Stienstra R., Vroegrijk I.O., van den Berg S.A., Salvatori D., Hooiveld G.J., Kersten S., Tack C.J., Netea M.G., Smit J.W., Joosten L.A., Havekes L.M., van Dijk K.W. and Rensen P.C.; Caspase-1 deficiency in mice reduces intestinal triglyceride absorption and hepatic triglyceride secretion; *J Lipid Res*; (2013); 54(2):448-456.
- 224- Napoli C., D'Armiento F.P., Mancini F.P., Postiglione A., Witztum J.L., Palumbo G. and Palinski, W.; Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions; *J Clin Invest*; (1997); 100(11):2680-2690.
- 225- Jiang Y., Wang M., Huang K., Zhang Z., Shao N., Zhang Y., Wang W. and Wang S.; Oxidized low-density lipoprotein induces secretion of interleukin-1b by macrophages via reactive oxygen species-dependent NLRP3 inflammasome activation; *Biochemical and Biophysical Research Communications*; (2012); 425(2):121–126.
- 226- Sheedy F.J., Grebe A., Rayner K.J., Kalantari P., Ramkhalawon B., Carpenter S.B., Becker C.E., Ediriweera H.N., Mullick A.E., Golenbock D.T., Stuart L.M., Latz E., Fitzgerald K.A. and Moore K.J.; CD36 coordinates NLRP3 inflammasome activation by facilitating intracellular nucleation of soluble ligands into particulate ligands in sterile inflammation. *Nature Immunology*; (2013); 14(8):812–820.
- 227- Aviram M., Kaplan M., Rosenblat M. and Fuhrman B.; Dietary antioxidants and paraoxonases against LDL oxidation and atherosclerosis development; *Handb Exp Pharmacol*; (2005); (170):263-300.
- 228- Serbina N.V., Jia T., Hohl T.M. and Pamer E.G.; Monocyte-mediated defense against microbial pathogens; *Annu Rev Immunol*; (2008); 26:421-52.
- 229- Auffray C., Fogg D., Garfa M., Elain G., Join-Lambert O., Kayal S., Sarnacki S., Cumano A., Lauvau G. and Geissmann F.; Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behaviour; *Science*; (2007); 317(5838):666-70.
- 230- Anthopoulos P.G., Hamodrakas S.J. and Bagos P.G.; Apolipoprotein E polymorphisms and type 2 diabetes: a meta-analysis of 30 studies including 5423 cases and 8197 controls; *Mol Genet Metab*; (2010); 100(3):283–291.
- 231- Mahley R.W., Weisgraber K.H. and Huang Y.; Apolipoprotein E: structure determines function, from atherosclerosis to Alzheimer's disease to AIDS; *J Lipid Res*; (2009); 50(Suppl.):S183–S188.
- 232- Hui D.Y., Innerarity T.L. and Mahley R.W.; Defective hepatic lipoprotein receptor binding of b-very low density lipoproteins from type III hyperlipoproteinemic patients. Importance of apolipoprotein E; *J Biol Chem*; (1984); 259(2):860–869.
- 233- Higgins L.J. and Rutledge J.C.; Inflammation associated with the postprandial lipolysis of triglyceride-rich lipoproteins by lipoprotein lipase; *Curr Atheroscler Rep*; (2009); 11(3):199–205.
- 234- Harbis A., Perdreau S., Vincent-Baudry S., Charbonnier M., Bernard M.C., Raccach D., Senft M., Lorec A.M., Defoort C., Portugal H., Vinoy S., Lang V. and Lairon D.; Glycemic and insulinemic meal responses modulate postprandial hepatic and intestinal lipoprotein accumulation in obese, insulin-resistant subjects; *Am J Clin Nutr*; (2004); 80(4):896–902.

- 235- Rivellese A.A., Bozzetto L. and Annuzzi G.; Postprandial lipemia, diet, and cardiovascular risk; *Curr Cardiovasc Risk Rep*; (2009); 3:5–11.
- 236- Gower R.M., Wu H., Foster G.A., Devaraj S., Jialal I., Ballantyne C.M., Knowlton A.A. and Simon S.I.; CD11c/CD18 expression is upregulated on blood monocytes during hypertriglyceridemia and enhances adhesion to vascular cell adhesion molecule-1; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; (2011); 31(1):160–166.
- 237- Alipour A., Ajhmm V.O., Izraeljan A., Verseyden C., Collins J.M., Frayn K.N., Plokker T.W., Elte J.W. and Castro Cabezas M.; Leukocyte activation by triglyceride-rich lipoproteins; *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; (2008); 28(4):792–797.
- 238- Van Oostrom A.J., Sijmonsma T.P., Verseyden C., Jansen E.H., de Koning E.J., Rabelink T.J. and Castro Cabezas M.; Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction; *J Lipid Res*; (2003); 44(3):576–583.
- 239- Drechsler M., Megens R.T.A., van Zandvoort M., Weber C. and Soehnlein O.; Hyperlipidemia-triggered neutrophilia promotes early atherosclerosis; *Circulation*; (2010); 122(18):1837–1845.
- 240- Kuhel D.G., Konanah E.S., Basford J.E., McVey C., Goodin C.T., Chatterjee T.K., Weintraub N.L. and Hui D.Y.; Apolipoprotein E2 accentuates postprandial inflammation and diet-induced obesity to promote hyperinsulinemia in mice; *Diabetes*; (2012); 62(2):382–391.
- 241- Esser N., L’Homme L., De Roover A., Kohnen L., Scheen A.J., Moutschen M., Piette J., Legrand-Poels S. and Paquot N.; Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue; *Diabetologia*; (2013); 56(11):2487–2497.
- 242- Vandanmagsar B., Youm Y.H., Ravussin A., Galgani J.E., Stadler K., Mynatt R.L., Ravussin E., Stephens J.M. and Dixit V.D.; The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance; (2011); 17(2):179–188.
- 243- Esser N., Legrand-Poels S., Piette J., Scheen A.J. and Paquot N.; Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes; *Diabetes Res Clin Pract*; (2014); 105(2):141–150.
- 244- Stienstra R., van Diepen J.A., Tack C.J., Zaki M.H., van de Veerdonk F.L., Perera D., Neale G.A., Hooiveld G.J., Hijmans A., Vroegrijk I., van den Berg S., Romijn J., Rensen P.C., Joosten L.A., Netea M.G. and Kanneganti T.D.; Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance; *PNAS*; (2011); 108(37): 15324–15329.
- 245- Cozar-Castellano I., Weinstock M., Haught M., Velázquez-García S., Sipula D. and Stewart A.F.; Evaluation of beta-cell replication in mice transgenic for hepatocyte growth factor and placental lactogen: comprehensive characterization of the G1/S regulatory proteins reveals unique involvement of p21cip; *Diabetes*; (2006); 55(1):70–77.
- 246- Hughes E. and Huang C.; Participation of Akt, menin, and p21 in pregnancy induced beta-cell proliferation; *Endocrinology*; (2011); 152(3): 847–855.
- 247- Liu Y., Martindale J.L., Gorospe M. and Holbrook N.J.; Regulation of p21WAF1/CIP1 expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway; *Cancer Res*; (1996); 56(1): 31–35.
- 248- Hernandez A.M., Colvin E.S., Chen Y.C., Geiss S.L., Eller L.E. and Fueger P.T.; Upregulation of p21 activates the intrinsic apoptotic pathway in β -cells; *Am J Physiol Endocrinol Metab*; (2013); 304(12): E1281–E1290.
- 249- Zhang G., Matsumoto S., Hyon S.H., Qualley S.A., Upshaw L., Strong D.M. and Reems J.A.; Polyphenol, an extract of green tea, increases culture recovery rates of isolated islets from nonhuman primate pancreata and marginal grade human pancreata; *Cell Transplant*; (2004); 13(2):145–52.
- 250- Kovan J., Blüher M., Tarnowski T., Klötting N., Kirshtein B., Madar L., Shai I., Golan R., Harman-Boehm I., Schön M.R., Greenberg A.S., Elazar Z., Bashan N. and Rudich A.; Altered autophagy in human adipose tissues in obesity; *J Clin Endocrinol Metab*; (2011); 96(2):E268–E277.
- 251- Kosacka J., Kern M., Klötting N., Paeschke S., Rudich A., Haim Y., Gericke M., Serke d H., Stumvoll M., Bechmann I., Nowicki M. and Blüher M.; Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes; *Molecular and Cellular Endocrinology*; (2015); 409:21–32.

- 252- Nakahira K., Haspel J.A., Rathinam V.A., Lee S.J., Dolinay T., Lam H.C., Englert J.A., Rabinovitch M., Cernadas M., Kim H.P., Fitzgerald K.A., Ryter S.W. and Choi A.M.; Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome; *Nat Immunol*; (2011); 12(3):222-230.
- 253- Ebato C., Uchida T., Arakawa M., Komatsu M., Ueno T., Komiya K., Azuma K., Hirose T., Tanaka K., Kominami E., Kawamori R., Fujitani Y., and Watada H.; Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab*; (2008); 8(4):325–332.
- 254- Crişan T.O., Plantinga T.S., Van de Veerdonk F.L., Farcaş M.F., Stoffels M., Kullberg B.J., Van der Meer J.W., Joosten L.A. and Netea M.G.; Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells; *PLoS One*; (2011); 6(4):e18666.
- 255- Harris J., Hartman M., Roche C., Zeng S.G., O’Shea A., Sharp F.A., Lambe E.M., Creagh E.M., Golenbock D.T., Tschopp J., Kornfeld H., Fitzgerald K.A. and Lavelle E.C.; Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation; *J Biol Chem*; (2011); 286(11):9587–97.
- 256- Saitoh T., Fujita N., Jang M.H., Uematsu S., Yang B.G., Satoh T., Omori H., Noda T., Yamamoto N., Komatsu M., Tanaka K., Kawai T., Tsujimura T., Takeuchi O., Yoshimori T. and Akira S.; Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production; *Nature*; (2008); 456(7219):264–8.
- 257- Kim Y.H., Park B.S., Bhatia S.K., Seo H.M., Jeon J.M., Kim H.J., Yi D.H., Lee J.H., Choi K.Y., Park H.Y., Kim Y.G. and Yang Y.H. ; Production of Rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus* from Glycerol-Based Media Optimized by Systemic Methodology. *J. Microbiol. Biotechnol*; (2014); 24(10): 1319-1326.
- 258- Sehgal S.N., Baker H., Vezina C.; Rapamycin (AY22, 989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization; *J Antibiot*; (1975); 28: 727-732.
- 259- Bachar-Wikstrom E., Wikstrom J.D., Ariav Y., Tirosh B., Kaiser N., Cerasi E. and Leibowitz G.; Stimulation of autophagy improves endoplasmic reticulum stress-induced diabetes; *Diabetes*; (2013); 62(4):1227–1237.
- 260- Bachar-Wikstrom E., Wikstrom J.D., Kaiser N., Cerasi E., Leibowitz G.; Improvement of ER stress-induced diabetes by stimulating autophagy; *Autophagy*; (2013); 9(4):626–628.
- 261- Chang G.R., Wu Y.Y., Chiu Y.S., Chen W.Y., Liao J.W., Hsu H.M., Chao T.H., Hung S.W. and Mao F.C.; Long-term Administration of Rapamycin Reduces Adiposity, but Impairs Glucose Tolerance in High-Fat Diet-fed KK/HIJ Mice; *Basic Clin Pharmacol Toxicol*; (2009); 105(3):188–198.
- 262- Furukawa S., Fujita T., Shimabukuro M., Iwaki M., Yamada Y., Nakajima Y., Nakayama O., Makishima M., Matsuda M. and Shimomura I.; Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome; *J Clin Invest*; (2004); 114(12):1752–1761.
- 263- Alsharif N.Z. and Hassoun E.A.; Protective effects of vitamin A and vitamin E succinate against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-induced body wasting, hepatomegaly, thymic atrophy, production of reactive oxygen species and DNA damage in C57BL/6J mice; *Basic Clin Pharmacol Toxicol*; (2004); 95(3):131–138.
- 264- Evans J.L., Goldfine I.D., Maddux B.A. and Grodsky G.M.; Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes; *Endocr Rev*; (2002); 23(5):599–622.
- 265- Rösen P., Nawroth P.P., King G., Mçller W., Tritschler H.J. and Packer L.; The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society; *Diabetes Metab Res Rev*; (2001); 17(3):189–212.
- 266- Fraenkel M., Ketzinel-Gilad M., Ariav Y., Pappo O., Karaca M., Castel J., Berthault M.F., Magnan C., Cerasi E., Kaiser N. and Leibowitz G.; mTOR inhibition by rapamycin prevents b-cell adaptation to hyperglycemia and exacerbates the metabolic state in type 2 diabetes; *Diabetes*; (2008); 57(4):945–957.
- 267- Morrisett J.D., Abdel-Fattah G. and Kahan B.D.; Sirolimus changes lipid concentrations and lipoprotein metabolism in kidney transplant recipients; *Transplant Proc*; (2003); 35(3):S143–S150.

- 268- Mathis A.S., Dave N., Knipp G.T. and Friedman G.S.; Drug-related dyslipidemia after renal transplantation; *Am J Health Syst Pharm*; (2004); 61(6):565–585.
- 269- Reuben A.; Long-term management of the liver transplant patient: diabetes, hyperlipidemia, and obesity; *Liver Transpl*; (2001); 7(11suppl.1):S13–S21.



Annexes

Annexe I
Tampon de lyse

Réactifs	Volume final=10ml	Concentration finale
Hepes 1 M	100 µl	10 mM
EDTA 0,5 M	20 µl	1 mM
KCl 2 M	300 µl	60 mM
NP40 100%	50 µl	0.5 %
PMSF* 0,2 M	50 µl	1 mM
DTT* 1 M	10 µl	1 mM
NaF* 1 M	100 µl	10 mM
Na₃VO₄* 1 M	10 µl	1 mM
Cocktail inhibiteurs protéases (<i>Complete tablets, mini easy pack, Roche</i>)	Une tablette	
Inhibiteurs phosphatases (<i>Phosphatase inhibitor Cocktail 2, Sigma</i>)	100 µl	1/100
H₂O	9.26 ml	

*A préparer extemporanément :

PMSF 0,2 M	0.035 g/1 ml éthanol
DTT 1 M	0.154 g/1 ml H ₂ O
NaF 1 M	0,042 g/1 ml H ₂ O
Na₃VO₄ 1 M	0,184 g/1ml H ₂ O

Préparation du tampon de Laemmli 4X

Tampon Tris/SDS

Tris HCl 0,7 M pH=6,8	8.48 g
SDS 22%	22 g
H₂O	QSP 100 ml

Tampon de Laemmli 4X

Tris HCl 0,7 M pH=6,8/SDS 22%	700 µl
β-mercaptoéthanol	400 µl
Glycérol	800 µl
Bleu de bromophénol	1 pointe de spatule

Annexe II

Tampon de migration 10X

Réactif	QSP 1 L de H ₂ O
Tris 0,25 M	30.28 g
Glycine 1,92 M	144.1 g
SDS 1%	10 g

Tampon de transfert sans méthanol

Réactif	QSP 1 L de H ₂ O
Tris 0,25 M	30.28 g
Glycine 1,92 M	144.1 g
SDS 0,05%	0.5 g

Tampon de transfert 1X avec éthanol

Réactif	QSP 1 L de H ₂ O
Tampon de transfert 5X	200 ml
Éthanol	200 ml

Annexe III

Extraction d'ADN génomique à partir des queues de souris

1. Tampon de lyse :

NaOH 25 mM

EDTA 0,2 mM

→ Pour 40 ml de tampon :

- NaOH=40 mg ou NaOH 3M=333 µl
- EDTA 0,5 M, pH8=16 µl
- Eau QSP 40ml

2. Tampon de neutralisation

Tris HCl 40 mM

→ Pour 40 ml de tampon :

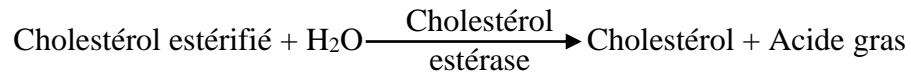
- Tris-HCl 252 mg
- Eau QSP 40 ml

Annexe IV

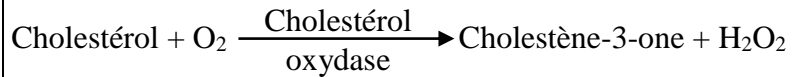
Principes des techniques de dosage des paramètres lipidiques et de la glycémie

1) Dosage de la concentration plasmatique de cholestérol total

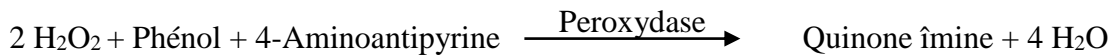
Le cholestérol estérifié est hydrolysé par la cholestérol estérase en cholestérol libre.



Le cholestérol libre est alors soumis à l'action de la cholestérol oxydase en présence de l'oxygène du milieu.



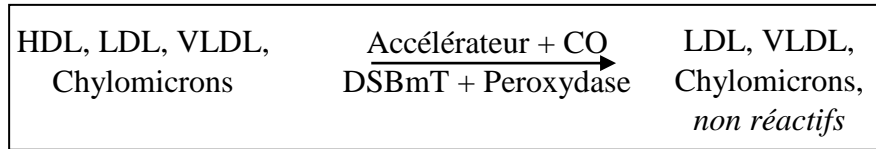
Le peroxyde d'hydrogène formé est dosé par la réaction de Trinder : en présence de phénol, de 4-aminoantipyrine et d'une peroxydase, il se forme une quinone îmine dosable à 500 nm et dont la coloration est proportionnelle à la concentration du cholestérol dans l'échantillon.



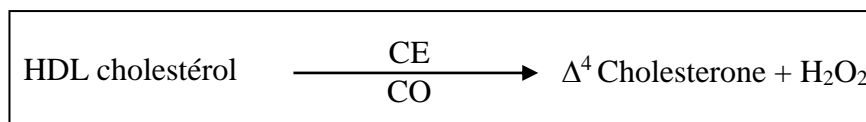
2) Dosage de la concentration plasmatique de HDL-cholestérol

La technique de dosage de HDL-cholestérol fait appel à deux étapes fondamentales: la 1ère étape consiste en une oxydation des chylomicrons, des V-LDL et des LDL en présence d'une cholestérol oxydase (CO) avec libération de peroxyde d'hydrogène. En

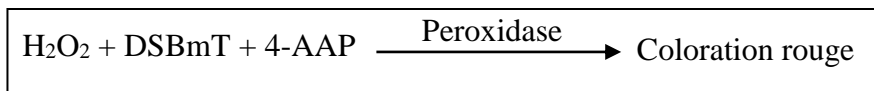
présence de la peroxydase, le H₂O₂ libéré réagit avec le N,N-bis(4-sulphobutyl)-mtoluidine-disodium (DSBmT) pour générer un complexe non réactif incolore.



La deuxième étape consiste en une solubilisation par un détergent spécifique, ce qui permet l'accessibilité des enzymes, la cholestérol estérase (CE) et la cholestérol oxydase (CO) au HDL-cholestérol.



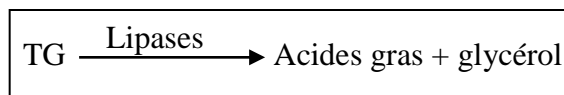
Le peroxyde d'hydrogène généré réagit avec le chromogène, 4-amino-antipyrine (4-AAP) dont l'intensité de la coloration rouge obtenue à 600 nm est proportionnelle à la concentration de cholestérol-HDL.



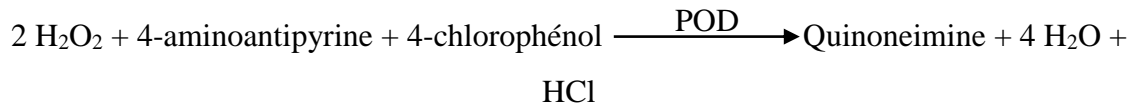
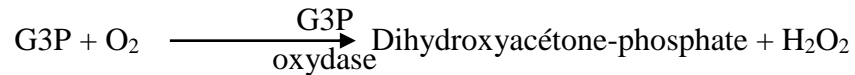
3) Dosage de la concentration plasmatique de triglycérides

Le principe du dosage des triglycérides consiste à doser un des produits d'hydrolyse des triglycérides (TG), soit le glycérol, soit l'acide gras libéré. Mais la plupart des méthodes dose le glycérol.

La 1^{ère} réaction enzymatique consiste en une hydrolyse des triglycérides et libération du glycérol par des lipases.



Le glycérol libéré est dosé par une glycéro-kinase.



L'intensité de ce composé coloré (Quinoneimine) est mesurée à 510 nm et est proportionnelle à la concentration de triglycérides dans l'échantillon.

4) Dosage de la glycémie

Il s'agit d'un dosage colorimétrique à la suite de deux réactions enzymatiques couplées. Une réaction enzymatique étroitement spécifique (glucose-oxydase) oxyde le glucose présent dans l'échantillon en acide gluconique et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier sert de substrat à la peroxydase dans une réaction couplée conduisant à l'oxydation de l'o-Dianisidine en un produit coloré. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration du glucose dans l'échantillon.

